

Tesis de Posgrado

Mecanismos moleculares en la regulación de la biosíntesis esteroidogénica

Pignataro, Omar Pedro

1985

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

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

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

Cita tipo APA:

Pignataro, Omar Pedro. (1985). Mecanismos moleculares en la regulación de la biosíntesis esteroidogénica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1902_Pignataro.pdf

Cita tipo Chicago:

Pignataro, Omar Pedro. "Mecanismos moleculares en la regulación de la biosíntesis esteroidogénica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1902_Pignataro.pdf

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Tesis presentada para optar al título
de Doctor en Ciencias Químicas

MECANISMOS MOLECULARES EN LA REGULACION
DE LA BIOSINTESIS ESTEROIDOGENICA

por
Lic. Omar Pedro Pignataro

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

- 1985 -

Instituto de Biología y Medicina Experimental
Obligado 2490. Buenos Aires. Rep. Argentina.

Tesis 1902
ej. 2

A Inés

A mi hijo

A mis padres

A mi Patria

Nadie se engañe a sí mismo.
Si alguno entre vosotros cree
poseer la sabiduría humana, há-
gase necio para llegar a ser
de verdad sabio. Pues la sabi-
duría humana, necedad es a los
ojos de Dios.

(1 Co 3 : 18)

AGRADECIMIENTOS

A mi gran maestro, el Prof. Dr. Eduardo H. Charreau, bajo cuya dirección realicé este trabajo de Tesis, debo agradecerle profundamente no sólo por sus consejos y orientación, sino también por la confianza que depositó en mí y que me permitieron desarrollar conjuntamente ciencia y docencia.

Al Dr. Juan Carlos Calvo, excepcional compañero y amigo, por su inestimable e incesante apoyo y por su ejemplo de ética y moral en las pequeñas y grandes cosas de la vida.

Al Lic. Juan Pablo Radicella, por haber colaborado en muchos experimentos del trabajo con su habitual bonhomía y calidez humana.

Al Lic. Tomás Santa Coloma, por haberme brindado su amistad al realizar algunos trabajos en común.

A la Dra. Marta Tesone, al Dr. José Lino Barañao, a la Bioq. Violeta Chiauzzi y a la Lic. Ruth Ladenheim por compartir muchos de sus conocimientos a través de estos años en un ambiente de plena camaradería.

A la Sra. Ana Rosa de la Cámara, por su invalorable y eficiente asistencia técnica.

Al Dr. Alberto Baldi y al Lic. Héctor Martínez porque con ellos me inicié científicamente.

Al Dr. Guillermo Juvenal por su colaboración y asesoramiento en los experimentos con hormonas tiroideas.

A la Dra. Damasia Becú y a la Bioq. Victoria Lux por las determinaciones de TSH.

Al Dr. Alberto Boveris y al Lic. Guillermo Fraga por las mediciones de consumo de oxígeno.

A la Sra. Cristina Vega por su esmerada dedicación en la transcripción de este trabajo.

A mi amiga, la Lic. Lucrecia Piñeiro, por su espontánea ayuda y por los gratos momentos compartidos tanto en el IBYME como en la Facultad.

Al Dr. Virgilio Foglia, director del Instituto de Biología y Medicina Experimental, a los jefes de grupos, a los investigadores, becarios y técnicos y al personal de biblioteca, administración, mantenimiento y criadero, porque todos, en mayor o menor grado, cooperaron desinteresadamente para el logro del trabajo.

A mi esposa, la Lic. María Inés Keller Sarmiento, por la recopilación bibliográfica y por su comprensión y paciencia durante todos estos años.

Al laboratorio Dr. Gador, y en particular al Dr. Esteban Montuori, por la fotoduplicación de la Tesis.

A la Srita. Carmen Sica, por la encuadernación de los ejemplares del trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por las becas otorgadas que posibilitaron la realización de la Tesis.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA)

porque en ella me formé profesionalmente.

A mis ex-alumnos, en especial al Dr. Héctor Coirini, al Lic. Eduardo Orti y al Lic. Martín Crespi, porque me permitieron ejercer mi vocación docente, y a quienes enseñé lo que aprendí de mis maestros.

Finalmente agradezco a mis familiares y amigos por todo el apoyo espiritual que me dieron en mi vida.

INDICE

	Página
<u>INTRODUCCION</u>	1
- Consideraciones generales.	2
- Morfología testicular.	3
- La célula de Leydig como fuente de andrógenos. Evidencias históricas.	5
- Morfología de la célula de Leydig.	10
- Regulación de la síntesis de andrógenos.	13
- Importancia de proteínas específicas en la <u>bio</u> síntesis de testosterona.	16
- Los fosfolípidos como intermediarios en la es- teroidogénesis.	19
- Biosíntesis de testosterona en las células de Leydig.	21
- El colesterol como precursor en la biosíntesis de esteroides.	29
- Nomenclatura, estructura y función de las lipo- proteínas.	30
- Camino metabólico de la LDL en las células no esteroidogénicas.	34
- Evidencias de que el colesterol de lipoproteí- nas es un sustrato para la esteroidogénesis.	35
- Biosíntesis <u>de novo</u> de colesterol.	39
HMG-CoA reductasa : etapa limitante del camino biosintético.	39

	Página
Regulación de la HMG-CoA reductasa en tejido hepático.	43
Regulación del sistema bicíclico.	47
Modulación de la HMG-CoA reductasa en órganos esteroidogénicos.	48
- Regulación homóloga y heteróloga de la función testicular.	51
Desensibilización y resensibilización testicular por LH/hCG.	51
Acción de la prolactina sobre la función gonadal.	60
Alteraciones reproductivas en el estado diabético.	64
Influencia de las hormonas tiroideas sobre el testículo.	65
- Hipotiroidismo.	66
- Hipertiroidismo.	68
- Sitios de acción sobre la función testicular.	69
- Objetivos de la presente investigación.	70
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	71
- Animales utilizados.	72
- Tratamiento de los animales.	72
Obtención de animales desensibilizados y resensibilizados por hCG.	72

	Página
Tratamiento con 4-APP.	73
Tratamientos con prolactina, bromo-criptina y sulpirida.	74
Obtención de animales diabéticos.	75
Obtención de animales hipotiroideos e hipertiroideos.	76
- Aislamiento y purificación de células de Leydig.	77
- Cuantificación celular.	79
- Incubaciones con células de Leydig aisladas.	80
- Células de Leydig en presencia de inhibidores de la síntesis de testosterona.	81
- Determinación de testosterona.	81
Testosterona sérica.	82
Testosterona del medio de incubación.	83
- Determinación de pregnenolona.	83
- Determinación de AMP cíclico.	83
Aislamiento de la proteína quinasa de adrenal bovina.	83
Ensayo para la determinación de AMP cíclico.	84
AMP cíclico del medio de incubación.	85
- Marcación de hormonas proteicas.	85
oLH, hCG y hGH.	85

	Página
rTSH.	87
- Radioinmunoensayos de hormonas proteicas.	88
Hormona luteinizante.	89
Tirotrofina.	89
- Radioinmunoensayo de hormonas tiroideas.	90
- Unión de hormonas proteicas a células de Leydig.	90
- Aislamiento y marcación de lipoproteínas plasmáticas.	91
- Unión de las lipoproteínas a células de Leydig.	93
- Determinación de la máxima capacidad de unión de las lipoproteínas marcadas.	95
- Cálculo por autodesplazamiento de las actividades específicas de las lipoproteínas marcadas.	96
- Fraccionamiento subcelular y submitocondrial de células de Leydig.	97
- Determinación de la integridad de las mitocondrias aisladas de células de Leydig.	100
- Ensayos enzimáticos.	102
HMG-CoA reductasa.	102
HMG-CoA sintetasa.	104
HMG-CoA liasa.	105
Succinato deshidrogenasa.	105

	Página
Glucosa - 6 - fosfato deshidrogenasa.	106
Monoamino oxidasa.	107
Malato deshidrogenasa.	107
- Incorporación de acetyl CoA y mevalonato a los esteroides precipitables por digitonina.	108
- Producción de pregnenolona en presencia de acetato y mevalonato exógenos.	109
- Aislamiento de factores moduladores intracelulares de la HMG-CoA reductasa.	109
- Incubación de fracciones subcelulares de células de Leydig e hígado en presencia de factores moduladores intracelulares.	111
- Determinación de colesterol.	112
- Determinación de proteínas.	114
- Ensayos estadísticos.	114
<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	115
- SECCION I .RECEPTORES DE LIPOPROTEINAS EN CELULAS DE LEYDIG.	116
Resultados.	117
Caracterización de la unión de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL) a células de Leydig.	117
Discusión.	132

	Página
- SECCION II .BIOSINTESIS DE <u>NOVO</u> DE COLESTEROL EN CELULAS DE LEYDIG.	137
Resultados	138
Localización subcelular de la HMG-CoA reductasa en células de Leydig.	138
Determinación de la velocidad respiratoria, del control respiratorio y de la relación fósforo-oxígeno (P : O) de las mitocondrias aisladas de células de Leydig.	142
Condiciones de ensayo para la actividad de la HMG-CoA reductasa mitocondrial.	145
Actividad de la HMG-CoA reductasa en diferentes fracciones submitocondriales de células de Leydig.	145
HMG-CoA sintetasa y HMG-CoA liasa en fracciones subcelulares de células de Leydig.	149
Incorporación de ¹⁴ C-acetil CoA a <u>es</u> teroles precipitables por digitonina.	151
Discusión.	154
- SECCION III. REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA Y DEL APORTE DE COLESTEROL PARA LA ESTEROIDOGENESIS EN CELULAS DE LEYDIG.	160
Resultados.	161
Ritmo circadiano de la HMG-CoA <u>reduc</u> tasa.	161

	Página
Condiciones de ensayo para la HMG-CoA reductasa en extractos de células de Leydig.	162
Actividad de la HMG-CoA reductasa durante la desensibilización testicular inducida por gonadotrofinas.	165
Influencia de las lipoproteínas transportadoras de colesterol en la desensibilización testicular.	171
Receptores de lipoproteínas y actividad de HMG-CoA reductasa en ratas desensibilizadas y resensibilizadas.	174
Efectos del tratamiento con 4-APP sobre la esteroidogénesis en células de Leydig.	179
Regulación de la HMG-CoA reductasa por factores moduladores intracelulares.	187
Otros factores regulatorios de la actividad de la HMG-CoA reductasa y de la función testicular.	190
Discusión.	204
<u>CONCLUSIONES GENERALES.</u>	226
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	236

ABREVIATURAS

ACA	acrilamida - agarosa
ACTH	hormona adrenocorticotrófica
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosina difosfato
A.E.	actividad específica
AMP _c	3',5' - adenosina monofosfato cíclico
4 - APP	4 - aminopirazolopirimidina
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
B ₀	capacidad de unión
BSA	albúmina sérica bovina
Ci	Curie
Co A	coenzima A
cpm	cuentas por minuto
d	densidad
dl	decilitro
D.S.	desviación standard
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético

F	fosfatasa
fmol	femtomol
FSH	hormona folículo estimulante
g	aceleración de la gravedad
gr	gramo
G - 6 - P	glucosa-6-fosfato
G - 6 - P DH	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
h	hora
hCG	gonadotropina coriónica humana
HDL	lipoproteína de alta densidad
hGH	hormona de crecimiento humana
h-HDL	lipoproteína de alta densidad humana
h-LDL	lipoproteína de baja densidad humana
hLH	hormona luteinizante humana
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
INT	cloruro de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio
Ka	constante de afinidad
Kd	constante de disociación
Kg	kilogramo
LDL	lipoproteína de baja densidad
LH	hormona luteinizante

M	molar
MA	medio de aislamiento
MAO	monoaminoxidasa
MCU	máxima capacidad de unión
MDH	málico deshidrogenasa
mg	miligramo
min	minuto
MIX	metil isobutil xantina
ml	mililitro
mM	milimolar
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
N.D.	no detectable
ng	nanogramo
nm	nanometro
nmol	nanomol
oLH	hormona luteinizante ovina
oPRL	prolactina ovina
PBS	buffer fosfo-salino (Dulbecco)

pg	picogramo
pmol	picomol
PMSG	gonadotrofina de suero de yegua preñada
PRL	prolactina
P/V	peso en volumen
RK	reductasa quinasa
rpm	revoluciones por minuto
SDH	succinato deshidrogenasa
T ₃	triiodotironina
T ₄	tetraiodotironina (tiroxina)
TCA	ácido tricloroacético
Tris	tri-(hidroximetil)-aminometano
TSH	hormona tirotrófica
uCi	micro-Curie
ug	microgramo
U.I.	unidad internacional
ul	microlitro
um	micrometro
uM	micromolar
VLDL	lipoproteína de muy baja densidad

INTRODUCCION

CONSIDERACIONES GENERALES

Uno de los atributos más importantes de los seres vivos es, quizás, su complejidad y su alto grado de organización. Cada una de las partes componentes de la materia viva cumple una función y ello es cierto no sólo en lo referente a estructuras intracelulares tales como el núcleo y la membrana, sino también para los compuestos químicos individuales de la célula como son los lípidos, las proteínas, los hidratos de carbono y los ácidos nucleicos, siendo legítimo preguntarse cual es la función de cada molécula determinada y como se relacionan entre ellas. Además, los organismos vivos presentan la capacidad de extraer y transformar la energía de su entorno, a partir de materias primas sencillas, y de emplearla para construir y mantener sus propias y complejas estructuras.

Pero la característica más extraordinaria de los seres vivos consiste en su capacidad de generar una réplica de sí mismos, reproduciéndose de generación en generación en formas idénticas de masa y estructura, propiedad que puede considerarse la quintaesencia de la vida.

En el hombre, de la misma forma que en la mayoría de

los animales, la reproducción se realiza sexualmente mediante la unión de células especializadas denominadas gametas. Todas las partes del complicado sistema reproductivo de ambos sexos, se asocian para asegurar la eficiente unión del óvulo, producido por los ovarios de las hembras, y del espermatozoide, generado por los testículos de los machos, para el desarrollo subsiguiente del óvulo fertilizado y su transformación en un nuevo individuo.

MORFOLOGIA TESTICULAR

El testículo de los mamíferos consiste de dos compartimientos en yuxtaposición; uno interno, no vascularizado, que comprende los túbulos seminíferos que, en conjunto con el epidídimo, forma una unidad funcional para la producción, maduración y almacenaje de espermatozoides; y un segundo compartimiento, altamente vascularizado, que rodea a los túbulos seminíferos y que contiene, entre otros componentes del tejido conectivo, las células intersticiales de Leydig en donde se sintetizan las hormonas androgénicas. La Figura a muestra un corte de testículo en el cual se observan las zonas mencionadas.

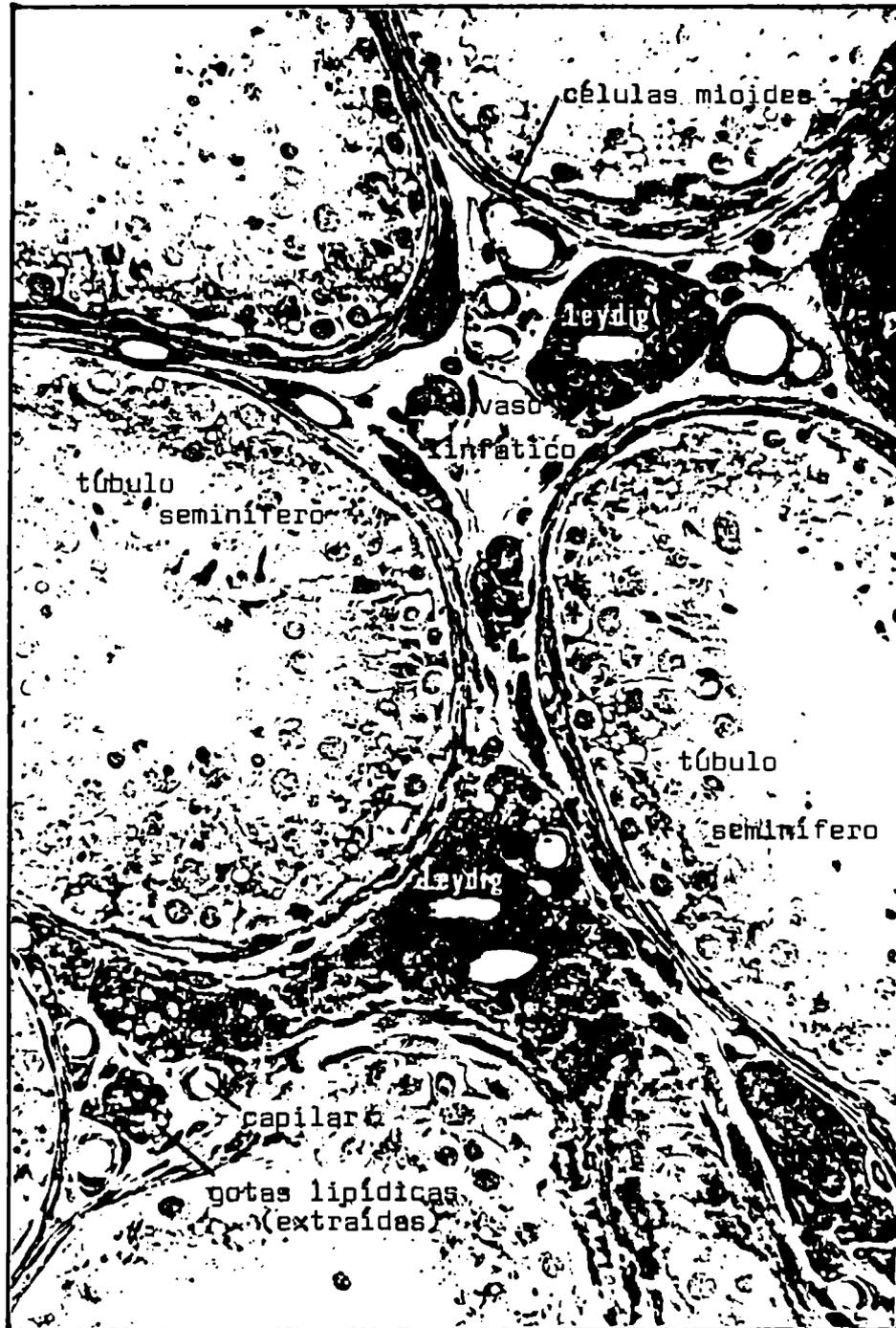


Figura a. Microfotografía de un corte histológico de testículo humano en la cual se observan los túbulos seminíferos y las células de Leydig. x 240.

Está bien determinado que las funciones de ambos compartimientos son reguladas por las gonadotrofinas hipofisarias (158, 159) y además, están interrelacionadas, ya que los andrógenos, que se definen como las hormonas que desarrollan y mantienen los órganos sexuales accesorios y las características sexuales secundarias masculinas, tienen importancia vital en los procesos de espermatogénesis (157, 357) y maduración de los espermatozoides (47, 122).

Esta definición de andrógenos indica que en su ausencia antes de la pubertad, las características de la masculinidad no se desarrollan, mientras que, si los mismos son eliminados durante la vida adulta, las características masculinas establecidas regresionan.

El hecho que las células de Leydig estuviesen involucradas en la secreción de los andrógenos testiculares, ha sido la razón fundamental del interés de estas células.

LA CELULA DE LEYDIG COMO FUENTE DE ANDROGENOS. EVIDENCIAS HISTORICAS

Ya desde la antigüedad se conoce la importancia del testículo en la manifestación de las características sexuales

secundarias del macho. Aproximadamente 300 años antes de Cristo, Aristóteles describe en forma concisa la influencia de la castración de las aves y su diferente efecto según la edad del animal. Más aún, llega a relacionar estos cambios con los observados en los hombres castrados en edad temprana. Sin embargo, transcurriría mucho tiempo antes que se diera comienzo al estudio sistemático del origen y acción de los andrógenos.

Durante casi dos mil años se supuso que la regulación de las características sexuales masculinas era mediada por nervios que se extendían desde el testículo hacia los órganos sexuales secundarios. Recién en 1849 Berthold (43) realiza el que parece ser el primer experimento en endocrinología. El observa que testículos transplantados ectopicamente en gallos castrados, eran capaces de prevenir la atrofia de la cresta de estas aves y concluye que la regulación es realmente ejercida por el testículo a través de la sangre.

Un año después, Franz Leydig describe la presencia de células intersticiales en el testículo de varios mamíferos (228). Más tarde otros autores especulan sobre posibles funciones de estas células sugiriendo que podrían aportar nutrientes para el tubo seminífero, producir una hormona mascu-

lina, 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 (294).

Nuevas evidencias aportadas por Bouin y Ancel en 1903 (52) parecen indicar efectivamente una función endócrina a las células de Leydig, ya que sus características histológicas y morfología coinciden con las de aquellas células involucradas en procesos secretorios. Sin embargo, estas evidencias podían ser interpretadas por otros mecanismos y en 1930, Stieve (334), que había llevado a cabo numerosos estudios histológicos en células de Leydig de varias especies, concluye que las mismas sólo nutren a las células del túbulo y que éstas son las que realmente producen la hormona masculina. Es por todo ello, que Rasmussen (294) en un extenso trabajo sobre el testículo, sugiere que es necesario ser precavido con las conclusiones extraídas de las evidencias experimentales.

Casi simultáneamente se producen dos aportes significativos para el estudio de la función testicular. Por un lado, Butenandt, en 1931 (74) obtiene el primer andrógeno cristalino, la androsterona, y cuatro años más tarde, David (109) ais

la el andrógeno más potente al que da el nombre de testosterona. Por otra parte se demuestra que la función del testículo es controlada por hormonas hipofisarias (158, 159). Una de las pruebas definitivas de que las células de Leydig son la principal fuente de andrógenos se obtiene en 1958 (227, 359) cuando se localiza a la enzima esteroideogénica 3- β hidroxisteroide deshidrogenasa mediante una técnica histoquímica.

No obstante, el desarrollo más espectacular en el conocimiento del mecanismo de secreción y acción androgénica, se produce en los últimos veinte años, cuando la disponibilidad de isótopos radiactivos y los avances realizados paralelamente en otras ramas de la investigación biológica, permitieron penetrar en los complejos mecanismos de la regulación intracelular.

La demostración concluyente de la función endócrina de las células de Leydig se hace posible por el desarrollo de un método que permite separar a las células intersticiales de los túbulos en testículo de rata. Cuando los dos componentes se incuban separadamente con progesterona radiactiva, se ve que el tejido intersticial tiene preponderantemente la capacidad de convertir este sustrato a andrógenos, aún cuando el tu

bo seminífero también muestre alguna actividad (105), y también Hall y col. demuestran que la conversión de colesterol a andrógenos ocurre sólo en el tejido intersticial (167). A pesar de ello, muy pocas investigaciones se realizaron con los compartimientos celulares aislados. Recién en los últimos diez años, se aplican con asiduidad técnicas para la obtención de distintos tipos celulares, que permiten obtener nuevos conocimientos sobre la localización de las enzimas involucradas en la síntesis y metabolismo de esteroides testiculares.

Mucho se ha avanzado desde las primeras observaciones de Aristóteles o desde los años en que Franz Leydig descubriera las células que llevan su nombre. Actualmente está claramente establecido que la biosíntesis de novo de andrógenos ocurre principalmente en la célula de Leydig, mientras que la espermatogénesis se lleva a cabo en los túbulos seminíferos. También se ha avanzado en el conocimiento del mecanismo de acción de la gonadotropina hipofisaria, que conduce finalmente a la secreción de testosterona, pero, a pesar de que se conocen hoy una serie de factores hormonales que pueden regular la función de las células de Leydig, aún persisten numerosos interrogantes sobre los complejos mecanismos involucrados en lograr que esas células sean esteroidegenicamente activas.

MORFOLOGIA DE LA CELULA DE LEYDIG

La estructura de las células de Leydig muestra características comunes en todos los vertebrados, con algunas diferencias entre las especies (104). La Figura b muestra un esquema de la localización y estructura de las células.

La célula de Leydig típica es poligonal, con un diámetro de 15 - 20 micrones. Está rodeada por una típica membrana plasmática, la cual forma numerosos pliegues o microvellosidades.

Tiene un núcleo grande, esférico u ovoide con una, dos y a veces tres nucleolos excéntricos. La cromatina remanente se presenta como gránulos distribuidos predominantemente hacia la periferia del núcleo, dando una apariencia de considerable delgadez a la membrana nuclear cuando se la observa al microscopio óptico. Como los núcleos de otras células intersticiales no exhiben estos atributos, la estructura del núcleo de la célula de Leydig provee un medio de identificación muy útil.

La organela citoplasmática más prominente es el retículo endoplasmático liso, que consiste de túbulos membranosos interconectados de 800 - 1200 ⁰ Å de diámetro y que en la

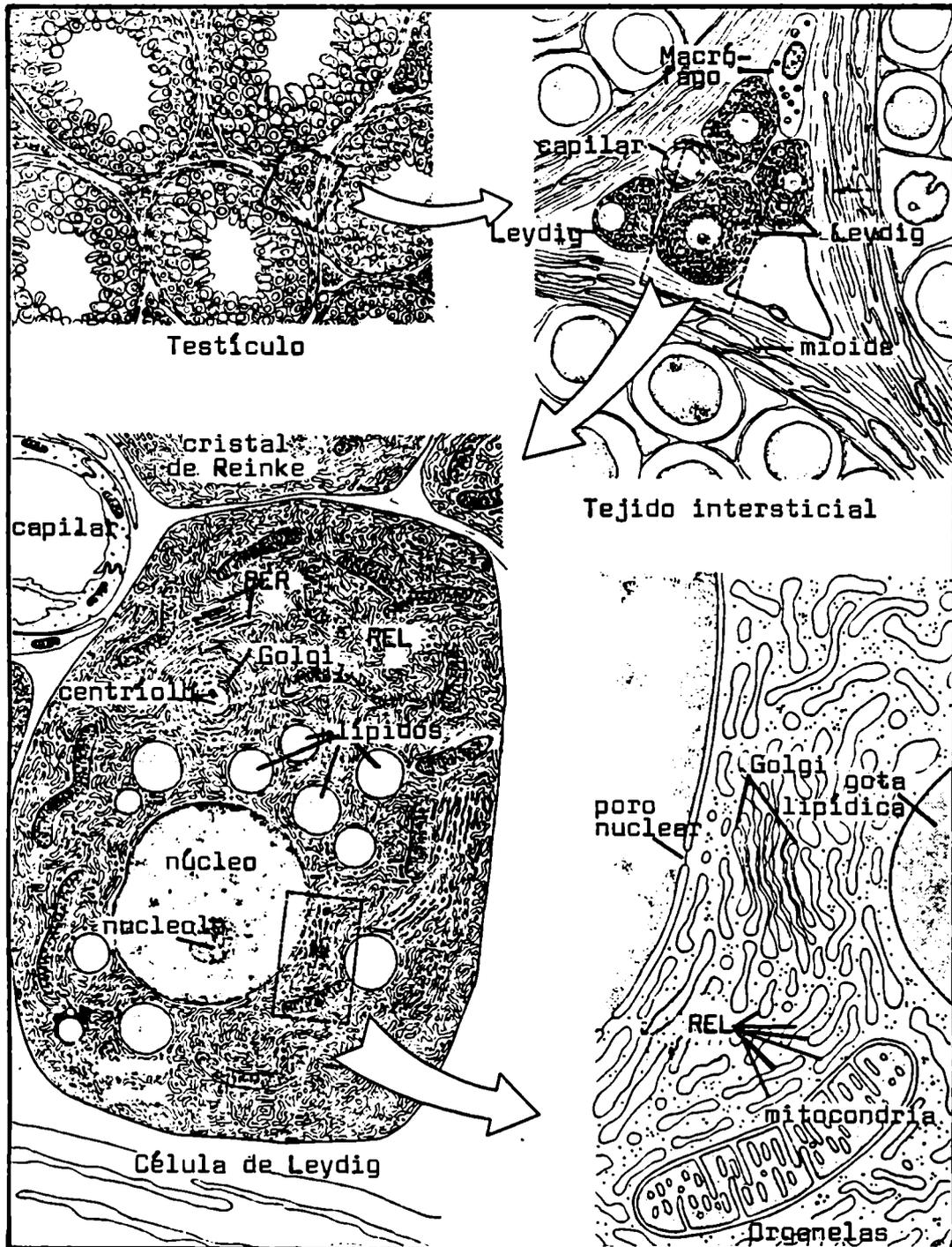


Figura b. Esquema que muestra la localización y estructura de las células de Leydig.

REL : Reticulo Endoplasmático Liso.

REL : Reticulo Endoplasmático Rugoso.

célula viva aparentemente forma una red. Existen también zonas diseminadas de retículo endoplasmático rugoso en contacto con el liso.

Hay un número moderado de mitocondrias con crestas lamelares y algunas tubulares. El complejo de Golgi está bien desarrollado y comunmente en un polo del núcleo. Los elementos de Golgi consisten de 4 - 6 sacos aplanados y juntos, con pequeñas vesículas en su superficie. Dos centriolos, perpendiculares uno del otro, están ubicados en la región del Golgi.

El citoplasma también contiene gotas de lípidos, (de los cuales, los ésteres de colesterol son los principales) cristales de Reinke, microtúbulos y microfilamentos. Son comunes los lisosomas primarios, las vacuolas digestivas y los cuerpos residuales pigmentados.

Mediante estudios histoquímicos en diversas especies, se ha evidenciado la presencia de hidratos de carbono (18, 83, 264), ADN y ARN (202, 252), enzimas hidrolíticas como lipasas, esterasas y fosfatasas (113, 142, 190, 242, 243) y enzimas oxidativas de diversos tipos (272).

El ácido ascórbico parece ser un material constitutivo de tejidos productores de esteroides. De hecho, la concentración de esta sustancia es mayor en las células de Leydig, corteza adrenal y ovarios que en otras células del organismo.

REGULACION DE LA SINTESIS DE ANDROGENOS

La producción de andrógenos por el testículo de los mamíferos depende de una serie de eventos intracelulares que han sido estudiados extensivamente y que se desencadenan cuando la hormona luteinizante (LH) secretada por la hipófisis anterior, se une a receptores específicos de alta afinidad ($K_a = 10^{10} \text{ M}^{-1}$) ubicados en las membranas de las células de Leydig (82). Tales receptores exhiben alta especificidad para LH y otras luteotrofinas, tales como hCG (gonadotrofina coriónica humana) y PMSG (gonadotrofina de suero de yegua preñada), las que interactúan con los receptores para LH del testículo de rata. El contenido promedio del receptor de LH en el testículo de rata adulta es de 1 pmol/gr. equivalente a 20.000 sitios por célula de Leydig. Sin embargo, sólo necesitan ser ocupados el 1 % del total de sitios para dar máxima respuesta esteroideogénica.

La función del gran exceso de sitios denominados " receptores de repuesto ", no se conoce y se postuló que pueden favorecer la interacción del complejo hormona - receptor a bajas concentraciones de ligando y además proveer sitios de reserva para reemplazar a aquellos utilizados o procesados como consecuencia de la unión de hormona endógena durante el control fisiológico de la secreción de esteroides.

Después de la unión a su receptor, el efecto más rápido de la LH es inducir una reacción de acoplamiento, que involucra nucleótidos guanílicos, entre receptor y adenil ciclasa que activa esta enzima.

En la presencia de iones magnesio, esta activación convierte ATP a AMP cíclico (AMP_c) (81, 119, 120). El AMP cíclico resultante es degradado por una fosfodiesterasa, o se une a la subunidad regulatoria de una proteína quinasa causando la liberación de una subunidad catalítica. La proteína quinasa así estimulada cataliza la fosforilación de proteínas intracelulares que intervienen en la secuencia de reacciones que conducen a la síntesis de esteroides (70, 208, 285). Sin embargo, los mecanismos precisos de la acción de las proteínas fosforiladas en la biosíntesis de testosterona, son aún

desconocidos.

Las relaciones temporales de los eventos intracelulares indican que en la célula de Leydig intacta, los niveles de AMP_c se elevan a los pocos segundos de la interacción hormona - receptor, y la producción de testosterona aumentada es evidente a los 5 - 10 minutos.

La respuesta esteroidogénica de las células a la estimulación por LH es reproducida por colerágeno (activador de la adenil ciclasa) y por análogos del AMP_c, y es potenciada por inhibidores de la fosfodiesterasa. Esos descubrimientos son consistentes con el hecho que el AMP_c es el segundo mensajero para la acción gonadotrófica. Sin embargo, la ocurrencia de marcadas discrepancias entre curvas dosis - respuesta para el AMP_c y la producción de esteroides durante la acción hormonal en células de Leydig, luteales o adrenales, sugieren la posibilidad de que existan mensajeros alternativos.

A pesar de que hay numerosas evidencias acerca de la función del camino adenil ciclasa - proteína quinasa durante la acción trófica de LH, no se excluye que existen otras respuestas rápidas a la acción hormonal, particularmente a nivel de la membrana plasmática.

Tales factores, como cambios en el flujo iónico y distribución de calcio y alteraciones en el metabolismo y recambio de fosfolípidos, podrían contribuir a los mecanismos por los cuales las hormonas tróficas ejercen sus efectos agudos y de largo plazo sobre la función de la célula " blanco ".

Otro " mensajero " recientemente propuesto de la acción de las hormonas peptídicas (incluida LH) es el complejo receptor - hormona internalizado, aunque el mecanismo e importancia cuantitativa de este mecanismo aún no está claro.

IMPORTANCIA DE PROTEINAS ESPECIFICAS EN LA BIOSINTESIS DE TESTOSTERONA

Durante la activación hormonal, se produce síntesis proteica en la célula de Leydig, y éste es un prerrequisito para una respuesta esteroideogénica normal, pues en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas, hay una inhibición manifiesta de la biosíntesis de andrógenos (95, 96, 199, 201, 256).

Existen proteínas cuya presencia se observa después de las dos horas de la estimulación con gonadotropina, las cuales pueden estar relacionadas con la regulación a largo

plazo de la respuesta de la célula. Hay otras, con una vida media muy corta ($t_{1/2} = 13$ minutos) que se piensa están involucradas en la regulación aguda de la esteroidogénesis (95).

También se ha detectado en tejido testicular (221) una proteína termoestable que une específicamente al colesterol y se ha sugerido que podría cumplir alguna función en el transporte del mismo, desde el espacio extramitocondrial al intramitocondrial.

Además, se demostró la existencia de un factor proteico termolábil en las mitocondrias de las células de Leydig (172), que modula la actividad de la enzima que escinde la cadena lateral del colesterol, disminuyendo la afinidad de la misma por el NADPH.

Hall y col. (165) han observado que los microfilamentos conteniendo actina en las células de Leydig, podrían estar involucrados en el transporte de colesterol, ya que la esteroidogénesis es inhibida, al menos parcialmente, luego del tratamiento de las células con liposomas conteniendo anticuerpos antiactina.

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 de colesterol constituya la etapa de velocidad limitante en el control de la esteroidogénesis.

Recientemente se ha demostrado (24) que la LH promueve la fosforilación de cinco proteínas extramitocondriales (17.000, 22.000, 24.000, 33.000 y 57.000 dalton). El curso del tiempo de esta respuesta parece estar íntimamente relacionado con la ruptura de la cadena lateral del colesterol y con la producción aumentada de esteroides.

Una de estas proteínas (33.000 dalton) está presente en la subunidad ribosomal 40 S y todo parece indicar que podría ser similar a la proteína ribosomal S_6 , la cual se supuso que podía estar involucrada con la síntesis proteica aumentada. Sin embargo, en células de Leydig, la LH no estimula la incorporación de aminoácidos a proteínas durante los primeros treinta minutos de incubación, a pesar de que la fosforilación de la S_6 es máxima a los cinco minutos de incubación.

Posiblemente la síntesis de alguna proteína específica, por ejemplo, alguna de rápido recambio, requerida para la pro

ducción de esteroides, está aumentada vía fosforilación de otras proteínas involucradas en la síntesis proteica.

Sin embargo, aún cuando la acción de la LH sobre la esteroidogénesis en células de Leydig es acompañada por activación de proteína quinasa, fosforilación de proteínas y sintesis proteica aumentada, no se conoce de qué forma esas proteínas están relacionadas al paso limitante de la velocidad en la producción de esteroides.

LOS FOSFOLIPIDOS COMO INTERMEDIARIOS EN LA ESTEROIDOGENESIS

Hasta unos pocos años atrás se había dado muy poca atención a la posibilidad de que los fosfolípidos pudieran desempeñar algún papel importante en el mecanismo de acción que conduce a la síntesis de esteroides.

Esto puede resultar sorprendente debido a que desde hace tiempo está establecido que muchas enzimas esteroidogénicas residen en membranas fosfolipídicas y que una sustancia lipofílica como el colesterol, tenga que interaccionar con el citocromo P 450 en la membrana interna mitocondrial.

Farese y col. (129, 130) en un intento de identificar, en la glándula adrenal, un factor esteroidogénico inducido

por ACTH, observaron que, ante la estimulación hormonal, había un aumento de difosfoinosítido y trifosfoinosítido, que a su vez eran responsables del incremento en la interacción entre el colesterol y el citocromo P 450.

En una serie de experimentos posteriores realizados tanto " in vivo " como " in vitro " (131-137), se vió que el aumento de fosfolípidos inducido por ACTH o AMP_c era inhibido por cicloheximida y puromicina, y requería de la presencia de Ca²⁺.

Además, con una concentración de ACTH de 10⁻¹² M, que permitía una producción máxima de fosfoinosítido, sólo se obtuvo un 50 - 60 % de la respuesta esteroideogénica máxima, lo cual sugiere que deben existir necesariamente otros factores que regulen la esteroideogénesis.

Otras evidencias que apoyan la hipótesis que los fosfolípidos desempeñan una función mediadora en la síntesis de esteroides fueron provistas por estudios realizados en otros tejidos esteroideogénicos. Tanto en ovario (110, 111) como en células de Leydig (233), se vio que la estimulación con LH provocaba un aumento de ácido fosfatídico, fosfatidilinositol y polifosfoinosítidos, y esos efectos de la LH eran bloqueados

por cicloheximida.

Por lo anteriormente expuesto parecería claro que las hormonas esteroideogénicas (ACTH y LH) promoverían, en sus órganos blanco, la síntesis de novo de fosfatidato y cambios notables en el metabolismo de polifosfoinosítidos.

Estos hallazgos permitieron suponer que los fosfolípidos son intermediarios importantes en el mecanismo de regulación de la biosíntesis de esteroides.

BIOSÍNTESIS DE TESTOSTERONA EN LAS CELULAS DE LEYDIG

Actualmente no existen dudas de que los órganos esteroideogénicos pueden convertir el colesterol a sus hormonas esteroides específicas, es decir : corticosteroides en la glándula adrenal (208, 232, 335), progesterona en el cuerpo lúteo (168, 249) y testosterona en el testículo (166, 169). Además, la conversión de colesterol a estas hormonas es estimulada por las hormonas hipofisarias ACTH (208, 335) y LH (168, 169).

El camino biosintético desde colesterol a testosterona está especificado en la Figura c. Como puede verse hay varias alternativas posibles, entre ellas, la vía $\Delta 5$ - intermedia-

rios (que involucra : pregnenolona, 17-hidroxi-pregnenolona, dehidroepiandrosterona y androstenodiol) y la vía $\Delta 4$ -intermediarios (progesterona, 17-hidroxi-progesterona y androstenodiona) (1, 34, 40, 184, 193, 250, 302, 338, 350).

La velocidad de conversión en testículo de pregnenolona a través de los caminos $\Delta 4$ ó $\Delta 5$, varía según las especies animales, y probablemente el camino metabólico que ocurre en condiciones fisiológicas en todas las especies incluye esteroides $\Delta 4$ y $\Delta 5$ (88). En el testículo humano la vía $\Delta 5$ parecería ser la más importante (365), a diferencia del testículo de rata donde predominaría la vía $\Delta 4$ (302). Varios investigadores observaron que en el testículo fetal humano la síntesis de testosterona puede ocurrir a través de pregnenolona, dehidroepiandrosterona y androstenodiona (1, 191, 193, 250).

La conversión de pregnenolona a testosterona, involucra a las enzimas 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 17α -hidroxilasa, $17\alpha, 20$ -liasa y 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que están ubicadas principalmente en el retículo endoplasmático liso (193, 194, 195, 338, 353), lo cual justifi-

ca que esta organela sea la más abundante en la célula de Leydig. Sin embargo, van der Vusse y col. (353) sugieren que no debe excluirse que parte de la actividad total de esas enzimas esté asociada a las mitocondrias. Cabe destacar que en particular la $17\alpha,20$ -liasa y la 17α -hidroxilasa están relacionadas con el citocromo P 450 microsomal.

A pesar que la testosterona es el andrógeno testicular más importante, existe una gran variabilidad de esteroides endógenos de acuerdo a las especies y al grado de desarrollo (260). Por ejemplo, en el testículo de ratas inmaduras, el 5α -androstano- $3\alpha,17\beta$ diol y el 3α -hidroxi- 5α -androstano-17 ona (androsterona) están presentes en cantidades muy superiores a la testosterona, mientras que esta última se halla incrementada en el testículo maduro (220).

Se han hecho observaciones similares para las cantidades relativas de testosterona y androstenodiona en el testículo de toro, siendo este último esteroide cuantitativamente más importante en animales inmaduros, mientras que la testosterona lo es en animales adultos (230).

Las enzimas requeridas para la formación de pregnenolona, así como para su posterior conversión a androstenodiona

y testosterona están localizadas fundamentalmente en las células de Leydig. Sin embargo, algunas de estas enzimas han sido localizadas en más de un tipo celular (Tabla A).

En la Figura d se muestran algunos de los metabolitos que han sido identificados en tejido testicular de varias especies.

La etapa limitante en la biosíntesis de testosterona es el paso de colesterol a pregnenolona, que involucra una serie de enzimas que se conocen como " complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol ". Este complejo enzimático está localizado en la membrana interna mitocondrial de todos los tejidos productores de esteroides (246, 267, 324, 343, 354), y está constituido por citocromo P 450, una flavoproteína y una ferroproteína no hemínica, requiriendo NADPH y oxígeno molecular para las hidroxilaciones (117, 248, 254, 257, 343).

La formación de pregnenolona (y aldehído isocaproico) a partir de colesterol, comprende algunos metabolitos intermediarios que incluyen 20α -hidroxi-colesterol, $22R$ -hidroxi-colesterol y $20\alpha,22R$ -dihidroxicolesterol (69, 71, 72, 73).

Tabla A : Localización de las enzimas que metabolizan esteroides en el tejido intersticial y en el túbulo seminífero de testículo de rata.

Actividad enzimática	% de actividad presente en	
	Tej. intersticial	Túbulo seminífero
- Complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol	98	2
- $\Delta_5-3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ_{4-5} isomerasa	95-98	2-5
- 17α -hidroxilasa	93-94	6-7
- 20α -hidroxiesteroide deshidrogenasa	3	97
- C ₁₇₋₂₀ liasa	93-94	6-7
- 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa	presente	presente
- 5α -reductasa	90 (inmadura)	10 (inmadura)
- $3\alpha(3\beta)$ hidroxesteroide deshidrogenasa	90 (inmadura) presente (adulto)	10 (inmadura) presente (adulto)
- Aromatasa	presente	presente

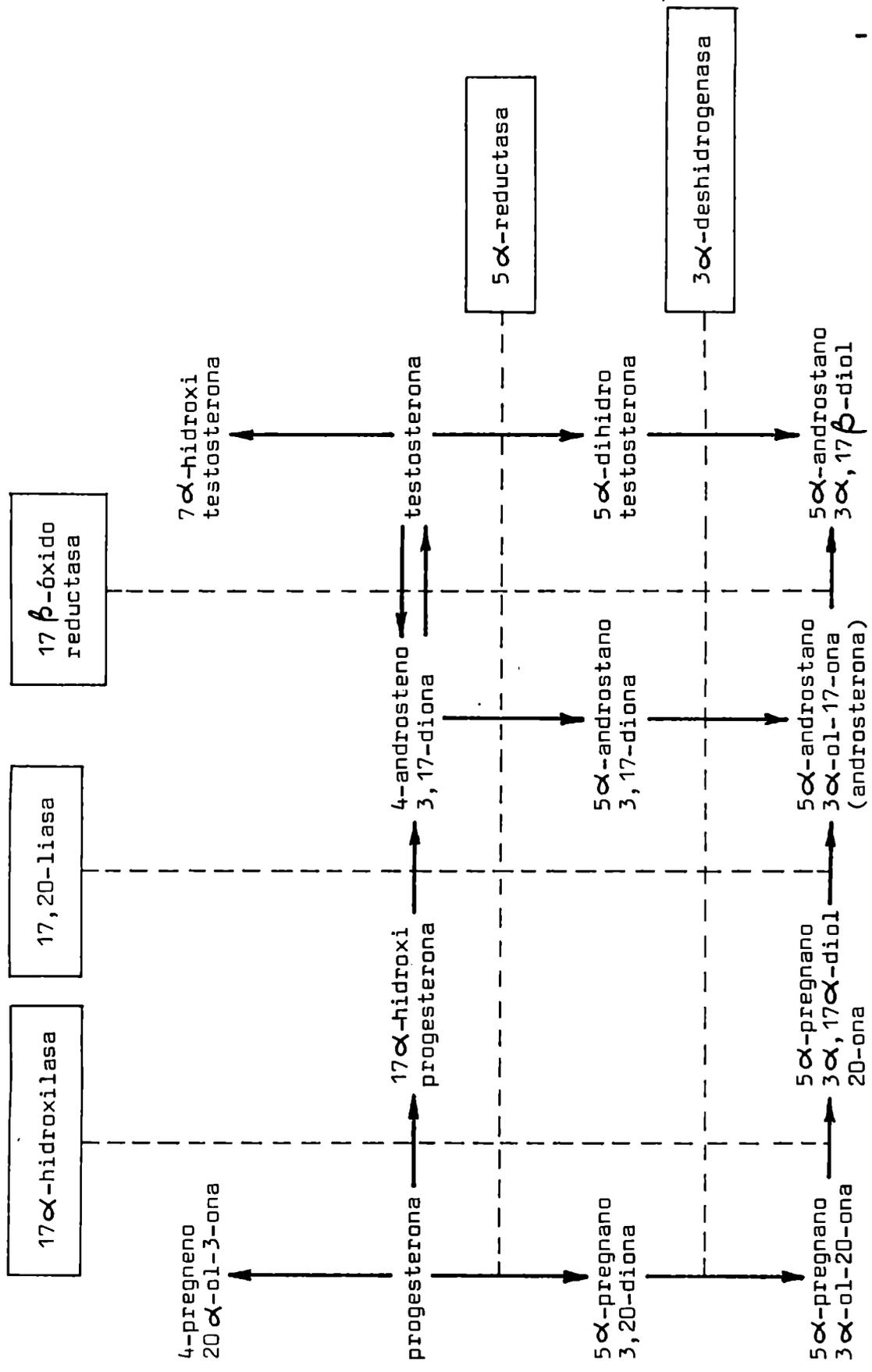


Figura d : Algunos de los caminos conocidos para la degradación reductiva de esteroides en el testículo.

El paso limitante de la velocidad en la producción de esteroides testiculares es regulado por la LH y hay varios mecanismos propuestos por los cuales la hormona trófica podría acelerar la ruptura de la cadena lateral del colesterol (246), a saber : a) un incremento en la cantidad de NADPH, b) un aumento en la concentración de colesterol libre por activación de la colesterol esterasa, c) un aumento en la disponibilidad del esterol promoviendo su transporte a la mitocondria por medio de una proteína transportadora, d) activación de algún componente del complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol.

Más aún, por trabajos realizados tanto en testículo (248) como en adrenal (324) y ovario (265), las hormonas hipofisarias pueden modular la redistribución intramitocondrial de colesterol de tal forma de favorecer la interacción entre el esterol y el citocromo P 450 del complejo enzimático.

Independientemente de cual sea el mecanismo regulatorio del paso limitante de la velocidad, está perfectamente claro que el colesterol cumple una función de fundamental importancia en el camino biosintético de andrógenos testiculares.

EL COLESTEROL COMO PRECURSOR EN LA BIOSINTESIS DE ESTEROIDES

El colesterol cumple dos funciones en las glándulas esteroidogénicas. Por un lado, se encuentra no esterificado en las membranas mitocondriales, membranas lisosomales, retículo endoplasmático y membranas plasmáticas de las células. En todos los casos está asociado con los fosfolípidos como componente de una compleja arquitectura de membranas biológicas.

Por otra parte, como se explicó anteriormente, el colesterol es un precursor obligatorio en la esteroidogénesis y hay tres fuentes importantes del mismo para las células esteroidogénicas : 1) síntesis de novo, 2) colesterol de lipoproteínas y 3) depósitos intracelulares de ésteres de colesterol. Obviamente la cantidad de sustrato disponible del "pool" de ésteres es dependiente de la actividad previa del proceso de captación de lipoproteínas y de la velocidad de la síntesis de novo del esterol.

Todos los tejidos esteroidogénicos son capaces de sintetizar colesterol y la literatura contiene numerosos estudios de incorporación de acetato al colesterol y productos esteroideos por varias glándulas (45, 177, 288, 304, 332,

335).

Sin embargo, la captación de colesterol de las lipoproteínas es el medio principal por el cual las adrenales, ovarios y placenta adquieren el sustrato para la esteroidogénesis en varias especies, incluyendo el hombre (162). Aunque algunos trabajos recientes (41, 103) describen la existencia de los mecanismos de captación de lipoproteínas en testículo, la importancia relativa del colesterol extracelular no está aún dilucidada totalmente en este tejido.

NOMENCLATURA, ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS LIPOPROTEINAS

Las lipoproteínas plasmáticas son macromoléculas complejas compuestas de múltiples proteínas (apolipoproteínas) y subunidades lipídicas. Se clasifican de acuerdo a la densidad que tienen cuando están hidratadas, en cuatro clases principales : quilomicrones ($d < 1,006$ g/ml), de muy baja densidad (VLDL : $d < 1,019$ g/ml), de baja densidad (LDL : $1,019 < d < 1,063$ g/ml) y de alta densidad (HDL : $1,063 < d < 1,210$ g/ml) (198, 279).

Las distintas clases de lipoproteínas difieren en el peso molecular, en el contenido lipídico y en la composición

proteica.

Las HDL pueden ser divididas en tres subclases. Las más abundantes en el hombre normal son la HDL₂ y HDL₃ (308). La apolipoproteína A-I (apo A-I) es el componente principal en ambas subclases, pero también contienen Apo A-II y apo C. Una tercera subclase denominada HDL₁ ó HDL_C es la más importante en animales o en hombres que consumen grandes cantidades de colesterol (238, 240).

La apo E comprende un gran porcentaje de la HDL₁. Esto es de una considerable importancia fisiológica pues las lipoproteínas que contienen apo E son reconocidas por el mismo receptor que reconoce a apo B (239). La abundancia relativa de las subclases de HDL difiere entre las especies y entre los sexos (11).

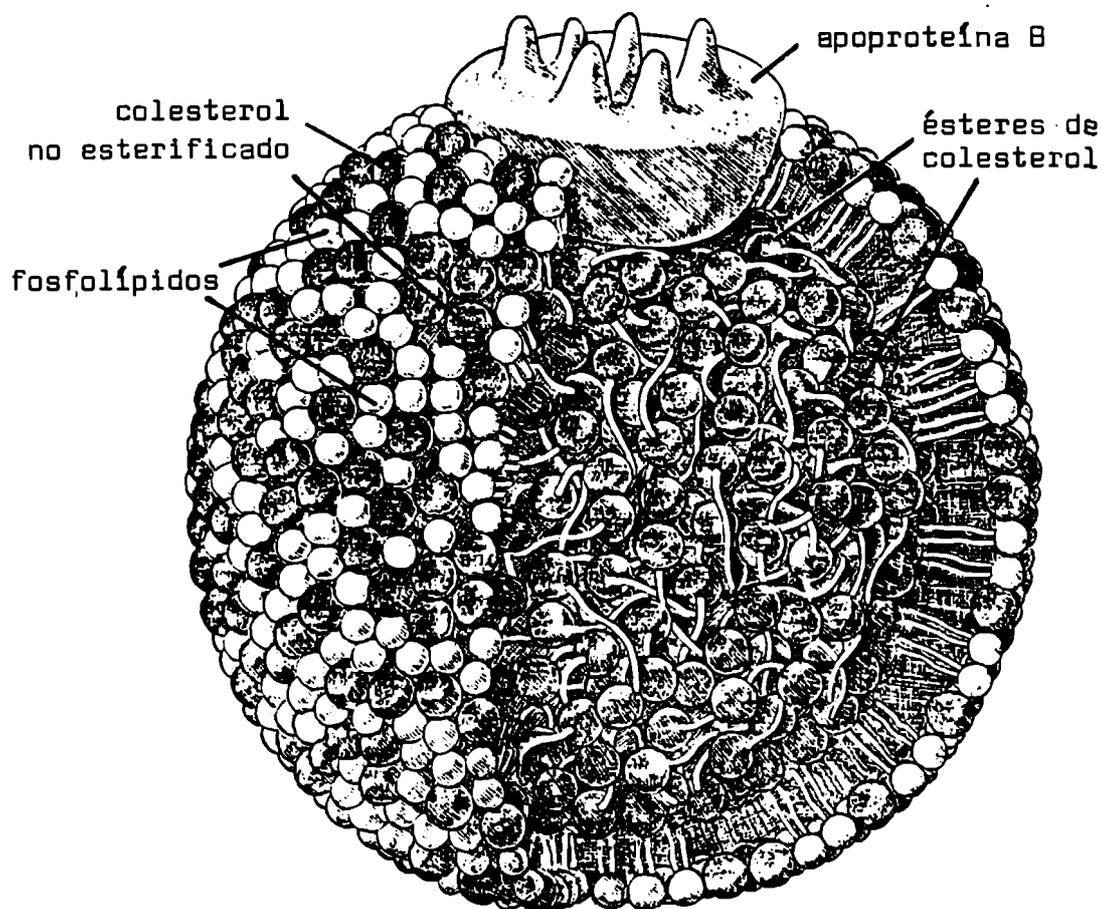
La función fisiológica de una lipoproteína está determinada no por su densidad, sino por su apolipoproteína y la cantidad y tipo de lípidos que lleva. En la mayoría de las especies, más del 90 % del colesterol encontrado en la circulación, está en algún momento, ya sea tanto en la forma esterificada como en la no esterificada, asociado a LDL y a HDL.

Las cantidades relativas encontradas en cada clase de lipoproteína difieren entre las especies. En el hombre más del 60 % se encuentra en la LDL y sólo un 30 % en las subclases de HDL, mientras que en la rata, la mayor parte del colesterol circulante está asociado con las HDL (100, 174).

Estructuralmente las LDL y HDL están formadas por un núcleo apolar de lípidos hidrofóbicos, básicamente ésteres de colesterol y triglicéridos, rodeado por una monocapa polar de fosfolípidos hidrofílicos, apolipoproteínas (198, 279, 306) y colesterol libre (123). La Figura e muestra un diagrama de la estructura y composición de la LDL plasmática.

El hecho de que las apolipoproteínas de las lipoproteínas estén expuestas al plasma, facilita su interacción con enzimas circulantes y con los receptores celulares.

La función primaria de las lipoproteínas es transportar lípidos, incluyendo colesterol libre y esterificado, de sus sitios de síntesis o absorción a sitios de utilización o catabolismo. Todas las células de los mamíferos requieren colesterol como un componente estructural de membranas. Aunque la mayoría de las células son capaces de sintetizar colesterol, muchas acumulan el esteroles necesario de las lipoproteínas.



<u>COMPONENTE</u>	<u>% EN PESO</u>
Apoproteína B -----	25 %
Lípidos totales -----	75 %
Colesterol	
-no esterificado -----	7 %
-esterificado -----	35 %
Fosfolípidos -----	25 %
Glicéridos -----	8 %

Figura e. Diagrama que muestra la estructura y composición de la lipoproteína de baja densidad plasmática (LDL).

nas circulantes (26, 150).

En las células no esteroideogénicas hay por lo menos tres procesos de captación de colesterol : 1) intercambio colisional (39, 289, 300), 2) pinocitosis (3, 218, 301, 333), y 3) endocitosis absorptiva mediada por receptor (64, 148, 325).

CAMINO METABOLICO DE LA LDL EN LAS CELULAS NO ESTEROIDOGENICAS

Los trabajos pioneros de Brown y Goldstein (26, 64) en fibroblastos humanos, demostraron que la captación de colesterol por endocitosis absorptiva comprende tres hechos secuenciales : unión de lipoproteínas a la membrana celular, internalización y degradación lisosomal. Primero observaron que las células somáticas poseen sitios receptores específicos en la membrana, concentrados en sacos o pozos revestidos (" coated pits ") que luego se internalizan formando vesículas endocíticas y que contienen las lipoproteínas unidas al receptor (12, 13). Subsecuentemente, las vesículas endocíticas se fusionan con los lisosomas, y las proteasas y estererasas degradan las lipoproteínas, liberando colesterol no esterificado y aminoácidos (151).

El proceso endocítico requiere activo metabolismo celular y es completamente inhibido a 4°C o por inhibidores de glucólisis y fosforilación oxidativa. Inhibidores de la función lisosomal, tales como cloroquina o cloruro de amonio, previenen el catabolismo de las lipoproteínas pero no inhiben la unión o la internalización (151).

La captación de lipoproteínas en fibroblastos vía "camino de la LDL" origina tres consecuencias metabólicas importantes: 1) inhibición de la síntesis de colesterol celular (60, 149), 2) estimulación de la esterificación de colesterol intracelular (61, 152) y 3) reducción del número de sitios receptores para LDL debido a una disminución en su síntesis (63, 151).

EVIDENCIAS DE QUE EL COLESTEROL DE LIPOPROTEINAS ES UN SUSTRATO PARA LA ESTEROIDOGENESIS

Cinco líneas de experimentación documentan la importancia del colesterol transportado por las lipoproteínas en la esteroidogénesis.

1) Estudios en los cuales se emplea la administración oral o endovenosa de colesterol y precursores de colesterol

radiactivos, indican que el 80 % o más del precursor esteroi-
dogénico en adrenal, ovario y placenta de tres especies, in-
cluido el humano, proviene de fuentes extracelulares (49, 50,
51, 115, 139, 176, 214, 241, 266, 331).

2) Otra línea de evidencia se basa en trabajos reali-
zados en adrenales y ovarios de ratas y ratones. En estos ani-
males se disminuyeron notoriamente los niveles de lipoproteí-
nas plasmáticas por tratamiento con 4-aminopirazolopirimidina
(4-APP), un análogo de la adenina (178) o con 17 α -etinil es-
tradiol (138, 175), debido a la inhibición de la secreción o
al aumento del catabolismo de las lipoproteínas hepáticas, res-
pectivamente.

Con el uso de cualquiera de las dos drogas los resulta-
dos coinciden en señalar una disminución de los ésteres de co-
lesterol intracelulares, aumento de la síntesis de novo de co-
lesterol debido a actividades específicas elevadas de la HMG-
CoA reductasa y disminución de la síntesis de corticosterona
en adrenal y de progesterona en ovario, además de una disminu-
ción de los esteroides circulantes (6, 22, 55, 57, 65, 106,
213).

La administración endovenosa de lipoproteínas a los animales tratados revirtió los efectos mencionados a sus valores controles (7, 21, 25, 27, 313).

3) Varios grupos de trabajo estudiaron la importancia del colesterol extracelular midiendo la velocidad de la síntesis de novo del esterol y su influencia en la síntesis de esteroides en glándulas adrenales. Los experimentos realizados utilizando $^3\text{H}_2\text{O}$, para medir velocidades absolutas de colesterogénesis, mostraron que tanto en adrenal como en ovario la producción de esteroides era aproximadamente 4 - 7 veces mayor que la cantidad de colesterol aportada por la síntesis de novo (10, 79, 183, 203, 286, 346).

4) Estudios recientes desarrollados en células ováricas de rata, bovinas o humanas en cultivo, mostraron que la secreción de progestinas no se afectaba significativamente cuando en el medio de incubación estaba presente un inhibidor de la síntesis de colesterol (297, 305, 312, 345).

5) La quinta línea de evidencia proviene de estudiar los efectos de LDL o HDL sobre la esteroidogénesis y metabolismo del colesterol por células en cultivo, de la unión de lipoproteínas a esas células y de la captación " in vivo " de

lipoproteínas marcadas por las glándulas específicas.

Los trabajos descritos anteriormente demostrarían unívocamente que las lipoproteínas son una fuente importante de sustrato esteroideogénico para la glándula adrenal, ovario y placenta de varias especies.

Sin embargo, se debe tener cuidado en extender los conceptos discutidos a todas las glándulas esteroideogénicas o a todas las especies, puesto que, en ciertos casos, los tejidos esteroideogénicos pueden depender del colesterol sintetizado de novo, como sustrato primario para la producción de hormonas esteroides.

Un caso es el testículo de rata y otro la adrenal de hamster. Contrariamente a las adrenales y ovarios, Morris y Chaikoff (266) encontraron que en ratas alimentadas con colesterol radiactivo, la actividad específica del colesterol testicular solo llegó al 37 % de la del plasma.

En el caso de la adrenal de hamster, se observó una muy alta actividad específica de HMG-CoA reductasa en este tejido, aproximadamente 20 - 30 veces mayor que la medida en la adrenal de rata y una velocidad de incorporación 9 veces mayor de ^3H de $^3\text{H}_2\text{O}$ a los esteroides (222, 225, 235, 287). Más aún,

el tratamiento de los hamster con 4-APP no redujo los ésteres de colesterol intracelulares ni aumentó la actividad de la HMG-CoA reductasa.

Todos estos resultados, permiten especular que el esterol biosintetizado de novo, sería la fuente más importante para la esteroidogénesis en la adrenal de hamster.

BIOSINTESIS DE NOVO DE COLESTEROL

HMG-CoA reductasa : etapa limitante del camino biosintético

El estudio de la organización de los caminos biosintéticos, en términos de la arquitectura celular, es función del conocimiento de las reacciones enzimáticas constituyentes.

En lo concerniente a la síntesis de colesterol en las células de los mamíferos, está demostrado que la 3-hidroxi-3 metil glutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) (mevalonato : NADP oxidoreductasa EC 1.1.1.34) que cataliza la transformación de HMG-CoA a mevalonato, requiriendo dos moles de NADPH, es la enzima regulatoria de la velocidad del camino del esterol.

Es importante dejar aclarado que la mayoría de los trabajos sobre ubicación subcelular, función y regulación de la

HMG-CoA reductasa se realizaron en tejido hepático, y luego algunos hallazgos fueron verificados en la glándula adrenal y ovario, y aún cuando no fueron establecidos específicamente, esos resultados se extendieron al testículo.

La Figura f muestra un esquema de los pasos iniciales de la colesterogénesis y de la cetogénesis a partir de acetil CoA.

Las primeras observaciones de que existía algún punto de regulación en la síntesis de colesterol son de 1933 (311) y provienen de estudios en animales enteros. Hacia 1950 se mostró que una dieta rica en colesterol disminuía su propia síntesis (156) pero recién casi diez años después, tres grupos de trabajo identifican el sitio de regulación a nivel de la HMG-CoA reductasa (68, 154, 326).

En la década del 70, algunos autores observaron cambios en las actividades no sólo de la reductasa, sino también en la acetoacetil-CoA tiolasa y en la HMG-CoA sintetasa (36, 87, 337, 360), pero esos cambios eran lentos e incompletos. Además se demostró que en animales alimentados con colesterol había variaciones en las actividades de la pirofosfomevalonato decarboxilasa, isopentenilpirofosfatoisomerasa, dimetilaliltrans-

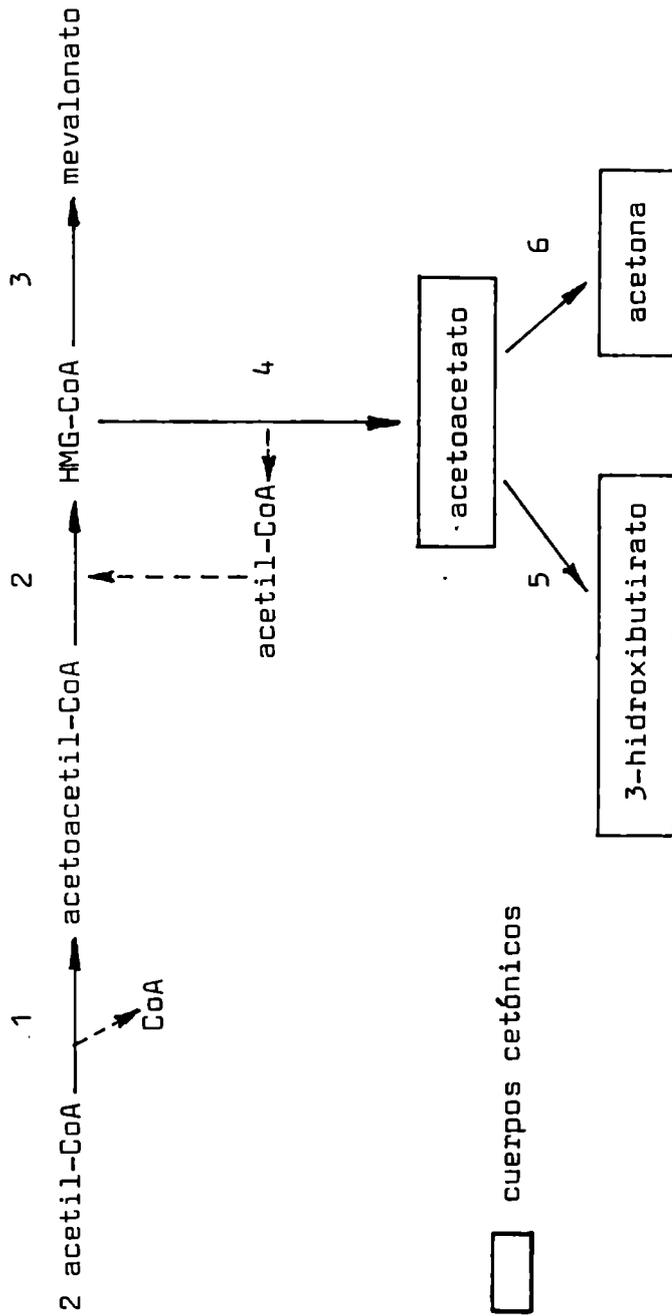


Figura f. Reacciones iniciales en el camino biosintético del colesterol y formación de cuerpos cetónicos. Enzimas involucradas: 1: acetoacetyl-CoA sintetasa. 2: HMG-CoA sintetasa. 3: HMG-CoA reductasa. 4: HMG-CoA liasa. 5: 3-hidroxi butirato deshidrogenasa. 6: Descarboxilación espontánea.

ferasa y escualeno sintetasa (155, 327). Aunque esas variaciones eran pronunciadas, no reflejaban los cambios producidos en la síntesis de colesterol. De tal forma, esos sitios regulatorios precedentes o subsiguientes a la HMG-CoA reductasa, demostraron ser de importancia secundaria, por lo cual la HMG-CoA reductasa se considera como el único punto de regulación para la biosíntesis del colesterol.

La enzima limitante de la colesterogénesis es una glicoproteína intrínseca del retículo endoplasmático (146, 168, 259), con un peso molecular de 97.000 dalton y con el sitio activo ubicado del lado citosólico de la membrana (231).

Otra característica de la HMG-CoA reductasa que tiene un significado fisiológico, es que presenta un ritmo diario de actividad paralelo al ritmo de síntesis de colesterol desde acetato, con un máximo de actividad hacia la medianoche y un mínimo al mediodía, coincidente en distintos tejidos como hígado de ratón (207), hígado (23, 316), intestino (318) y adrenal de rata (25).

Los cambios en la actividad de reductasa asociados con el ritmo diario son, al menos en parte, debidos a variaciones en la cantidad de enzima presente, como resultado de inducción

y represión en la síntesis de la enzima (180, 181, 316). Sin embargo, la existencia de variaciones rítmicas en la actividad de HMG-CoA reductasa en otras especies, particularmente en humanos o en otros tejidos, no se conocen.

Regulación de la HMG-CoA reductasa en tejido hepático

En términos generales, se han elucidado varios mecanismos de regulación enzimática en los caminos metabólicos, que incluyen : modulación por efectores isostéricos y alostéricos, regulación de la síntesis y degradación de enzimas, control por retroalimentación y modificación covalente. Este último mecanismo es el más importante en la regulación por fosforilación - defosforilación de varias enzimas del metabolismo general de la glucosa y se han caracterizado en varios sistemas diversas proteínas quinasas y fosfoproteínas fosfatasas que actúan en la interconversión de los estados fosforilados y defosforilados de las enzimas.

La forma fosforilada puede ser la especie activa o la inactiva según sea el caso. Como se explicó anteriormente, la actividad de la HMG-CoA reductasa está sujeta a regulación a largo plazo por el colesterol y esos cambios se atribuyen a

aumento o disminución en la síntesis de la enzima, mecanismo que está favorecido por la vida media corta de la reductasa (aproximadamente 2 - 4 horas) (62, 295).

Sin embargo, la disminución rápida inicial de la reductasa, observada en ratas alimentadas con colesterol, en ausencia de una disminución concomitante de reductasa inmunoprecipitable (181) no se podía explicar por disminución de síntesis enzimática, lo cual sugirió la posibilidad que la enzima estuviera modulada en forma aguda por algún otro mecanismo.

Beg y col. (35), trabajando con microsomas de hígado de rata, demostraron que la actividad de HMG-CoA reductasa disminuía severamente cuando las incubaciones se realizaban en presencia de ATP y Mg^{2+} y que la enzima inactivada se reactivaba por incubación con EDTA y fracción citosólica. Este efecto reversible del Mg-ATP sugirió que la reductasa podía ser modulada covalentemente por fosforilación y defosforilación. Estas observaciones luego se confirmaron y se extendieron en otros laboratorios (39, 153, 315).

Nordstrom y col. (275) purificaron, de citosol de hígado, un sistema activador y otro sistema inhibitor dependiente de Mg-ATP, que modularon reversiblemente a la reductasa medi-

da en los microsomas o solubilizada. Posteriormente se demostró que el sistema activador era una fosfoproteína fosfatasa (197) y además se purificó a homogeneidad la reductasa quinasa dependiente de Mg-ATP (38), observándose que era una proteína quinasa independiente de AMP_c (196).

Asimismo, varias líneas de evidencias indicaron que la reductasa quinasa era convertida reversiblemente de una forma activa a otra inactiva (59, 197) y la inactivación de esta quinasa se catalizaba por medio de una fosforilasa fosfatasa. La interpretación más simple de esos datos fue que la reductasa quinasa era una enzima interconvertible cuya forma activa estaba fosforilada.

Para completar el circuito de modulación de la HMG-CoA reductasa, se intentó encontrar alguna proteína quinasa dependiente de ATP-Mg que fosforilara la reductasa quinasa. La búsqueda condujo al hallazgo de una actividad enzimática en extractos microsomales y en fracciones citosólicas (196).

Se descubrió que las altas fuerzas iónicas normalmente usadas para medir la actividad de reductasa, impedían la activación de reductasa quinasa, y la evidencia sugirió que la reductasa quinasa no se activaba a sí misma. La nueva en-

zima se denominó reductasa quinasa quinasa (196).

Debido a que la actividad de ambas quinastas se determinan midiendo la actividad de reductasa, la inhibición de reductasa quinasa quinasa, pero no de reductasa quinasa, a altas fuerzas iónicas, provee una forma eficaz para distinguir las dos enzimas.

Todas estas observaciones, permitieron a Ingebritsen y col. (196, 197) sugerir que la HMG-CoA reductasa, está modulada por un sistema bicíclico. En este sistema, las actividades de HMG-CoA reductasa y reductasa quinasa están reguladas por fosforilación reversible. La reductasa es activa en el estado defosforilado, mientras que la reductasa quinasa es inactiva bajo esas condiciones. La defosforilación de ambas enzimas es catalizada por una fosforilasa fosfatasa hepática de 35.000 dalton. La fosforilación de reductasa quinasa requiere Mg-ATP y una enzima denominada reductasa quinasa quinasa, que se encuentra en el citosol y en los microsomas.

La confirmación directa de la fosforilación de la reductasa quinasa se obtuvo trabajando con ambas enzimas, previamente defosforiladas con fosfatasa e incubándolas luego en presencia de γ -³²P-ATP. La identificación de las proteínas

marcadas con ^{32}P se realizó por medio de una electroforesis en geles (37, 38).

Regulación del sistema bicíclico

A pesar que fue comprobado que la reductasa quinasa y la reductasa quinasa quinasa eran proteínas quinasas independientes de nucleótidos cíclicos (196), diversos autores habían observado en tejido hepático de rata (35, 56, 293) que el AMP_c disminuía la actividad de HMG-CcA reductasa, por lo cual no se descartó que existiese alguna ruta alternativa para la regulación del sistema bicíclico por AMP_c .

Diversos trabajos describen la existencia de una enzima denominada fosfoproteína fosfatasa 1 que es inhibida por una proteína termoestable. Esta proteína es activa sólo en el estado fosforilado y la fosforilación es catalizada por una proteína quinasa dependiente de AMP_c . Ese inhibidor fue identificado en músculo esquelético de rata (189) y de conejo (89, 273) y en hígado de perro (301) y de conejo (196).

Si el mismo factor estuviese presente en hígado de rata se podría imaginar un mecanismo de cascada dependiente de AMP_c , que a su vez modulase la HMG-CoA reductasa. En este es-

quema, el nucleótido cíclico actuaría estimulando la fosforilación y activación del inhibidor de fosfatasa-1 por una proteína quinasa dependiente de AMP_c. Como esa proteína inhibe la defosforilación de HMG-CoA reductasa y reductasa quinasa por la fosforilasa fosfatasa, la activación del inhibidor aumentaría la actividad de reductasa quinasa inhibiendo finalmente a la reductasa. La Figura 9 muestra un esquema general de modulación de la HMG-CoA reductasa.

En el hígado de rata, también se había observado la inhibición de la HMG-CoA reductasa por glucagón (124, 125) y su activación por insulina (215, 216). Por lo tanto, con las numerosas evidencias disponibles y en comparación con otros sistemas enzimáticos descritos, es lógico suponer que la actividad de la HMG-CoA reductasa esté sujeta a regulación hormonal, donde el AMP_c sea el segundo mensajero que desencadene la cascada de fosforilaciones-defosforilaciones que regulen finalmente la biosíntesis de novo del colesterol.

Modulación de la HMG-CoA reductasa en órganos esteroideogénicos

Los únicos estudios publicados hasta el momento acerca del mecanismo de regulación de la enzima limitante en la bio-

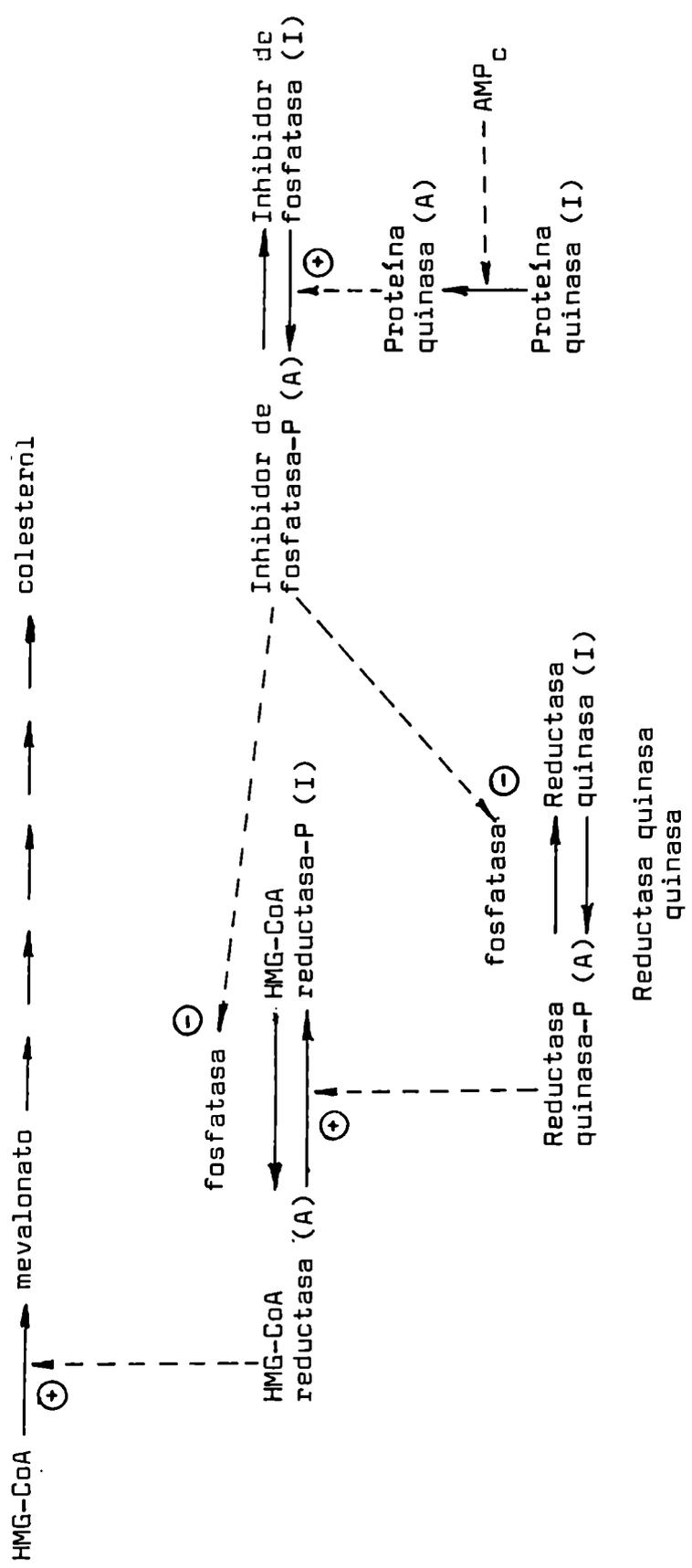


Figura 9. Esquema de la modulación de la actividad de la HMG-CoA reductasa hepática. Las formas activa, inactiva y fosforilada de las enzimas son designadas (A), (I) y P.

síntesis del colesterol en tejidos productores de esteroides, fueron realizados en adrenal de hamster (224).

Se informó de la presencia de dos factores : uno activador y el otro inhibidor de la actividad de la HMG-CoA reductasa. Los autores aislaron el activador de adrenales de hamster y de ternera y encontraron que ambos tenían propiedades similares al obtenido de citosol de hígado de rata ya que las tres preparaciones estimulaban en la misma proporción a la reductasa de adrenal de hamster. Más aún, ellos sugirieron que la enzima se modula por fosfo-defosforilación al aislar un inhibidor citosólico fosforilante.

En otro trabajo (223) se presentaron evidencias de una estimulación aguda por ACTH en la reductasa de adrenal de hamster, lo cual sugeriría que la corticotrofina podría regular de alguna forma la fosfo-defosforilación de la reductasa, probablemente a través de una proteína quinasa dependiente de AMP_c.

De confirmarse estas suposiciones, el mecanismo de regulación de la HMG-CoA reductasa en la glándula adrenal del hamster sería similar, y dependiente de hormonas, al descrito en tejido hepático de ratas.

REGULACION HOMOLOGA Y HETEROLOGA DE LA FUNCION TESTICULAR

Desensibilización y resensibilización testicular por LH/hCG

Se ha demostrado que muchas hormonas regulan la concentración de sus receptores específicos en la superficie de sus células " blanco " (144, 226). Esta regulación, comunmente lleva a la pérdida de sitios receptores, sin cambiar las propiedades de unión de los restantes receptores. La consecuencia de esta pérdida de receptores, inducida por hormonas, sobre la función de la célula " blanco " no ha sido examinada en detalle, aunque varios trabajos han establecido que la " desensibilización " de la adenilato ciclasa al estímulo hormonal está relacionada con la reducción en el número de receptores específicos (182, 211).

Se ha observado que el efecto desensibilizante de la gonadotrofina sobre la adenilato ciclasa ovárica, resulta de la pérdida de receptores para LH (92) y que, la regulación negativa de los receptores testiculares para LH por la gonadotrofina está acompañada de una respuesta disminuída, medida por la estimulación " in vitro " de la producción de AMP cíclico y testosterona por testículos descapsulados (92).

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

Por ejemplo, dosis de 200 ng de hCG no causan cambios en el contenido de receptores en las primeras veinticuatro horas, pero luego de cuarenta y ocho horas se puede observar una marcada disminución en la unión de hCG, que se mantiene a bajos niveles durante varios días. La ocupación de una pequeña proporción de los receptores testiculares por hCG, se acompaña de una marcada disminución en la respuesta de AMP cíclico durante las primeras doce horas posteriores a la inyección de hormona, en ausencia de cambios detectables en la formación basal de AMP cíclico. Sin embargo, la producción de testosterona " in vitro " muestra un cambio inverso, con una elevación en la producción basal y sin cambio en la respuesta máxima a hCG.

Estas observaciones indican que la ocupación de un pequeño número de receptores, causa inicialmente una marcada desensibilización en la respuesta de AMP cíclico y subsecuentemente lleva a la pérdida de 2/3 de los sitios receptores.

A través de estos cambios que no alcanzan al estado de completa abolición de sitios receptores y respuesta de AMP cíclico, la respuesta máxima de testosterona " in vitro " permanece inalterada, indicando la presencia de receptores en exceso en relación con la esteroidogénesis (80).

Luego de la inyección de dosis de 2 ug de hCG se observa una pérdida del 80 - 90 % de los receptores después de 24 horas y una disminución mayor en la respuesta de AMP_c que con 200 ng de hCG y además una disminución en la producción de testosterona.

La estimulación con colerágeno, de las células de Leydig obtenidas de animales tratados con 2 ug de hCG, desarrolla respuestas de AMP_c que son comparables con las de los grupos controles, pero, a pesar de tales aumentos en AMP_c, la producción de testosterona permanece marcadamente reducida. Tampoco se sobrepasa la lesión por estimulación con dibutiril AMP_c, utilizando concentraciones que estimulan la esteroidogénesis en células de Leydig normales.

Dado que los estudios de unión de AMP cíclico no demuestran pérdida de unión a la proteína quinasa en las células de los animales desensibilizados, supone que ni el AMP cíclico

clico ni la quinasa sean causantes de la respuesta esteroido
génica dañada. Además, el hallazgo de que la estimulación hormonal
" in vitro " produce un aumento significativo en la
síntesis de pregnenolona, indica una adecuada actividad de
la enzima encargada de la ruptura de la cadena lateral del
colesterol.

Estos resultados han demostrado que la segunda lesión
en el camino esteroidogénico, inducida por la gonadotrofina,
se encuentra después de la enzima que escinde la cadena la-
teral del precursor esteroidogénico en aquellas células con
un moderado grado de depleción de receptores. Contrariamente,
en el grupo de animales inyectados con 10 ug de hCG donde la
concentración de receptores de membrana es aproximadamente el
5 %, además de la disminución en la producción de AMP cíclico
observada con otras dosis menores, la respuesta de pregnenolona
" in vitro " fue completamente abolida. Esto indica que,
una pérdida más extensa de receptores, resulta en la pérdida
de los procesos necesarios para mantener las enzimas esteroi-
dogénicas, incluyendo el complejo enzimático que escinde la
cadena lateral del colesterol (118).

Estudios posteriores evidenciaron que este defecto es taba caracterizado por una acumulación de intermediarios 17- α hidroxilados, hallazgo concordante con una lesión a nivel de la 17,20-desmolasa, enzima responsable de la conversión de precursores 17-hidroxilados a androstenodiona y dehidroepiandrosterona (85). La causa de la marcada disminución en la actividad de la 17,20-desmolasa, en células de Leydig desensibilizadas por gonadotrofina, no ha sido elucidada aún, pero existen, al menos, dos mecanismos que podrían ser responsables de la lesión enzimática observada.

Primero, estudios previos indican que la administración de estrógenos posee un efecto inhibitorio directo sobre la esteroidogénesis testicular (339) y se sabe que la estimulación gonadotrófica aumenta la producción de estrógenos en el testículo (112). Así, es posible que la estimulación local de la producción de estrógenos en el testículo, por la dosis desensibilizante de hCG, cause el bloqueo de la esteroidogénesis como un fenómeno paralelo a la pérdida de receptores para LH. El efecto de los estrógenos sobre la biosíntesis androgénica incluye la supresión de la actividad de 17- α hidroxilasa y 17,20-desmolasa (303).

Segundo, el efecto general de remoción o reducción súbita del aporte de hormona trófica para las células de Leydig diferenciadas, podría ser un factor adicional en la aparición de defectos biosintéticos en las células desensibilizadas.

Aunque solamente se necesita que una pequeña proporción de los receptores estén ocupados para producir la respuesta esteroideogénica máxima, un descenso marcado en los receptores podría causar una disminución correspondiente en la capacidad de los bajos niveles de gonadotropina plasmática, para mantener los caminos esteroideogénicos característicos de las células de Leydig.

Este proceso podría exacerbase si, a la administración de una dosis desensibilizante de gonadotropina exógena, le siguiera una caída secundaria en la secreción de la gonadotropina endógena. Esta caída podría resultar, indirectamente, de la retroalimentación negativa a nivel hipotalámico por el aumento transitorio en los niveles androgénicos plasmáticos producidos por la dosis desensibilizante de hormona " in vivo " y, posiblemente por una acción negativa ultra corta de la gonadotropina exógena para disminuir la secreción pituitaria de LH (262).

Estos estudios han demostrado que las respuestas de células efectoras, luego de la pérdida de receptores inducida por hormonas, atraviesan una serie de cambios que resultan en un proceso conocido como desensibilización. El primer cambio, es la pérdida de respuesta de adenil ciclasa a la hormona, con la consecuente disminución en los niveles de AMP_c intracelulares. La desensibilización inicial de la adenil ciclasa, es una consecuencia inmediata de la ocupación de los receptores y ocurre mucho antes que la verdadera pérdida de receptores. Este proceso ha sido descrito previamente en células luteales del ovario (48) y en células de Leydig testiculares (188).

Las últimas consecuencias de la ocupación de los receptores incluyen la pérdida de los mismos, aparentemente por endocitosis y degradación lisosomal (19) del complejo hormona - receptor (y receptores libres adyacentes), y el daño relacionado con la producción de AMP cíclico y las respuesta distales de la célula efectora que incluyen lesiones en distintas enzimas del camino biosintético de esteroides.

Basándose en todos estos resultados, Calvo y col. (75, 78) enfocaron el estudio de la acción de la hormona luteini-

zante sobre la célula de Leydig, investigando el efecto que tendrían varias dosis de gonadotrofina sobre el proceso de desensibilización. Motivó ese estudio el hecho de que una de las pruebas de funcionalidad testicular, realizada en pacientes con síndrome de testículo criptorquídico o no descendido, consiste en la inyección de múltiples dosis de gonadotrofina coriónica humana, a diferentes intervalos, midiendo posteriormente la concentración plasmática de testosterona. Si este proceso de desensibilización ocurre en el ser humano, se presentó la pregunta acerca de qué sucedería en estos casos donde dosis masivas de gonadotrofina son suministradas repetidas veces.

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

Los resultados obtenidos demuestran que la administración de hCG disminuye el número de sitios receptores y que una segunda dosis administrada en el momento de restauración de la población de receptores vuelve a ocasionar una disminución en la capacidad de unión de gonadotrofina. Vale decir que el tratamiento con dosis elevadas de hCG siempre produciría una disminución en el número de sitios receptores, quizás

como parte del mecanismo de acción de esta hormona.

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

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

estimular la biosíntesis esteroidea a niveles supranormales.

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

Todos estos datos, tomados en conjunto, permiten suponer que la primera dosis de hCG actuaría como dosis desensibilizante, mientras que la segunda administración de gonadotrofina desencadenaría una respuesta supramáxima en lo que a producción de testosterona se refiere, revirtiendo el bloqueo enzimático provocado por la primera inyección. El mecanismo por el cual esta segunda dosis de hormona sería capaz de revertir el proceso de desensibilización esteroideogénica, manteniendo la inhibición a nivel de la adenilato ciclase, está aún por ser dilucidado.

Acción de la prolactina sobre la función gonadal

En los mamíferos, la prolactina (PRL) se halla estrechamente relacionada a la función reproductiva. Este hecho ha

sido plenamente establecido en la hembra, en la que las acciones de la prolactina tienen lugar a tres niveles distintos :

- 1) Sinergismo con la LH en la estimulación de la producción de progesterona en las células luteales.
- 2) Sinergismo con los esteroides gonadales en el desarrollo y manutención de la glándula mamaria.
- 3) A nivel hipofisiario, regulando la secreción de LH.

En el macho, el papel de la PRL ha sido considerablemente menos estudiado; sin embargo, en los últimos años se ha acumulado una cantidad considerable de evidencias indicando profundos efectos de dicha hormona sobre la función sexual. Estos efectos parecerían verificarse en los tres niveles mencionados en el caso de la hembra, es decir, sinergismo con la LH y con los esteroides gonadales y sobre la secreción hipofisiaria de LH.

Bartke y col. demostraron que en ratas hipofisectomizadas, la PRL actuaba sinérgicamente con la LH en la incorporación de ^{14}C -acetato a testosterona y en la restauración de los niveles plasmáticos de andrógenos (163, 164). Estos resultados fueron parcialmente corroborados por Johnson (204), quien además demostró la existencia de ritmos diarios de sen-

sibilidad del testículo al estímulo conjunto de ambas hormonas.

Por otra parte, la demostración por Charreau y col. (101) de receptores específicos para PRL en el tejido intersticial confirmaría la suposición de que dicho tejido es un efector normal de la PRL.

No obstante, el efecto más evidente de la PRL en el macho es el que ejerce sobre el desarrollo y manutención de los órganos sexuales accesorios (29). En ratas inmaduras, el peso de estos órganos, aumentó significativamente cuando se elevaron sus niveles de PRL mediante un implante de hipófisis en la cápsula suprarrenal (247).

Estas observaciones sobre el efecto aparentemente estimulatorio de la PRL sobre la función sexual se contraponen, sin embargo, con las efectuadas en animales en los que se inducen niveles extremadamente elevados de esta hormona.

Además, en el hombre, la hiperprolactinemia se halla frecuentemente asociada a hipogonadismo, con pérdida de la libido, impotencia y bajos niveles séricos de testosterona (141, 342).

Sin embargo, la elevación moderada de los niveles de PRL, por tratamiento con antagonistas dopaminérgicos, produjo un incremento en la respuesta de testosterona a la hCG (4, 237). Esta última observación concordaría con el hallazgo de una correlación entre el ritmo de secreción de testosterona y el de PRL en sujetos normales (298, 299).

En cuanto a la posible acción sobre el metabolismo de andrógenos, diferentes autores han demostrado efectos inhibitorios (251), estimulatorios (364) o nulos (217), según el modelo experimental, la dosis y el origen de la hormona utilizada.

Este último hecho resalta la importancia fundamental de la fuente de hormona, ya que la actividad biológica, como así también el tipo de efectos laterales, varía considerablemente de una especie a otra. Esto ha sugerido la necesidad de reconsiderar los efectos de la PRL mediante variaciones de los niveles de la hormona endógena.

La secreción de PRL por las células acidófilas de la hipófisis se halla principalmente bajo el control inhibitorio del sistema dopaminérgico hipotalámico. Debido a ello, se han usado antagonistas dopaminérgicos, tales como la sulpirida y

la pimocida, o agonistas de la dopamina tales como la bromocriptina, con el objeto de inducir hiperprolactinemia o de suprimir la secreción de PRL respectivamente. Aún cuando no pueden descartarse acciones laterales para estas drogas, su administración constituye modelos sumamente útiles para estudiar los efectos de la PRL.

Alteraciones reproductivas en el estado diabético

La diabetes produce innumerables trastornos sexuales y reproductivos tanto en machos como en hembras de distintas especies estudiadas. Diversos resultados experimentales demostraron claramente una disminución de la capacidad esteroidogénica de las células de Leydig en ratas diabéticas, evidenciado por los bajos niveles plasmáticos y testiculares de testosterona (340). El tratamiento sustitutivo con insulina produjo una recuperación parcial de los niveles plasmáticos de testosterona.

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

testosterona, en respuesta a la acción de gonadotropina exógena, fue diferente en testículos de animales normales y diabéticos. Así, en los animales diabéticos, la producción androgénica fue inferior a la de los animales controles. Concomitantemente con esta reducción en la capacidad biosintética testicular, se produjo en las ratas diabéticas, una disminución en el número de receptores para LH.

Además de estas fallas, Calvo y col. (76) observaron que las actividades de las enzimas generadoras de NADPH, cofactor indispensable para varios pasos esteroideogénicos, estaban disminuídas en el estado diabético, y la producción de andrógenos se recuperaba sólo parcialmente con el agregado de NADPH exógeno. Más aún, se describió una lesión a nivel de la 17-hidroxilasa testicular que no era revertida por insulina (75).

Influencia de las hormonas tiroideas sobre el testículo

La función endócrina de las células de Leydig del testículo está regulada por las acciones aguda y a largo plazo de la LH y está modulada por los efectos sinérgicos de FSH, PRL y hormona de crecimiento (GH), entre otras.

Por otra parte, la glándula tiroides, por acción de la hormona tirotrófica hipofisiaria (TSH), secreta principalmente las hormonas tiroideas triiodotironina (T_3) y tetraiodotironina (T_4) que regulan el metabolismo de casi todas las células del organismo.

Desde principios de siglo, cambios macroscópicos en la tiroides fueron asociados con procesos reproductivos anormales. Tales casos incluyen el cretinismo, la tirotoxicosis y el mixedema. Sin embargo, los intentos por relacionar desviaciones menores de la condición normal o eutiroidea a fertilidad, y los intentos por corregir la fertilidad subnormal con la terapia con hormonas tiroideas, condujeron a resultados contradictorios que aún hoy generan controversias entre distintos grupos de trabajo.

En los párrafos siguientes se presentan, brevemente, algunas observaciones realizadas en el caso de una función tiroidea alterada sobre los procesos reproductivos del macho.

Hipotiroidismo

La deficiencia de hormonas tiroideas va acompañada por alteraciones morfológicas y funcionales en el eje hipofisario

gonadal (348). Sin embargo, desde los primeros trabajos de Hammet (170) en 1923, hasta la fecha, se describieron numerosos resultados contradictorios respecto a los efectos del hipotiroidismo sobre los niveles de hormonas hipofisarias séricas, secreción de andrógenos y en los pesos de los órganos del sistema reproductivo (93, 94, 329, 362). Entre otros, Baksi y col. (32) y Bruni y col. (67) informaron bajas concentraciones séricas de LH y testosterona, mientras que Kalland y col. (206) no observaron diferencias en estos parámetros entre animales eutiroides e hipotiroides.

Mucha de la controversia en la literatura puede ser atribuída a la variabilidad de los métodos usados para alterar el estado tiroideo normal. Hay tres formas de lograr el hipotiroidismo experimental : la tiroidectomía quirúrgica, la radioiodotiroidectomía y el tratamiento con goitrógenos (tiourea, tiouracilo, metiltiourea, propiltiouracilo y metilmercaptoimidazol). Aunque los resultados obtenidos por los distintos métodos son considerados equivalentes y representativos de animales hipotiroides (347), se observaron diferencias significativas con los tratamientos y niveles de goitrógenos diferentes. También hay que tener en cuenta, entre

otros parámetros, la edad de los animales, el tiempo de tratamiento y la certeza de la remoción o destrucción completa del tejido tiroideo.

Hipertiroidismo

De la misma manera que en el hipotiroidismo, hay varios trabajos del efecto del hipertiroidismo experimental sobre la función testicular, con los cuales no se puede llegar a conclusiones firmes ya que son contradictorias, pues se ha observado estimulación (15, 98), inhibición (108, 356) o ningún cambio (192) en los testículos de varias especies.

Entre los estudios más recientes, un grupo de trabajo demostró que el tratamiento con T_3 no indujo cambios en los niveles séricos de LH o FSH (185) mientras que otro grupo observó disminución en la LH pero no en la FSH (186).

Por su parte Schneider y col. (310), tratando a ratas machos adultas con T_4 , mostraron una disminución de aproximadamente 40 % en la FSH pero una caída no significativa de la LH sérica. La declinación en los niveles de FSH sería consistente con una espermatogénesis y actividad del epitelio germinal disminuídas (328).

Estos mismos autores (310) describieron un aumento de síntesis de testosterona a partir de pregnenolona " in vitro " sugiriendo un efecto directo de la T_4 sobre el testículo, tal vez estimulando la 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Las contrastantes diferencias en los resultados obtenidos por los distintos grupos de trabajo podría deberse a las distintas hormonas tiroideas usadas, dosis empleadas o forma de administración de las mismas, o bien a las distintas cepas de animales utilizadas en los estudios.

Sitios de acción sobre la función testicular

Las observaciones resumidas en las secciones precedentes demuestran que la función testicular, posiblemente esté regulada por un amplio rango de concentración de hormonas tiroideas. Sin embargo, la naturaleza de la relación tiroides - testículo y los mecanismos por los cuales las hormonas tiroideas influyen la gónada masculina no están claros hasta el presente.

OBJETIVOS DE LA PRESENTE INVESTIGACION

El objetivo del presente trabajo de Tesis fue el estudio de algunos mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la síntesis de testosterona por las células de Leydig.

Se enfocó la investigación sobre las posibles fuentes de provisión del colesterol, precursor obligatorio en la esteroidogénesis, ya sea el que es transportado por las lipoproteínas plasmáticas, como así también el que proviene de la biosíntesis de novo intracelular.

Se dio especial atención a la HMG-CoA reductasa, enzima regulatoria del camino biosintético, y se estudió su modulación por diversos factores y en distintas condiciones experimentales.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES UTILIZADOS

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, variedad Wistar), adultas (aproximadamente de 60 días de edad), salvo especificación en contra.

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

TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES

Obtención de animales desensibilizados y resensibilizados por hCG .

A los animales se les inyectó con una dosis subcutánea de hCG (200 UI/rata, equivalente a 10 ug) (Endocorion, Elea), o con una dosis de hCG (2 ó 10 ug) (Pregnyl, Organon) según correspondiera, que fueron utilizadas como dosis desensibilizantes, o con una segunda dosis de la misma hormona (200 UI/rata) a los dos días posteriores a la primera inyección, definida como dosis resensibilizante.

Luego de este tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación a las 72 horas de la primera o segun

da inyección respectivamente, a menos que se especifique otra cosa. La sangre se utilizó para la determinación hormonal correspondiente.

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

Tratamiento con 4-APP

La droga 4-aminopirazolopirimidina (4-APP) (Sigma) fue administrada intraperitonealmente como una suspensión en fosfato de sodio 10 mM (pH = 3,5) (27) en una dosis de 50 mg/Kg de peso corporal por día durante 3 días. El 4-APP inhibe la liberación de lipoproteínas transportadoras de colesterol desde el hígado hacia la sangre provocando una considerable disminución en los niveles plasmáticos de colesterol.

Durante el tratamiento, los animales tuvieron libre acceso al agua, suplementada con cloruro de sodio 1 % (P/V) y glucosa 2 % (P/V), y fueron alimentados con una dieta balanceada. Las ratas controles fueron mantenidas de la misma forma e inyectadas con vehículo (fosfato de sodio 10 mM, pH = 3,5).

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación 24 horas después de la última inyección.

Se recolectó la sangre, se le permitió coagular y el suero obtenido se utilizó para diversos ensayos.

Tratamiento con prolactina, bromocriptina y sulpirida

En todos los casos se utilizaron ratas machos de 30 días de edad y los tratamientos se prolongaron durante 9 días en forma de inyecciones subcutáneas.

Los animales se sacrificaron por decapitación aproximadamente 16 horas después de la última inyección. Se recogió la sangre y el suero obtenido se utilizó para los ensayos hormonales correspondientes.

Prolactina: Se usó prolactina ovina (NIH PS-12) (oPRL), disuelta en solución salina (NaCl 0,9 % P/V) ajustada a pH = 8 con NaOH 0,1 M.

Las distintas dosis utilizadas para los experimentos (50, 250 y 500 ug/rata/día) se dividieron en dos inyecciones de 0,1 ml administradas a las 10.00 y 18.00 hs. Los animales

controles recibieron solución salina.

Bromocriptina: Con el fin de suprimir la liberación de prolactina, los animales fueron tratados con mesilato de 2-bromo- α -ergocriptina, (CB - 154, Sandoz) (bromocriptina), agonista dopaminérgico que inhibe la secreción hipofisaria de dicha hormona (140). La bromocriptina, previo agregado de igual cantidad de ácido tartárico, fue disuelta en etanol 70 % - solución fisiológica (30:70 v/v) y se administró a razón de 3 mg/Kg de peso/día, en dos dosis. Los controles fueron inyectados con vehículo.

Sulpirida: El sulfato de sulpirida fue obtenido comercialmente (Vipral, Roemmers) y se inyectó en una dosis de 43 mg/Kg de peso/día. La droga es un antagonista dopaminérgico que aumenta la liberación de prolactina.

Obtención de animales diabéticos

La diabetes se produjo mediante la inyección de estreptozotocina (lot.60140, Upjohn Co), (droga que destruye selectivamente las células beta del páncreas), por vía endovenosa, en una dosis de 65 mg/Kg de peso corporal. La droga se preparó en solución salina, acidificada con unas gotas de ácido cí

trico 0,025 M hasta ajustar el pH a 4,5.

Tres días después de la inyección de estreptozotocina, se midió la glucosa en sangre utilizando tiras reactivas Des-trotix. El éxito del tratamiento se evaluó siguiendo la apari-ción de hiperglucemia.

Los animales se utilizaron 30 días después de la inyec-ción de la droga.

Obtención de animales hipotiroideos e hipertiroideos

En todos estos lotes se utilizaron ratas machos de 20-25 días de edad.

El hipotiroidismo experimental fue logrado inyectando intraperitonealmente una dosis de ^{131}I Na (CNEA) de 200 uCi di-suelto en 0,5 ml de solución fisiológica. Después de 30 días, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se recolectó la sangre por punción cardíaca para diversas de-terminaciones hormonales.

Los experimentos de hipertiroidismo se realizaron con ratas inyectadas durante 30 días con una dosis diaria subcu-tánea de 30 ug de T_4 disuelta en KOH 0,3 M y llevada a volumen con solución fisiológica. Los animales fueron sacrificados

por decapitación 24 horas después de la última inyección y se recolectó la sangre. Los controles fueron inyectados con solu
ción fisiológica.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE CELULAS DE LEYDIG

Se utilizó la técnica descrita por Mendelson y col. (255), utilizando colagenasa (Worthington) para la dispersión del tejido tubular.

Los testículos descapsulados, colocados en tubos de plástico (Falcon) (seis testículos por tubo), fueron suspendidos en Medio 199 (Difco Co.), en la relación : 1 testículo por ml de medio, conteniendo 1 mg de colagenasa/ml. La incuba
ción se realizó a 37°C, durante 25 minutos, en un incubador metabólico tipo Dubnoff, bajo atmósfera de carbógeno ($O_2 = 95$ %, $CO_2 = 5$ %), con agitación constante.

Finalizada la incubación, la reacción se detuvo por di
lución 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, deján
dolo reposar otros 3 minutos. Cuando los túbulos hubieron decantado, el sobrenadante fue aspirado con una jeringa de plás
ta.

tico y filtrado a través de una malla de nylon, recogién^{do}se el líquido filtrado en otro tubo de plástico. La resuspensión se repitió una vez más y el líquido filtrado se juntó con el anterior.

Este filtrado, conteniendo las células intersticiales, se centrifugó a 700 x g, durante 10 minutos. El precipitado así obtenido se resuspendió en Medio 199, en la relación tes título/medio adecuada al experimento a realizar.

Cuando fue necesario, las células fueron purificadas a través de un gradiente de metrizamida (Nyegaard and Co.) según la técnica descrita por Conn y col. (91).

A partir de una solución de metrizamida en Medio 199, 80 % (p/v), se prepararon soluciones de las siguientes con centraciones : 36, 32, 28, 24, 22, 20, 18 y 16 % colocadas respectivamente, en tubos de plástico de 50 ml de capacidad. Las células, resuspendidas en 5 ml de Medio 199, fueron colocadas en la parte superior del gradiente y los tubos fueron centrifugados a 7.000 rpm durante 10 minutos, a 4°C, en una centrifuga Sorvall.

Finalizada la centrifugación, se individualizaron 4 bandas de células, denominadas 0, IA + IB, II y post-glóbulos

rojos de acuerdo con lo encontrado por Payne y col. (278).

Cuando el objetivo del experimento no fue la investigación de sub-poblaciones de células de Leydig, las células intersticiales fueron purificadas a través de un colchón de metrizamida 11 %.

CUANTIFICACION CELULAR

Se utilizaron 2 técnicas distintas para la determinación del número de células.

a) Se midieron 50 ul del preparado crudo de células intersticiales resuspendidas en Medio 199, y se tiñeron 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 de Neubauer.

b) Las células de Leydig purificadas por metrizamida se cuantificaron según la técnica histoquímica para 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (281) como se detalla a continuación:

100 ul de dehidroepiandrosterona (5 mg/ml en propilén glicol).

100 ul de hCG (Endocorion) (1000 UI/ml en buffer Dulbe

cco).

400 ul de p-NO₂-azul de tetrazolio (Sigma) (4 mg/ml en buffer Dulbecco).

200 ul de β -NAD (Sigma) (16 mg/ml en buffer Dulbecco).

400 ul de suspensión celular (agregados al final).

Esta mezcla se incubó a 34°C durante 1 hora y una alícuota se contó al microscopio. Las células teñidas de azul corresponden a células de Leydig.

INCUBACIONES CON CELULAS DE LEYDIG AISLADAS

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

La incubación se realizó durante 3 - 4 horas, a 34°C, en un incubador Dubnoff, bajo atmósfera de carbógeno y con agitación constante.

Finalizada la incubación, el medio de incubación fue centrifugado a 1.000 rpm, durante 10 minutos. El líquido sobrenadante se destinó a la determinación de hormonas esteroi-des y AMP cíclico.

CELULAS DE LEYDIG EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE TESTOSTERONA

Para determinar la pregnenolona acumulada en condiciones basales y durante la estimulación con gonadotrofinas, las células de Leydig se incubaron con dos inhibidores del metabolismo de pregnenolona : cianocetona (Upjohn Co.) 10^{-6} M y spironolactona (G-D. Searle and Co.) 10^{-5} M. Ambos inhibidores se agregaron 20 minutos antes que la gonadotrofina. Las muestras se incubaron durante 3 horas a 34°C, bajo atmósfera de carbógeno. Finalizada la incubación, las células se centrifugaron 10 minutos a 1.000 rpm y los sobrenadantes se usaron para la determinación hormonal.

DETERMINACION DE TESTOSTERONA

El dosaje de testosterona se realizó mediante la utilización de un suero anti-testosterona, previamente obtenido por inmunización activa de conejos, a intervalos de dos semanas, con un conjugado de testosterona-albúmina sérica bovina (BSA), preparado por acoplamiento de la carboxi-metil-oxima de la testosterona a BSA. El suero anti-testosterona utilizado, poseía una constante de afinidad de 10^{10} M^{-1} y se utilizó

en una dilución apropiada (1:2.500) para ligar el 50 % de la ^3H -testosterona de referencia (aproximadamente 10.000 cpm).

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

La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman.

Testosterona sérica

Una vez obtenida la sangre de los animales, se le permitió coagular y el suero se separó para la determinación hormonal. Una alícuota de este suero fue extraída dos veces con 5 ml de éter etílico (Merck).

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

Testosterona del medio de incubación

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

DETERMINACION DE PREGNENOLONA

La pregnenolona de los medios de incubación correspondientes, se dosó por radioinmunoensayo por el método de Di Pietro y col. (116) utilizando un antisuero específico.

El rango de utilidad de la curva, las condiciones de incubación y el método de separación de la hormona libre fueron idénticos a los descritos para el dosaje de testosterona.

DETERMINACION DE AMP CICLICO

Para el dosaje de este nucleótido cíclico, se utilizó la técnica de Brown y col. (58).

Aislamiento de la proteína quinasa de adrenal bovina

Luego de la separación de la médula, las cortezas de glándulas adrenales bovinas, fueron homogeneizadas, utilizan-

do un homogeneizador tipo Polytron (Brinkmann), a 0°C, con 1,5 volúmenes de buffer Tris-HCl, 50 mM, pH = 7,4, conteniendo sacarosa, 0,25 M; KCl, 25 mM y MgCl₂, 5 mM. Este homogenato se centrifugó a 2.000 x g durante 5 minutos y el sobrenadante se recentrifugó a 5.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante de esta última centrifugación se guardó, en alícuotas de 0,5 ml, a -20°C. Esta preparación fue descongelada y diluída con el buffer de ensayo (Tris-HCl, 50 mM, pH = 7,4 conteniendo teofilina, 8 mM y 2-mercaptcetanol, 6 mM). Este buffer se utilizó en todos los pasos posteriores.

Ensayo para la determinación de AMP cíclico

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

La incubación se realizó a 4°C, durante 90 minutos. Finalizada la incubación, el AMP cíclico libre se separó por el agregado de 0,2 ml de una suspensión de carbón-BSA (Sigma,

Fracción V) (500 mg de carbón : 100 mg de BSA, para 10 ml de buffer de ensayo).

La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman, utilizando tolueno centelleante, conteniendo 30 % V/V de tritón X-114.

AMP cíclico del medio de incubación

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

MARCAACION DE HORMONAS PROTEICAS

Se utilizaron 2 métodos distintos : con lactoperoxidasa, descrito por Thorell y Johansson (341) y modificado en nuestro laboratorio, y con cloramina T (33). En todos los casos se usó como trazador ¹²⁵I libre de portador (New England Nuclear, NEZ - 033 - A).

αLH, hCG y hGH

Estas 3 hormonas se marcaron con lactoperoxidasa (Cal-

biochem, grado B) según se indica a continuación.

- 1) Buffer fosfato, 0,5 M, pH = 7,4 (10 ul).
- 2) ^{125}I Na, en NaOH 0,1 M, 500 uCi (5 ul).
- 3) Proteína a marcar, 10 ug (10 ul) (en fosfato 0,05 M, pH = 7,4).
- 4) Lactoperoxidasa, 2,7 mg/ml en buffer fosfato 0,5 M, pH = 7,4 (10 ul).
- 5) H_2O_2 (Atanor, 300 volúmenes, diluída 1:10.000 en agua bidestilada) (10 ul).

Después de agitar vigorosamente durante 2 minutos, la mezcla de iodinación fue diluída con 200 ul de buffer fosfato 0,05 M y transferida a una columna de Sephadex G-75, previamente equilibrada con el buffer de elución utilizado para los ensayos de hormonas proteicas (fosfato de sodio 0,05 M, cloruro de sodio 0,1 M, azida sódica 0,05 %, BSA 0,2 %, pH = 7,4).

Separado el pico hormonal del iodo libre, las fracciones correspondientes a las hormonas se controlaron mediante ensayos de unión a receptores de tejidos efectores, o por su actividad inmunológica según se necesitase. Las ^{125}I -hormonas se fraccionaron en alícuotas que se guardaron congeladas has-

ta su uso a -70°C . Las actividades específicas obtenidas fueron usualmente 40 - 50 uCi/ug.

rTSH

Para iodinar esta hormona proteica se utilizó el método de cloramina T según se detalla.

- 1) Hormona (disuelta en bicarbonato de sodio 0,01 M a concentración final de 200 ug/ml), 5 ug (25 ul).
- 2) Buffer fosfato, 0,5 M, pH = 7,4 (25 ul).
- 3) $^{125}\text{I}\text{Na}$ 500 uCi (5 ul).
- 4) Cloramina T (10 mg/ml en buffer fosfato 0,05 M, preparada inmediatamente antes de su uso) (10 ul).

Después de una agitación suave durante 60 segundos se detuvo la reacción por el agregado de 25 ul de metabisulfito de sodio (25 mg en 10 ml de buffer fosfato 0,05 M). Se agregó luego 100 ul de solución de transferencia (100 mg de KI y 0,8 g de sacarosa, en 10 ml de agua destilada) y el contenido del tubo de marcación fue pasado a la columna de separación (Bio-gel P60, 100 - 200 mesh, en fosfato 0,05 M, equilibrada con buffer fosfosalino - EDTA 0,05 M - BSA 2 %). El buffer de corrida fue fosfato 0,05 M. Con estas columnas se obtuvo una

buena separación entre la hormona marcada y el ^{125}I libre.

A la ^{125}I -TSH así eluída, se le dosó su actividad radioinmunológica, se la fraccionó y congeló a -70°C hasta su uso.

La actividad específica fue 50 - 100 uCi/ug.

RADIOINMUNOENSAYO DE HORMONAS PROTEICAS

En todos los casos se utilizó el radioinmunoanálisis por doble anticuerpo (229). Las muestras fueron evaluadas por duplicado en alícuotas que oscilaban entre 20 y 150 ul de suero de rata.

Las muestras se cuantificaron usando los reactivos provistos por NIAMDD (NIH - USA).

Los protocolos de trabajo fueron los mismos para las dos hormonas estudiadas : LH y TSH, y se desarrollaron de la siguiente manera : el primer día se agregó el primer anticuerpo a los sueros preparados; luego de una incubación de 24 horas a 4°C , se agregó la hormona trazadora : el tercer día, el segundo anticuerpo, y luego de 48 a 72 horas (siempre a 4°C) se separó la hormona libre de la unida por centrifugación. Se aspiró el sobrenadante y se contó la radiactividad en los pre

citados, correspondiente a los complejos hormona-anticuerpo, en un contador gamma automático Beckman.

Hormona luteinizante

En este caso, la LH no sólo se dosó en sueros sino también en hipófisis de ratas de acuerdo a métodos descritos (330). Para ello las hipófisis fueron homogeneizadas en agua destilada y centrifugadas a 12.000 rpm, durante 30 minutos. Del sobrenadante se tomaron alícuotas adecuadas para las determinaciones. Se usó el método heterólogo desarrollado por Niswerder y col. (274). La hormona trazadora fue oLH. Como primer antisuero se utilizó el obtenido a partir de inmunización de conejos con oLH emulsionada en adyuvante de Freund completo. Las diluciones de trabajo fueron 1:20.000 a 1:25.000. Como preparación de referencia se utilizó la LH purificada de hipófisis de rata (NIAMDD rat LH RP1). La curva patrón se extendió de 7,8 a 100 ng por tubo.

Tirotrófina

La hormona trazadora fue TSH de rata (NIAMDD rat TSH 1 - 4). El primer antisuero fue obtenido en conejos contra

TSH (anti rat-TSH-S-5) siendo la dilución de trabajo de 1: 7.000 a 1:9.000. El standard de referencia fue TSH purificada de rata (rat TSH RP1) y la curva patrón se extendió de 3,9 a 1.000 ng por tubo.

RADIOINMUNOENSAYO DE HORMONAS TIROIDEAS

Las concentraciones de T_3 y T_4 séricas se determinaron por radioinmunoanálisis utilizando reactivos provistos por Diagnostic Products Corporation (DPC). Los valores de T_3 se expresaron en ng/100 ml, con una sensibilidad del ensayo de 10 - 20 ng; en tanto los valores de T_4 se expresaron en ug/100 ml con una sensibilidad del orden de 0 - 1 ug.

UNION DE HORMONAS PROTEICAS A CELULAS DE LEYDIG

Las células obtenidas por tratamiento con colagenasa, fueron incubadas en 0,5 ml de PBS, con cantidades variables de hormona radiactiva (20.000 - 200.000 cpm/tubo) y hormona fría constante (para calcular la unión inespecífica) o buffer.

La incubación se efectuó a 24°C, durante toda la noche (aproximadamente 20 horas) y se detuvo por dilución con 2 ml de PBS frío. Luego de la centrifugación de los tubos, se de-

terminó la radiactividad del precipitado, utilizando un contador gamma automático, Beckman.

AISLAMIENTO Y MARCACION DE LIPOPROTEINAS PLASMATICAS

Las lipoproteínas humanas se prepararon a partir de plasma, recogido en EDTA 1 %, de hombres sanos, en ayunas durante 15 horas. Se aislaron lipoproteínas de baja densidad (LDL) ($d = 1,019 - 1,063$) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) ($d = 1,090 - 1,215$) por flotación secuencial en una ultracentrífuga Beckman con un rotor de titanio 50.1, a $214.000 \times g$ y a $4 - 10^{\circ}C$ por 16 - 24 horas, de acuerdo a técnicas standard (173) usando KBr para ajuste de la densidad (290). Las fracciones aisladas se dializaron 36 horas a $4^{\circ}C$ contra tres cambios de por los menos 50 volúmenes de buffer conteniendo NaCl 0,15 M y EDTA 0,3 mM (pH = 7,4). Con las fracciones se realizó un electroforesis según la técnica descrita (247), como criterio de pureza.

Se prepararon geles cilíndricos de poliacrilamida con la siguiente composición :

Poros fino : 3 % de acrilamida (gel separador)

Poros grueso : 2,5 % de acrilamida (gel concentrador)

Solución de siembra : muestra previamente teñida con Sudan Black B (en dietilenglicol).

Finalmente las fracciones lipoproteicas se esterilizaron por pasaje a través de filtros Millipore (0.45 μ m) y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Para iodar las lipoproteínas (LDL o HDL), se usó el método del ClI como lo describe Mac Farlane (236) modificado por Bilheimer (44). El ClI se preparó a partir de soluciones de NaI en HCl de NaIO₃ en agua destilada.

Se siguió el siguiente protocolo de marcación :

- 1) Lipoproteína : 0,5-1 ml (1 - 1,2 mg de proteína).
- 2) ¹²⁵I Na en NaOH 0,1 M (NEN) : 60 uCi (15 ul).
- 3) Buffer glicina 1 M, pH = 10 : 50 ul.
- 4) ClI : 50 ul.

Luego de agitar 5 - 10 minutos, la mezcla de iodación se transfirió a una columna de ACA 44 (acrilamida-agarosa) (Ultrogel - LKB) previamente equilibrada con buffer Dulbecco-BSA 1 %, utilizando el mismo buffer para la elución de las muestras.

Tanto para calcular la eficiencia de marcación como pa

ra verificar que las lipoproteínas iodadas separadas por la columna no estuvieran impurificadas con iodo libre, se realizó una cromatografía en papel (Whatman - 3MM), utilizando TCA 0,5 M como solvente de corrida, de acuerdo al método de Ceska y col. (84).

Las lipoproteínas iodadas fueron mantenidas a 4°C hasta su uso.

UNION DE LAS LIPOPROTEINAS A CELULAS DE LEYDIG

Las lipoproteínas marcadas fueron diluidas con LDL o HDL frías (no marcadas) para adquirir la actividad específica deseada (aproximadamente 100 cpm/ng de proteína).

Para evitar problemas entre unión al receptor e internalización, las células de Leydig obtenidas por colageneización se homogeneizaron en 4 volúmenes de NaHCO_3 1 mM, pH = 8 con un homogeneizador tipo Polytron. La suspensión se centrifugó a 600 x g, 5 minutos y el sobrenadante a 12.000 x g durante 30 minutos. Las membranas precipitadas se resuspendieron en 4 volúmenes de buffer Dulbecco (pH = 7,4) y se separaron alícuotas para la determinación de proteínas.

La incubación de lipoproteínas con la preparación de

membranas se realizó en tubos de plástico. El volumen final fue 0,3 ml en buffer Dulbecco (pH = 7,4) que contenía BSA 2 %, 100 - 500 ug de proteína de membrana y cantidades variables de ^{125}I - LDL ó ^{125}I - HDL. Usualmente el tiempo de incubación fue de 1,5 - 2 horas, a 37°C, a menos que se especifiquen otras condiciones. La unión no específica se determinó por el agregado de 100 ug de lipoproteína fría a tubos por duplicado. También se realizó un ensayo a tiempo cero con y sin lipoproteína fría, y la radiactividad se sustrajo a la unión específica.

La incubación se detuvo por el agregado de 2 ml de buffer Dulbecco con BSA 1 % y la separación de la lipoproteína unida al receptor de la libre se realizó de dos formas distintas según conviniese.

a) Se filtró a través de filtros Millipore (0,45 μm) previamente embebidos en BSA 5 %. Los tubos y los filtros se lavaron dos veces con 2 ml de buffer-BSA 1 % y se contó la radiactividad retenida en los filtros.

b) Se centrifugó a 4.000 rpm, 20 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall RC - 5B (rotor HS - 4). Se aspiraron los sobrenadantes, y los precipitados se lavaron en el mismo medio

y luego se contaron en un contador gamma automático.

Cabe aclarar que no hubo diferencias entre los resultados obtenidos por cualquiera de los dos métodos de separación.

DETERMINACION DE LA MAXIMA CAPACIDAD DE UNION DE LAS LIPOPROTEINAS MARCADAS

Para determinar la máxima capacidad de unión (MCU) de las lipoproteínas iodadas se utilizó glándula adrenal de rata (como tejido control) y células de Leydig, que fueron homogeneizadas en NaHCO_3 , 1 mM, pH = 8, como se describió.

Distintas alícuotas de las preparaciones de membranas (50 - 800 ug de proteínas) se incubaron a 37°C, durante dos horas en presencia de 300.000 cpm de lipoproteína marcada.

También se determinó la unión inespecífica como fue especificado.

Se construyó un gráfico de $1 / (\text{radiactividad específica unida})$ versus $1 / (\text{cantidad de proteína agregada})$. De la ordenada al origen fue posible calcular la fracción de lipoproteína que se hubiera unido a concentración infinita de receptor (máxima capacidad de unión) (77).

CALCULO POR AUTODESPLAZAMIENTO DE LAS ACTIVIDADES ESPECIFICAS
DE LAS LIPOPROTEINAS MARCADAS

Se utilizó la técnica descrita por Calvo y col. (77). Se realizaron dos series de experimentos de unión.

En una serie, se equilibraron 100 ug de proteínas de membranas de células de Leydig con diferentes concentraciones de lipoproteínas marcadas (entre 50.000 y 1.000.000 cpm) con el buffer y las condiciones explicadas anteriormente, determinándose también la unión inespecífica.

En la segunda serie, se incubaron 100 ug de proteínas de membranas con 300,000 cpm de ^{125}I - lipoproteínas y diferentes concentraciones de lipoproteínas frías (0 - 50 ug/tubo) en las mismas condiciones experimentales descritas.

Teniendo en cuenta los valores de máxima capacidad de unión obtenidos, y asumiendo que las lipoproteínas fría y radiactiva se comportan de igual modo frente al receptor, se graficaron para ambos experimentos (saturación y competencia) las curvas de libre/unida (L/U) versus cpm agregadas y ng de lipoproteína fría respectivamente.

Para iguales valores de L/U se obtiene el dato correspondiente a la actividad específica de la ^{125}I - lipoproteína

expresado en cpm/ng.

La actividad específica de la ^{125}I - LDL y de ^{125}I - HDL calculado por este método fue de aproximadamente 400 uCi/mg proteína.

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR Y SUBMITOCONDRIAL DE CELULAS DE LEYDIG

Para el fraccionamiento subcelular, las células de Leydig purificadas fueron homogeneizadas inmediatamente en sacarosa 0,25 M, a 4°C, usando un homogeneizador tipo Ultraturrax (IKA-WERK) y después con 10 golpes en un homogeneizador de vidrio. La ruptura celular fue verificada al microscopio óptico.

El homogenato fue centrifugado a 800 x g, durante 10 minutos, a 4°C. El precipitado se resuspendió en sacarosa 0,25 M y fue purificado por centrifugación en sacarosa 2,0 M, a 73.000 x g durante 60 minutos, a 4°C. El precipitado contenía núcleos purificados. La fracción mitocondrial obtenida por centrifugación a 17.000 x g del sobrenadante de 800 x g, fue lavada, resuspendida en 3 ml y colocada sobre un gradiente de sacarosa, discontinuo, formado por capas de 20, 30, 40, 50 y 60 % (P/V) de sacarosa en agua (2ml/capa). La centrifugación

se llevó a cabo en un rotor SW-40 en una ultracentrífuga Beckman (Modelo LS-50) durante 60 minutos a 63.000 x g, a 4°C. Las interfases, previamente diluídas y lavadas en sacarosa 0,25 M, fueron utilizadas para los ensayos enzimáticos.

El sobrenadante de 17.000 x g (30 minutos) fue centrifugado a 105.000 x g durante 60 minutos, a 4°C, para obtener los microsomas (precipitado) y el citosol (sobrenadante). Las fracciones subcelulares de hígado de rata (utilizadas para comparación) fueron obtenidas tal como se describió para células de Leydig.

Las fracciones submitocondriales se obtuvieron según el método de Schnaitman & Greenawalt (309) con ligeras modificaciones.

Las mitocondrias purificadas de la interfase 40 - 50 %, fueron suspendidas en un volumen mínimo de medio de aislamiento (MA) conteniendo : sacarosa 70 mM, manitol 220 mM, buffer Hepes 2 mM, pH = 7,4 y albúmina de suero bovino 0,5 mg/ml. El volumen fue ajustado para dar 100 mg de proteína mitocondrial/ml. Un volumen de la suspensión mitocondrial se agregó a un vial preenfriado y se la agitó suavemente con un agitador magnético, a 0°C. Se adicionó igual volumen de una solución

ción de digitonina (0,6 % en MA) y la agitación se continuó durante 15 minutos.

La purificación de las membranas externas mitocondriales de las células de Leydig se consiguió con una concentración de 0,06 mg de digitonina/mg de proteína. La suspensión mitocondrial tratada con digitonina fue diluída (1 : 4) por el agregado de 3 volúmenes de MA. Esta suspensión fue centrifugada a 10.000 x g durante 10 minutos, a 4°C. El sobrenadante fue extraído cuidadosamente con una pipeta y la fracción sedimentada fue suspendida en MA en la mitad del volumen de la preparación mitocondrial tratada con digitonina. Esta última preparación fue sedimentada nuevamente a 10.000 x g durante 10 minutos, a 4°C y el sobrenadante se combinó con el previamente obtenido. Estos sobrenadantes combinados contienen las membranas externas y las proteínas solubles que, en la mitocondria intacta, están localizadas entre las dos membranas. La fracción enriquecida en membranas externas se obtuvo por centrifugación de los sobrenadantes combinados a 144.000 x g durante 1 hora.

El fluido sobrenadante resultante de esta centrifugación, conteniendo la fracción intermembrana, fue removido con

una pipeta Pasteur y el sedimento de vesículas de membranas externas fue resuspendido en un volumen mínimo de MA.

El precipitado sedimentado a 10.000 x g fue resuspendido en un volumen de MA que diese una concentración de proteínas de 30 - 35 mg/ml. Se agregó un volumen de una solución de Lubrol WX (19 mg/ml) obteniéndose una concentración final de 0,16 mg de Lubrol WX por mg de proteína. Esta mezcla se mantuvo a 0°C durante 15 minutos y, luego, se la diluyó (1:2) con MA. La suspensión fue centrifugada a 144.000 x g durante 1 hora. El sobrenadante, conteniendo las proteínas de la matriz, fue removido y el precipitado, que presentaba la fracción de membranas internas, fue lavado dos veces con pequeñas cantidades de MA. Este sedimento fue suspendido en MA dando una concentración de aproximadamente 10 mg de proteínas/ml.

DETERMINACION DE LA INTEGRIDAD DE LAS MITOCONDRIAS AISLADAS DE CELULAS DE LEYDIG

Los parámetros de medición más importantes de la actividad respiratoria mitocondrial son : el consumo de oxígeno, el control respiratorio y la relación fósforo : oxígeno (P : O).

Para comprobar la viabilidad e integridad de las mitocondrias aisladas de células de Leydig y purificadas en gradiente de sacarosa, se determinaron los tres parámetros mencionados utilizando el método descrito por Boveris y Stoppani (53).

Se midió la respiración mitocondrial con un electrodo de oxígeno (electrodo de Clark) a 30°C en dos condiciones distintas.

- a) Estado de reposo o estado metabólico 4 (respiración controlada) (99) en un medio de incubación (volumen final = 2 ml) que contenía :
- 1) Sacarosa 0,25 M.
 - 2) Buffer fosfato (pH = 7,4) 5 mM.
 - 3) Cloruro de magnesio 2,5 mM.
 - 4) Sustrato : succinato 10 mM o una mezcla de malato 25 mM y glutamato 25 mM.

Se comenzó la medición por el agregado de la suspensión mitocondrial (1 mg de proteínas) en sacarosa 0,25 M.

- b) Estado activo o estado metabólico 3 (respiración activa) (99).

Se utilizó el mismo medio de incubación con el agregado de ADP 125 μ M antes que la suspensión mitocondrial.

En ambos casos se obtuvieron los perfiles de consumo de oxígeno por medio de un graficador automático acoplado. Las velocidades de respiración mitocondrial se midieron en nano átomos gr. de oxígeno por mg de proteína por minuto. La concentración de oxígeno en el medio de reacción se tomó como 0,22 mM (53).

El control respiratorio (CR) se calculó por la relación de pendientes de los gráficos (CR = velocidad en presencia de ADP / velocidad en ausencia de ADP).

También se determinó la relación ADP agregado : oxígeno consumido en el estado activo (relación P : O) (99, 128).

ENSAYOS ENZIMATICOS

HMG-CoA reductasa (E.C 1.1.1.34)

La actividad de la enzima se midió de acuerdo al método de doble isótopo de Shapiro y col. (315).

Las células de Leydig obtenidas por colageneización, o bien se extrajeron con 1 ml de buffer fosfato de potasio 50 mM (pH = 7,4) conteniendo DTT 5 mM, EDTA 5 mM, KCl 0,2 M y

Brij 96 (Sigma) 0,25 % P/V, o se les realizó un fraccionamiento como se describió anteriormente. En el caso de la extracción, después de incubar por 20 minutos a temperatura ambiente, la suspensión se centrifugó 2 minutos a 10.000 x g en una microcentrífuga Beckman. Este tratamiento solubilizó cuantitativamente toda la actividad enzimática. Se incubaron alícuotas del sobrenadante o de cada fracción subcelular (50 - 150 ug de proteínas) en 0,2 ml de una solución que contenía fosfato de potasio 0,1 M, glucosa-6-fosfato (Sigma) 20 mM, 1 unidad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Sigma) y DTT 5 mM (pH = 7,4). Los tubos se preincubaron 10 minutos a 37°C y se comenzó la reacción por agregado de ^3H -DL-HMG-CoA 200 μM (20.000 cpm/nmol (NEN), incubando a 37°C por 30 - 60 minutos. Se paró la reacción por agregado al medio de incubación de 20 μl de HCl 5 N y ^{14}C -mevalonolactona (10.000 - 15.000 cpm) (NEN) para evaluar la recuperación. Los tubos se incubaron 30 minutos más para asegurar la lactonización del mevalonato formado, y después del agregado de sulfato de sodio anhidro, las mezclas fueron extraídas dos veces con 1,5 ml de éter etílico. La mevalonolactona se aisló por cromatografía en capa delgada en el sistema acetona-benceno (1:1) o en tolueno-acetona-áci

do acético (20:10:1) (147). La identificación del producto se realizó en los dos sistemas cromatográficos por medio de un patrón de mevalonolactona marcada.

Los blancos de reacción se incubaron en ausencia de extracto o de NADP.

HMG-CoA sintetasa (E.C 4.1.3.5)

Se usó el método radioquímico descrito por Clinkenbeard y col. (86) para medir la síntesis de ^{14}C -HMG-CoA a partir de ^{14}C -acetil CoA.

La reacción standard contuvo los siguientes componentes en un volumen final de 0,2 ml : Tris-cloruro 0,1 M pH= 8, acetoacetil - CoA 10 μM , EDTA 0,1 mM, MgCl_2 20 mM, 5 - 60 μg de proteínas y ^{14}C -acetil CoA 0,6 mM (12.000 cpm/nmol) (NEN). La mezcla de reacción se preincubó dos minutos a 30°C y se inició la reacción por adición de ^{14}C -acetil CoA. Se sacaron alícuotas a distintos intervalos de tiempo y se colocaron en viales de conteo que contenían 0,3 ml de HCl 6 M. Los viales se calentaron a 95°C durante dos horas y se contó la radiactividad no volátil para determinar la cantidad de ^{14}C -HMG-CoA formada. Los valores para radiactividad ^{14}C no volátil corres

pondientes a tiempo cero, se restaron de los valores de los otros tiempos de incubación.

Para confirmar la identidad del producto formado se realizó una cromatografía en papel usando como solvente n-butanol : ácido acético glacial : agua (5:2:3).

HMG-CoA liasa (E.C 4.1.3.4)

Se siguió la técnica descrita previamente (86). Se midió la conversión catalizada por la HMG-CoA liasa de ^{14}C -HMG-CoA (no volátil cuando se lleva a sequedad a 95°C en HCl 6 M) a su producto volátil : ^{14}C -acetoacetato. La reacción se inició por el agregado de 50 - 100 ug de proteínas a una mezcla de reacción que contenía : 20 umoles de Tris-cloruro, pH 8,2 y 40 nmoles de ^{14}C -HMG CoA (60 mCi/mmol) (NEN) en un volumen final de 0,2 ml..La incubación se realizó a 30°C y se sacaron alícuotas a distintos tiempos que fueron transferidas a viales de vidrio conteniendo 0,2 ml de HCl 6 M. La radiactividad ^{14}C no volátil se determinó como ya se mencionó para el ensayo de la HMG-CoA sintetasa.

Succinato deshidrogenasa (SDH) (E.C 1.3.99.1)

Se ensayó de acuerdo al método desarrollado por

Pennington (283).

Las fracciones subcelulares y submitocondriales de células de Leydig e hígado de rata se resuspendieron en buffer fosfato 50 mM (pH = 7,4) y se incubaron a 37°C durante 15 minutos en presencia de INT (Sigma) 0,1 %, sacarosa 25 mM y succinato 50 mM. Se paró la reacción por el agregado de TCA 10 % y se extrajo el formazán (complejo coloreado) con 4 ml de acetato de etilo.

Se midió la absorbancia a 490 nm (coeficiente de extinción molar del formazán en acetato de etilo = $20,1 \times 10^3$).

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-P DH) (E.C 1.1.1.49)

Todas las fracciones en estudio se resuspendieron en buffer Tris-HCl 50 mM, pH = 7.5 conteniendo KCl 25 mM, sacarosa 0,25 M y MgCl₂ 17 mM.

La G-6-P DH se ensayó de acuerdo al método de Calvo y col. (76) midiendo el cambio en la absorbancia a 340 nm. La mezcla de reacción contenía NADP $3,3 \times 10^{-4}$ M y D-glucosa-6-fosfato $6,6 \times 10^{-4}$ M y una dilución adecuada de cada fracción subcelular.

Monoamino oxidasa (MAO) (E.C 1.4.3.4)

Esta enzima se ensayó como lo describió Vacas (349). Las distintas fracciones submitocondriales se homogeneizaron en buffer fosfato 10 mM (pH = 8,2) y alícuotas de 50 ul se incubaron durante 30 minutos a 37°C en presencia de 0,15 mM de bioxalato de ¹⁴C-serotonina (0,1 uCi/alícuota - NEN). Luego de detener la reacción con 50 ul de HCl 2 N, se extrajeron los productos obtenidos con 500 ul de acetato de etilo y se lavaron con 100 ul de HCl 0,3 N. La radiactividad presente en alícuotas de 250 ul de la fase orgánica se midió por espectrometría de centelleo líquido, luego del agregado de solución de tolueno centelleante.

Malato deshidrogenasa (MDH) (E.C 1.1.1.37)

La actividad de malato deshidrogenasa se midió siguiendo el cambio de densidad óptica a 340 nm (127). La mezcla de reacción contenía : buffer glicina-NaOH 0,12 M, pH = 10; malato 0,85 M (pH = 7,5) y NAD 37,5 mM (pH = 6,5). Se comenzó la reacción por el agregado de las fracciones en estudio resuspendidas en buffer fosfato 0,5 M (pH = 7,4) (coeficiente de extinción molar del NADH = $6,22 \times 10^6$).

INCORPORACION DE ACETIL-CoA y MEVALONATO A LOS ESTEROLES
PRECIPITABLES POR DIGITONINA

Homogenatos de células de Leydig, fracciones mitocondriales purificadas o citosol se resuspendieron en buffer fosfato 50 mM, pH = 7,4 que contenía NaCl 50 mM, KCl 24 mM y glucosa 4 mM, con 0,1 mM de metil-isobutil xantina (MIX), ami noglutetimida 1 mM y 1 uCi de ¹⁴C-acetil-CoA (50 mCi/mmol, NEN) ó 1 uCi de ¹⁴C-mevalonato (47 mCi/mmol, NEN) en un volumen final de 1,2 ml. Se incubó durante 2 horas a 34°C y se paró la incubación con el agregado de 0,5 uCi (44 Ci/mmol, NEN) de ³H-colesterol y 2 ml de acetona : etanol (1:1).

Después de la homogeneización en el solvente orgánico, los tubos se centrifugaron a 25.000 rpm durante 15 minutos. Se tomaron alícuotas del extracto y se saponificaron con KOH 9 M por 2 horas a 40°C, seguido por la adición de 0,5 ml de acetona : etanol (1:1). Luego se acidificó la mezcla con áci do acético 10 % y se agregaron 100 ug de colesterol y 1 ml de solución de digitonina (al 0,5 % en etanol 55 %). Se incubó toda la noche a temperatura ambiente, se centrifugó y se lavó el precipitado con 2 ml de acetona : éter (1:2) y después con 2 ml de éter. Se resuspendió el precipitado en 0,1 ml de agua

y se disolvió en 0,5 ml de " Solubilizer " (Amersham) y tolueno centelleante. Finalmente se midió la radiactividad en un contador de centelleo líquido. Se realizaron incubaciones en paralelo en el mismo buffer y en ausencia de extractos para medir los blancos de reacción.

PRODUCCION DE PREGNENOLONA EN PRESENCIA DE ACETATO Y MEVALONATO EXOGENOS

Se preincubaron aproximadamente $2 \cdot 10^6$ células de Leydig resuspendidas en Medio 199 durante 30 minutos a 37°C, en presencia de cianocetona y spironolactona para inhibir el metabolismo de pregnenolona como ya se mencionó. Luego se agregaron 100 ug de acetato de sodio o mevalonolactona (ésta última preincubada en NaHCO_3 100 mM a 24°C, 15 minutos) y se continuó la incubación dos horas a 37°C en presencia de una dosis estimuladora supramáxima de hCG. La producción de pregnenolona, se midió por radioinmunoensayo.

AISLAMIENTO DE FACTORES MODULATORIOS INTRACELULARES DE LA HMG-CoA REDUCTASA

Se realizó una purificación parcial de un activador y

un inhibidor de la actividad de la HMG-CoA reductasa, a partir de hígado y células de Leydig de rata de acuerdo a métodos descriptos (275).

A las fracciones citosólicas (sobrenadantes de 105.000 x g) se les agregó acetona fría hasta una concentración final de 54 ml/100 ml de citosol y se las centrifugó recuperándose el precipitado y el sobrenadante.

Fracción precipitada: se homogeneizó con buffer TEDKS y se agregó sulfato de amonio hasta 40 % de saturación, se centrifugó y posteriormente se resuspendió el precipitado en buffer TEDKS. Esta fracción se utilizó como " inactivador citosólico " (reductasa quinasa) (RK).

Fracción sobrenadante : se agregó acetona fría hasta una concentración final de 97 ml/100 ml de citosol original, se centrifugó, se homogeneizó el precipitado en buffer PEDS, se volvió a centrifugar, se agregó al sobrenadante sulfato de amonio hasta 40 % de saturación, se centrifugó y finalmente se resuspendió el precipitado en buffer PEDK. Esta fracción se utilizó como " activador citosólico " (fosfatasa) (F).

Todas las fracciones se dializaron 4 horas contra buffer PEDK y las centrifugaciones se realizaron a 12.000 x g

durante 10 minutos.

Soluciones buffer usadas

PED : fosfato 50 mM (pH = 7,4), EDTA 1 mM y DTT 5 mM.

PEDK : PED más cloruro de potasio 0,3 M.

PEDS : PED más sacarosa 0,25 M.

TEOKS: Tris-cloruro 40 mM (pH = 7,5), EDTA, DTT, cloruro de potasio y sacarosa en las concentraciones mencionadas.

INCUBACION DE FRACCIONES SUBCELULARES DE CELULAS DE LEYDIG E HIGADO EN PRESENCIA DE FACTORES MODULATORIOS INTRACELULARES

La fracción mitocondrial purificada de células de Leydig y los microsomas de hígado se resuspendieron en buffer PEDK y se preincubaron en presencia de ATP 2 mM y $MgCl_2$ 4 mM, a 37°C, 30 minutos.

Las mezclas se centrifugaron 60 minutos a las velocidades correspondientes, a 4°C y los precipitados se resuspendieron en buffer PEDK. Estas resuspensiones se incubaron a 37°C, 30 minutos, con alícuotas de fracciones activadoras obtenidas a partir de células de Leydig e hígado como se descri

bió anteriormente.

Las fracciones se centrifugaron nuevamente 60 minutos, a 4°C y se resuspendieron en buffer PEDK. Posteriormente estas fracciones subcelulares se incubaron a 37°C, 30 minutos en presencia de ATP 2 mM, $MgCl_2$ 4 mM y de alícuotas de las fracciones inactivadoras de células de Leydig y de hígado.

Finalmente se midió la actividad de la HMG-CoA reductasa, luego de todas las incubaciones descriptas.

DETERMINACION DE COLESTEROL

La cuantificación del colesterol total plasmático y del unido a cada una de las lipoproteínas aisladas (LDL y HDL) se realizó por dos métodos colorimétricos distintos.

a) Método descrito por Searcy y Bergquist (314)

Se hizo una extracción de 0,1 ml de muestra con 0,9 ml de acetona-etanol (1:1). Se agitó vigorosamente y se centrifugó. Se midieron 0,4 ml del sobrenadante orgánico y se agregaron 6 ml de solución saturada de $FeSO_4$ en ácido acético glacial y 2 ml de H_2SO_4 concentrado. Se mezcló inmediatamente y luego de 10 minutos se midió la absorbancia a 490 nm.

La solución standard se preparó a partir de colesterol (Sigma) disuelto en acetona-etanol.

b) Método enzimático de la colesterol oxidasa (2)

Para las determinaciones se utilizó el equipo de reactivos de laboratorios Supelco. La mezcla de reacción estaba constituida por :

Na_2HPO_4 : 50 mM.

NaH_2PO_4 : 50 mM.

Colesterol éster hidrolasa : 33 U/l.

Colesterol éster oxidasa : 117 U/l.

Peroxidasa : 67.000 U/l.

Fenol : 14 mM.

Carbowax-6000 : 0,17 mM.

Colato de sodio : 3 mM.

4-aminoantipirina : 0,82 mM.

Para el ensayo se incubaron 30 ul de muestra con 3 ml del reactivo a 37°C durante 10 minutos. Se midió la absorbancia a 500 nm. La solución standard se preparó usando colesterol disuelto en isopropanol.

DETERMINACION DE PROTEINAS

La cantidad de proteínas de todas las muestras se determinó por el método de Lowry y col. (234) y el contenido proteico de las lipoproteínas se midió por el mismo método mo dificado por Markwell y col. (245), extrayendo los lípidos con cloroformo luego del desarrollo del color. Como muestra standard se utilizó BSA (Fracción V - Sigma).

ENSAYOS ESTADISTICOS

Para el análisis estadístico de los resultados se aplico el test de " t " de Student.

RESULTADOS Y DISCUSION

SECCION I.

RECEPTORES DE LIPOPROTEINAS EN CELULAS
DE LEYDIG

RESULTADOS

Las células esteroideogénicas tienen la capacidad de sintetizar de novo al colesterol, que es el precursor obligatorio de todos los esteroides. Sin embargo, diversos investigadores mostraron que los tejidos esteroideogénicos utilizan colesterol circulante transportado por las lipoproteínas como sustrato para la esteroideogénesis (ver review, ref. 162). Esto es particularmente verdad en el caso de la glándula adrenal y el ovario; en cambio, en el testículo no está definido y hay pocos estudios acerca de la interacción de las lipoproteínas con las células de Leydig.

Recientemente, Chen y col. (103) demostraron la existencia de sitios de unión de alta afinidad para las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en la rata, localizados en células intersticiales obtenidas sin purificación previa.

Los experimentos siguientes se llevaron a cabo para caracterizar mejor la unión de lipoproteínas a células de Leydig purificadas en un gradiente de metrizamida.

CARACTERIZACION DE LA UNION DE LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDL) Y DE ALTA DENSIDAD (HDL) A CELULAS DE LEYDIG.

Con las fracciones de lipoproteínas aisladas de plasma humano se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida como criterio de pureza. En la Figura I.1 se observa una única banda tanto para LDL como para HDL en comparación con plasma humano normal, lo cual demuestra ausencia de contaminación cruzada, al menos con el método utilizado.

En la mayoría de los casos, luego de marcadas las lipoproteínas con ^{125}I Na, se usa la diálisis para separar el ^{125}I libre. Debido a que es un proceso complicado, se desarrolló una técnica para la purificación que se basa en la utilización de una cromatografía en columna en gel de poliacrilamida-agarosa (ACA 44). La Figura I.2 muestra los perfiles de elución con una nítida separación entre las ^{125}I -lipoproteínas y el ^{125}I no incorporado, lo cual demuestra que es un método eficaz y más rápido que la diálisis.

Para tratar de establecer las condiciones óptimas de la unión de las lipoproteínas a las células intersticiales, se realizaron curvas de tiempo a diferentes temperaturas (0, 24 y 37°C). La unión específica se calculó como se indicó en Materiales y Métodos.

La Figura I.3 muestra las curvas de tiempo para ^{125}I -

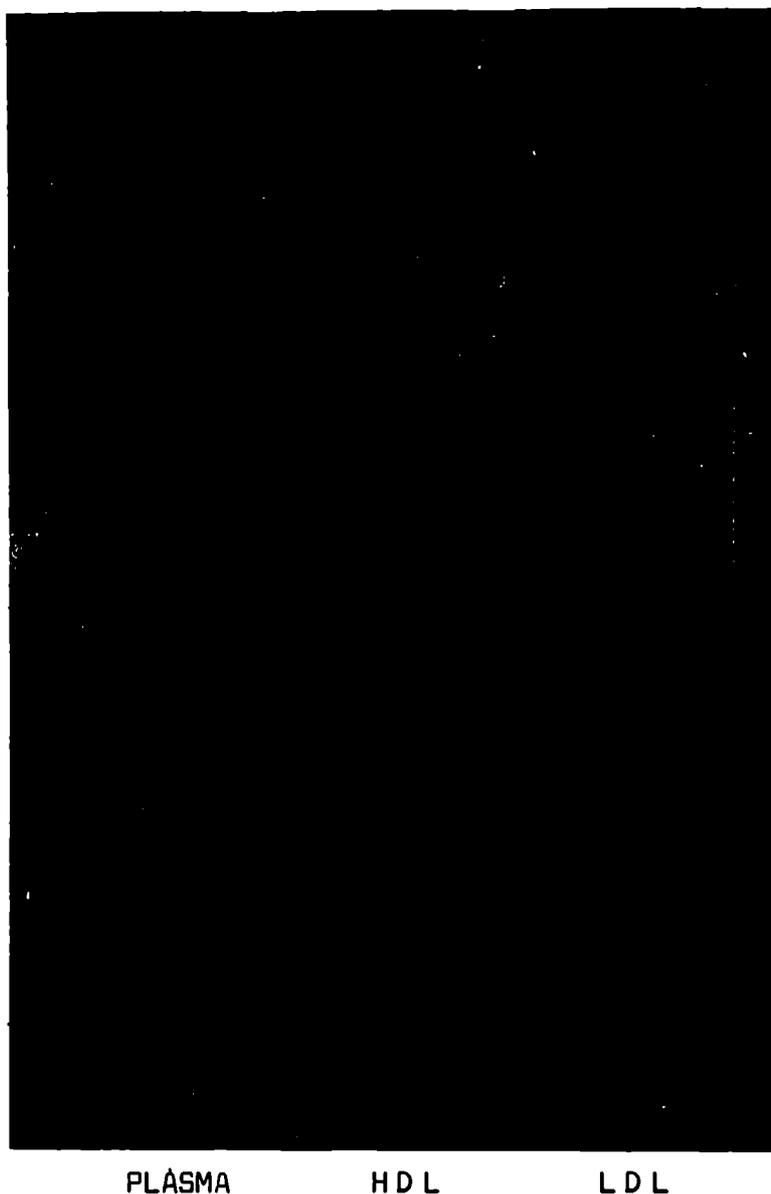


Figura I.1. Electroforesis de lipoproteínas en geles de poliacrilamida. Los geles se prepararon como se describió en Materiales y Métodos. Se sembraron alícuotas, previamente teñidas en Sudan Black B, de plasma humano normal y de las fracciones lipoproteicas obtenidas (LDL y HDL).

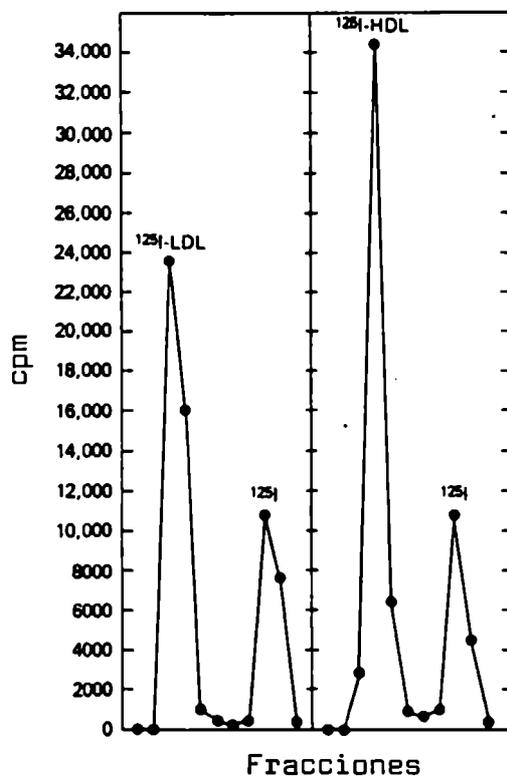


Figura I.2. Fraccionamiento a través de una columna de acrilamida-agarosa de las preparaciones de lipoproteínas marcadas. El gel (ACA 44, Ultrogel, LKB) se empaquetó en pipetas de plástico de 10 ml y se equilibró con buffer Dulbecco, que contenía BSA al 1%. Las muestras se eluyeron con el mismo buffer y las fracciones se recolectaron cada 5 minutos.

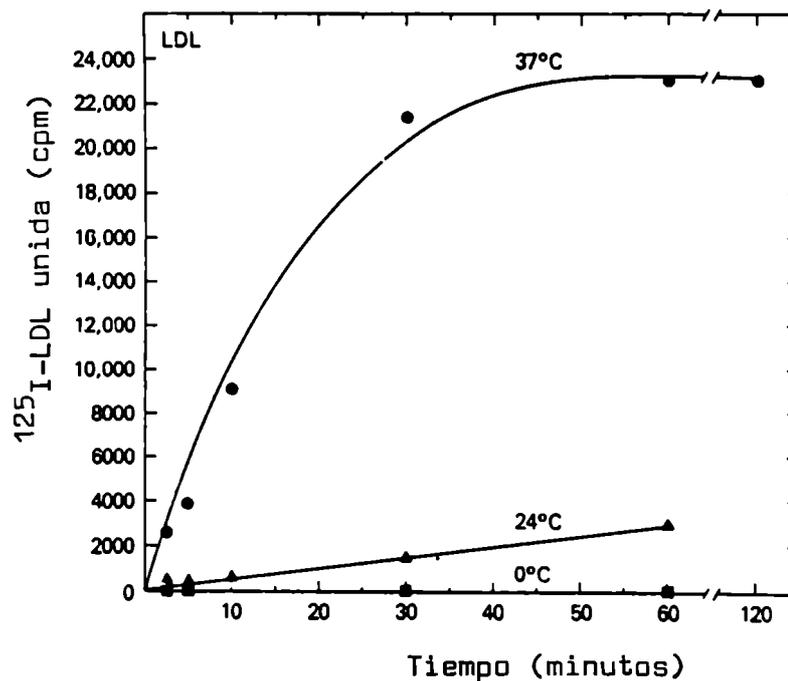


Figura I.3. Relación entre tiempo y unión de ¹²⁵I-LDL humana a membranas de células intersticiales a diferentes temperaturas. La h-LDL marcada (80 cpm/ng de proteína de LDL) se agregó a 250 μ l de la mezcla de reacción, que contenía 300 μ g de proteína de membrana de células intersticiales. Para calcular la unión inespecífica se agregó h-LDL fría hasta una concentración final de 400 μ g de proteína de LDL/ml.

LDL (actividad específica = 80 cpm/ng de proteína de LDL). La unión fue mucho mayor a 37°C y la reacción llegó al equilibrio a los 60 minutos, permaneciendo constante hasta por lo menos las 2 horas. El mismo experimento se realizó para ^{125}I -HDL (actividad específica = 100 cpm/ng de proteína de HDL). Los resultados se exponen en la Figura I.4 y son coincidentes con las condiciones óptimas de reacción de LDL.

La Figura I.5 muestra la unión de lipoproteínas a diferentes fracciones celulares obtenidas de células intersticiales centrifugadas a través de un gradiente de metrizamida. Se observa que ambas lipoproteínas presentan una amplia distribución de unión entre todas las fracciones del gradiente correspondientes a células de Leydig, según se juzga por la unión de hCG. La fracción D, con una considerable unión de LDL y HDL, prácticamente tiene una cantidad despreciable de receptores para gonadotrofinas, ya que se trata de otros tipos celulares intersticiales distintos de Leydig. Por lo tanto, los siguientes experimentos fueron realizados usando células de Leydig purificadas descartando la fracción D.

En la Figura I.6 se ve la unión de ^{125}I -LDL a las membranas de células de Leydig a 37°C como una función de la con

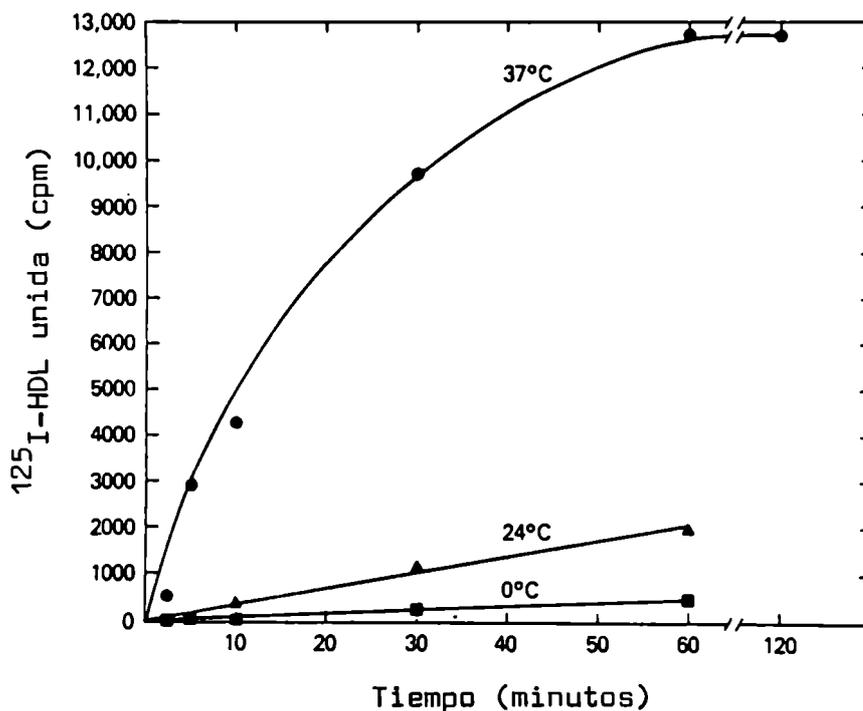


Figura I.4. Relación entre tiempo y unión de ^{125}I -HDL humana a membrana de células intersticiales a diferentes temperaturas. La h-HDL marcada (100 cpm/ng de proteína de HDL) se agregó a 250 μl de la mezcla de reacción, que contenía 300 μg de proteína de membrana de células intersticiales. Para calcular la unión inespecífica se agregó h-HDL fría hasta una concentración final de 400 μg de proteína de HDL/ml.

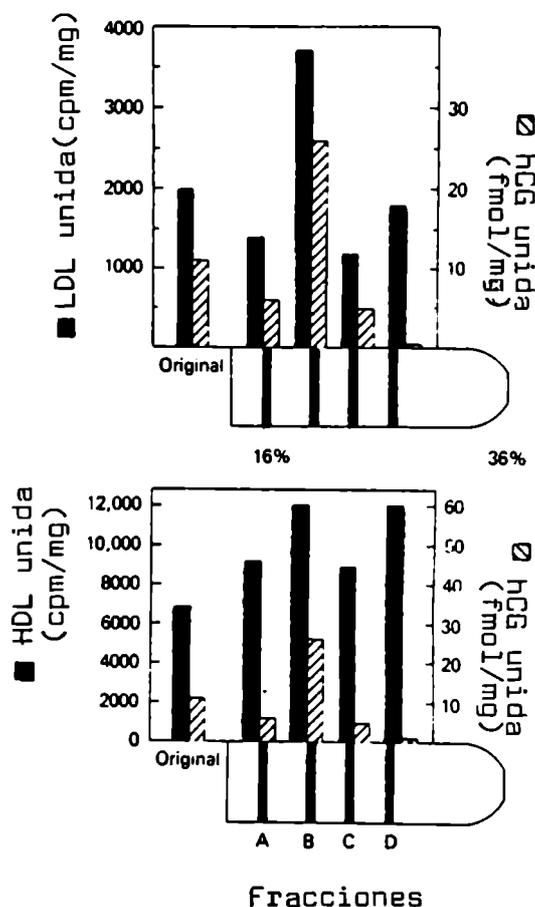


Figura I.5. Unión de lipoproteínas y hCG a células intersticiales purificadas a través de un gradiente de metrizamida. Se resuspendieron 8×10^7 células en Medio 199, que contenía BSA 0,1%, y se sembraron en un gradiente de metrizamida 16-36%. Después de la centrifugación se separaron 4 bandas que se resuspendieron en Medio 199 y las células se lavaron. Luego, las células se trataron con bicarbonato de sodio 1 mM para la unión de lipoproteínas como se describió en la sección de Métodos. Para la unión de hCG, las células lavadas se resuspendieron en Medio 199 con BSA 0,1% y se usaron.

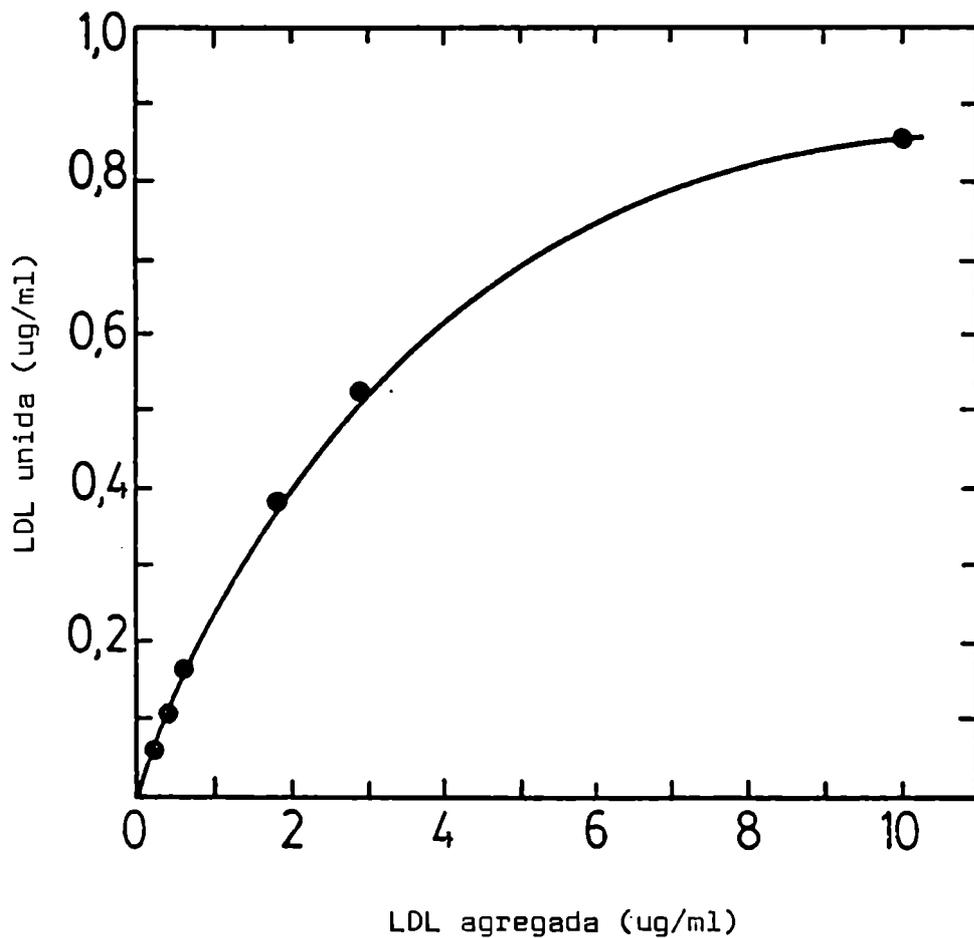


Figura I.6. Curva de saturación de la unión de ^{125}I -h-LDL a membranas de células de Leydig purificadas. Se incubaron alícuotas de membranas celulares (1,2-2 mg/ml) con concentraciones variables de h-LDL marcada (80 cpm/ng de proteína de LDL).

centración de ^{125}I -LDL en el medio de incubación. La unión específica mostró una cinética de saturación, con una unión máxima adquirida a aproximadamente 10 μg de proteína de LDL/ml. Cuando esos datos se transformaron según el análisis de Scatchard (307) se observó una sola clase de sitios de unión con una constante de disociación (K_d) igual a 2,6 μg de proteína de LDL/ml y una capacidad (B_0) de 920 ng de proteína de LDL/mg de proteína de membrana (Figura I.7).

La Figura I.8 muestra un experimento similar realizado con ^{125}I -HDL. La unión específica dio un esquema de saturación con la unión máxima a 20 μg de proteína de HDL/ml. Los datos analizados según el modelo de Scatchard revelaron un único tipo de sitios de unión con una K_d de 4,2 μg de proteína de HDL/ml y una capacidad de unión (B_0) de 500 ng de proteína de HDL/mg de proteína de membrana (Figura I.9).

Cuando todos estos resultados se procesaron teniendo en cuenta la máxima capacidad de unión (M.C.U.) de las preparaciones de lipoproteínas marcadas (4%), las constantes de disociación disminuyeron a 104 ng de proteína de LDL/ml y 168 ng de proteína de HDL/ml respectivamente, sin cambios en las capacidades de unión.

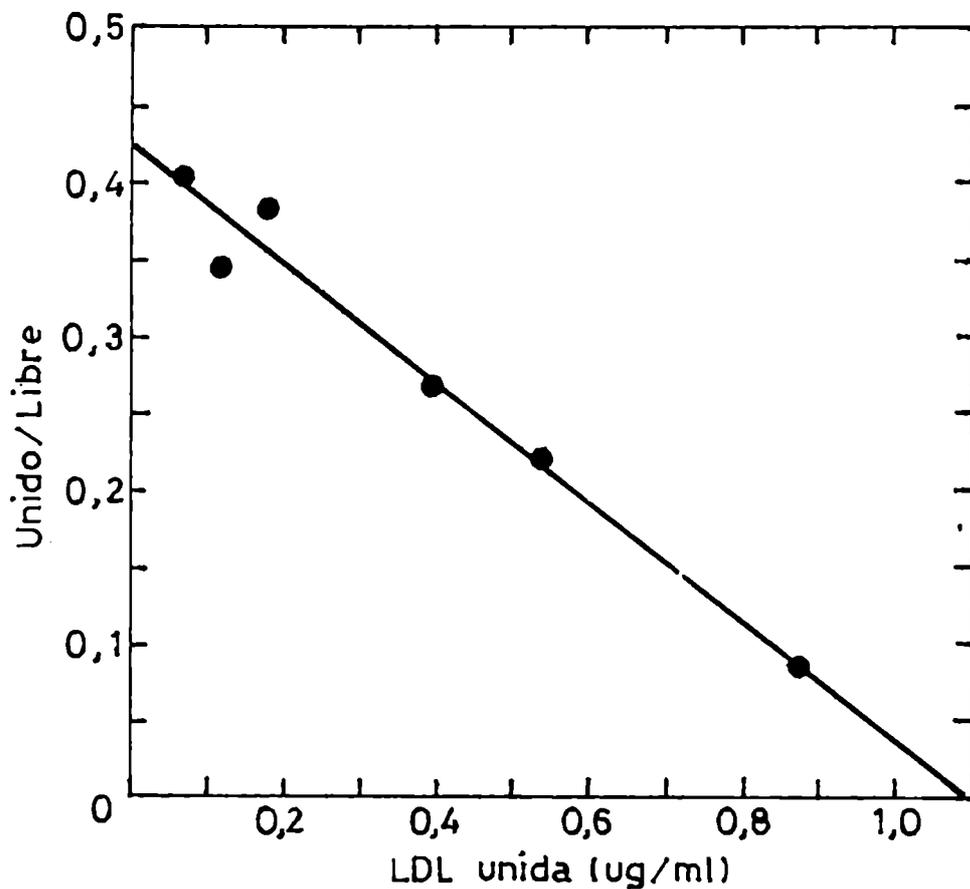


Figura I.7. Análisis de Scatchard de la unión de ^{125}I -hLDL a membranas de células de Leydig. Se incubaron alícuotas de membranas celulares (1,2-2 mg/ml) con varias concentraciones de hLDL marcada (80 cpm/ng de proteína de LDL).

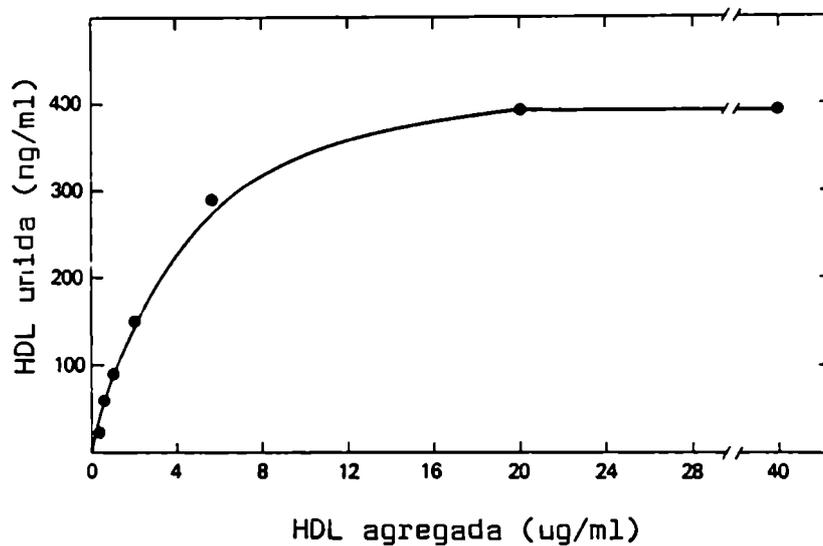


Figura I.8. Curva de saturación de la unión de ^{125}I -h-HDL a membranas de células de Leydig purificadas. Se incubaron alícuotas de membranas celulares (1,2-2 mg/ml) con concentraciones variables de h-HDL marcada (100 cpm/mg de proteína de HDL).

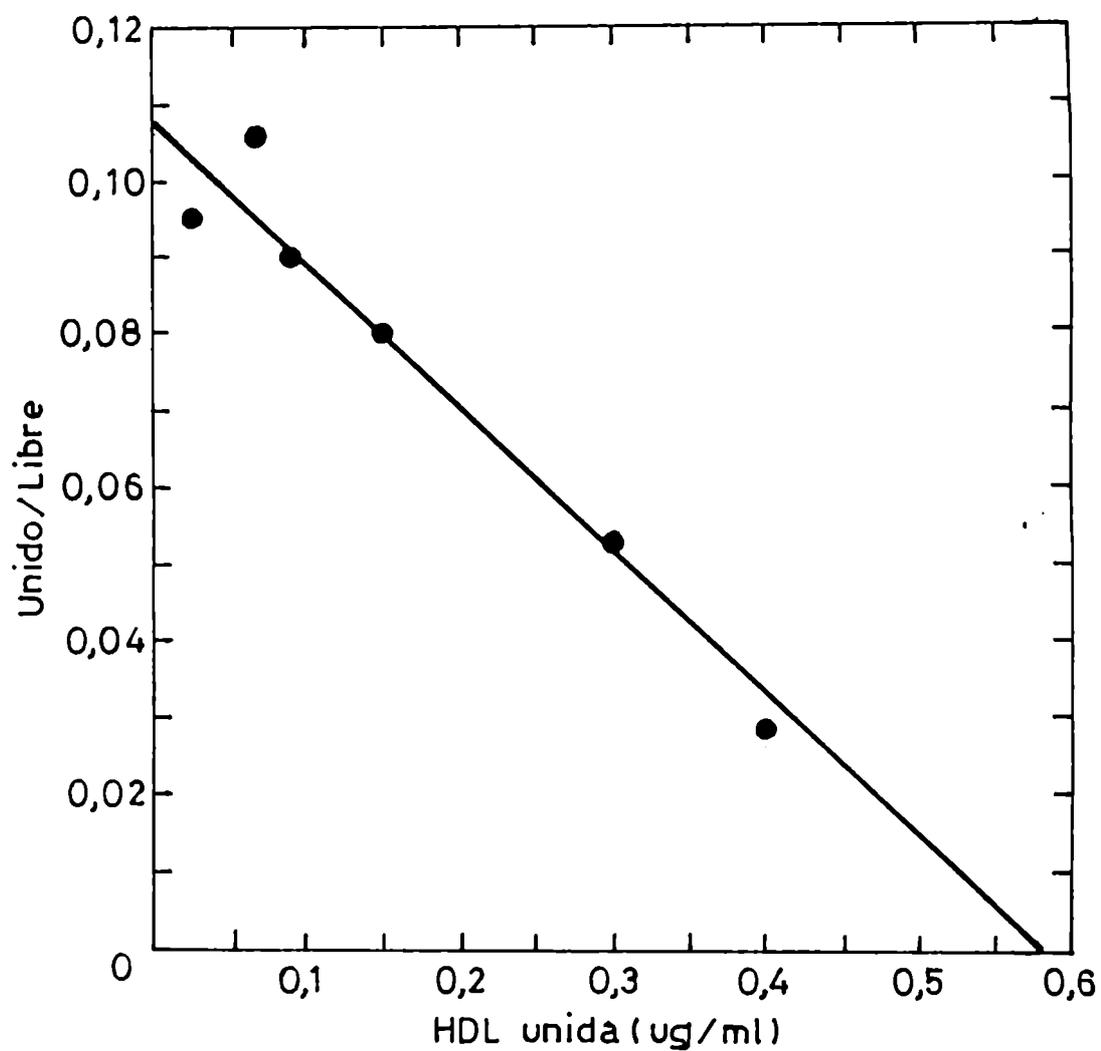


Figura I.9. Análisis de Scatchard de la unión de ^{125}I -hHDL a membranas de células de Leydig. Se incubaron alícuotas de membranas celulares (1,2-2 mg/ml) con varias concentraciones de hHDL marcada (100 cpm/ng de proteína de HDL).

Considerando un peso molecular de 480.000 para el componente proteico de la LDL y de 100.000 para el de HDL (319) esos datos dan constantes de afinidad de $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ para LDL y $0,625 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ para HDL, valores que son consistentes con sitios de unión de alta afinidad.

La Figura I.10 muestra la curva de disociación para la unión específica de ^{125}I -HDL a células de Leydig. De estos resultados puede observarse que existen dos componentes en este perfil de disociación, uno dando una $k_{-1} = (0,0154 \pm 0,0022) \text{ min}^{-1}$ y un $t_{1/2} = 45$ minutos, y el otro componente prácticamente no disociable (al menos durante el tiempo que duró el experimento).

De los datos de la Figura I.4 puede obtenerse una $k_1 = (3,37 \pm 0,71) \times 10^{-6} \text{ ml/ng min}$. La relación $k_{-1} / k_1 = Kd$ da un valor de 4,6 ug de proteína de HDL/ml que concuerda con el valor de 4,2 ug de proteína de HDL/ml obtenido de los datos analizados por el modelo de Scatchard.

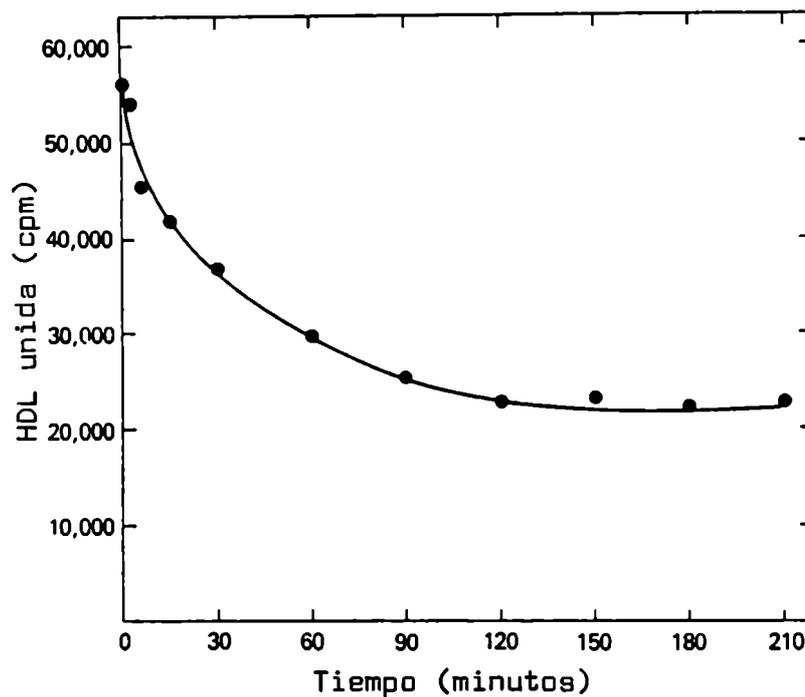


Figura I.10 Curva de disociación para la unión de ^{125}I -h-HDL a células de Leydig purificadas. Se equilibraron 50 ug de h-HDL marcada (82 cpm/ng) por ml de mezcla de incubación, con 400 ug de proteína de membranas celulares durante 2 horas a 37°C. Luego se agregaron 2,4 mg de HDL fría al medio de incubación y se midió la radiactividad unida a varios tiempos como se describió en Métodos.

DISCUSION

Las evidencias disponibles de trabajos realizados en varias especies indican que los tejidos esteroideogénicos tienen toda la maquinaria celular para unir y metabolizar lipoproteínas de baja densidad (LDL), por un mecanismo similar al observado en los fibroblastos humanos (26,64) y, en varias instancias, el "camino metabólico de la LDL" fue demostrado tanto "in vivo" como "in vitro" y es muy similar en todos los casos.

Además, numerosas observaciones han establecido la existencia de un segundo sistema para la captación de colesterol de las lipoproteínas, específico para HDL, en las células productoras de esteroides. El mecanismo de captación de esta lipoproteína, aunque comprendido en forma incompleta, es diferente que para la LDL, siendo la unión de HDL a las células mediada por un receptor distinto.

Se ha sugerido que la HDL, más bien que la LDL, podría proveer el colesterol para los tejidos esteroideogénicos de la rata (161,178,321). También se propuso que la HDL era más efectiva en suprimir la síntesis del colesterol en roedores, midiendo la velocidad de formación a partir de octanoato (8,49)

Chen y col. (103) demostraron la existencia de sitios de unión de alta afinidad para HDL y no para LDL, pero esos trabajos se realizaron en células intersticiales que no habían sido purificadas.

En este trabajo se confirmó la existencia de sitios de unión saturables de alta afinidad para HDL y LDL en testículo. La unión fue más alta a 37°C que a otras temperaturas estudiadas (0 y 24°C) y llegó al equilibrio a los 60 minutos de incubación. Las constantes de velocidad derivadas de estudios de asociación y disociación para HDL revelaron una constante de disociación (K_d) de 4,6 μg de proteína de HDL/ml que fue similar al valor calculado de los análisis de saturación según el modelo de Scatchard (4,2 μg de proteína de HDL/ml).

Este resultado no concuerda completamente con las observaciones previas (103) pues se informó una K_d de 32 μg de proteína de HDL/ml. Este valor más alto para la constante de disociación (con una disminución paralela en la constante de afinidad) hallado por esos autores puede deberse a que ellos usaron para sus estudios células de Leydig impurificadas, y como fue señalado por Gwynne y Strauss (162), aunque esos trabajos sugieren un mecanismo específico mediado por receptor

para el metabolismo de HDL por células de Leydig, debe notarse que los cultivos empleados por Chen y col. consisten de sólo un 10% de células de Leydig. De esta forma, puede haber ocurrido unión y degradación de lipoproteínas por otros tipos celulares.

Como se demostró en esta serie de experimentos, ambas lipoproteínas se unen a varios tipos celulares según se juzga por el gradiente de metrizamida. Por lo tanto, sería importante realizar este tipo u otro de purificación para tener una adecuada información y poder correlacionar la acción de las lipoproteínas con la unión e internalización a las células de Leydig.

La curva de disociación de HDL presentó dos componentes mostrando un perfil similar al descrito para la interacción de LH/hCG con sus receptores en el testículo (30,263) e indica una cantidad significativa de complejos irreversibles que son mantenidos en la superficie celular por tiempos más largos que los esperados. Sin embargo, los efectos de esos complejos ligando receptor persistentes son aún desconocidos.

Respecto a los valores de constantes de disociación (K_d) y de capacidad de unión (B_0), los trabajos publicados en

la literatura no hacen referencia alguna a correcciones realizadas sobre la actividad específica del ligando marcado con ^{125}I . Hasta el momento, la mayoría de los investigadores obtiene ese dato a partir de pasos de purificación luego de la marcación, dato que representa una fuente de error, pues como ha sido demostrado por Cresto y col. (97) para insulina, el procedimiento de iodinación puede dar como productos hormona mono-iodada como también moléculas di-iodadas o no marcadas, y, a menos que se puedan purificar las diferentes especies, la actividad específica obtenida de esa forma representa un promedio de las diferentes moléculas, no todas con la misma actividad biológica. Por lo tanto, para tener un valor confiable de actividad específica se hace necesario utilizar el método de autodesplazamiento descrito por Calvo y col. (77).

Otro factor a tener en cuenta es que la introducción del radioisótopo al ligando, produce modificaciones estructurales que resultan en una actividad biológica y de unión disminuídas. Debido a ello se debe conocer cual es la máxima capacidad de unión del ^{125}I -ligando en el modelo experimental utilizado o en alguno similar.

En este trabajo, a las ^{125}I -lipoproteínas se les deter-

minó la actividad específica por autodesplazamiento y la máxima capacidad de unión (M.C.U.) a membranas de células de Leydig y de adrenal. Los resultados obtenidos para la unión de LDL y HDL, teniendo en cuenta los parámetros anteriores, mostraron el mismo número de sitios de unión pero una K_d menor (104 ng de proteína de LDL/ml y 168 ng de Proteína de HDL/ml), que si se consideraba un 100% de M.C.U. (2,6 ug de proteína de LDL/ml y 4,2 ug de proteína de HDL/ml, respectivamente)

Por ello, es importante que para cualquier estudio de interacción ligando-receptor, se calcule no sólo la actividad específica adecuadamente, sino también la máxima capacidad de unión del ligando en estudio a su receptor específico, ya que de no hacerlo, se obtendrán datos erróneos con interpretaciones incorrectas.

SECCION II.

BIOSINTESIS DE NOVO DE COLESTEROL EN CE
LULAS DE LEYDIG

RESULTADOS

LOCALIZACION SUBCELULAR DE LA HMG-CoA REDUCTASA EN CELULAS DE LEYDIG.

Numerosos trabajos indican que la HMG-CoA reductasa, enzima regulatoria en la biosíntesis del colesterol, está asociada al retículo endoplasmático en hígado, ovario y glándula adrenal, entre otros tejidos de mamíferos. A pesar que estas observaciones fueron extrapoladas al testículo, no se había realizado ningún estudio en este órgano que verificase tal presunción.

Por lo tanto, se decidió realizar su caracterización en células de Leydig. Para ello, previo fraccionamiento subcelular, se midió la actividad enzimática en las diferentes fracciones según se describió en Materiales y Métodos. Como enzimas marcadoras se utilizaron succinato deshidrogenasa (SDH) (mitocondrial) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) (citosólica).

La Tabla II.1 muestra los resultados de la distribución de la actividad de HMG-CoA reductasa en las fracciones subcelulares de células de Leydig.

Tabla II.1. Distribución subcelular de la actividad de HMG-CoA reductasa en células de Leydig purificadas e hígado de rata.

FRACCIONES	CELULAS DE LEYDIG				HIGADO			
	HMG-CoA reductasa Activ. total (nmoles/hora)	% de act. total	SDH % de act. total	G-6-P desh. % de act. total	HMG-CoA reductasa Actividad total (nmoles/h)	%		
Núcleos purificados	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Mitocondrias	0,972-1,580	62 ± 3	91 ± 4	6 ± 2	0,1-0,7	4 ± 1		
Microsomas	0,023-0,086	3 ± 2	3 ± 2	9 ± 3	5,1-15	89 ± 4		
Citosol	0,515-0,930	35 ± 4	6 ± 3	85 ± 3	0,2-1,8	7 ± 3		

Esta tabla contiene datos representativos de cuatro experimentos diferentes, indicando el rango obtenido para la actividad total y el porcentaje como promedio ± desviación standard.

La mayor actividad se encontró asociada a la fracción mitocondrial (62% de la actividad total). La actividad del citosol fue un 35% del total. Solamente un 6% de la actividad de SDH estaba presente en esta fracción. La detección de esta actividad en el sobrenadante de 105.000 x g puede deberse a ruptura mitocondrial con una pérdida preferencial de la HMG-CoA reductasa. La actividad de esta enzima en microsomas fue despreciable. No se detectó actividad de HMG-CoA reductasa, SDH o G-6-PDH en la fracción nuclear previamente purificada a través de una capa de sacarosa 2 M.

La actividad de HMG-CoA reductasa determinada en las fracciones hepáticas (Tabla II.1) mostró la típica localización microsomal descrita por otros autores (89% de la actividad total), (68, 146, 259).

Para confirmar el hallazgo observado, la fracción mitocondrial cruda fue purificada a través de un gradiente de sacarosa discontinuo. La actividad de la HMG-CoA reductasa siguió el mismo perfil de centrifugación que el de la SDH (figura II.1). La actividad específica de la HMG-CoA reductasa en la fracción más enriquecida en mitocondrias (interfase 40-50 del gradiente de sacarosa) fue 3,6 veces mayor que la co-

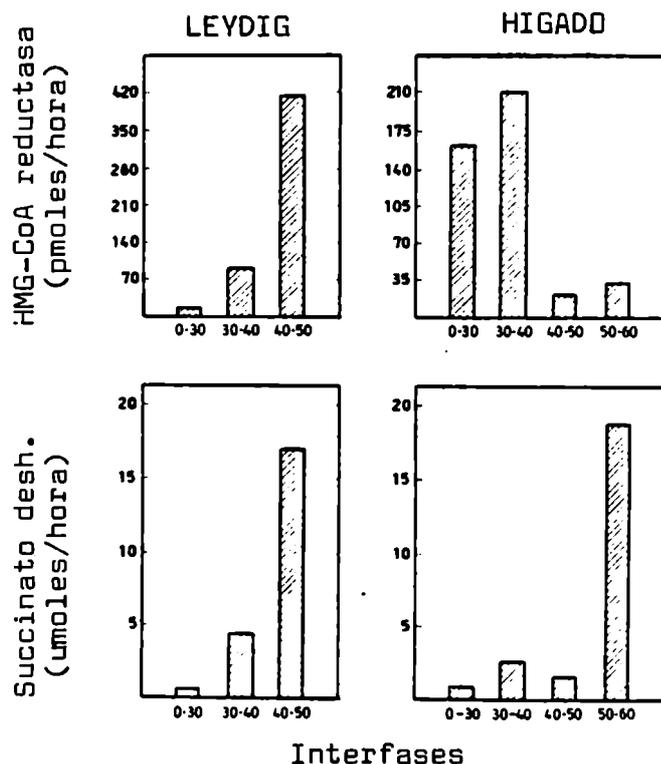


Figura II.1. Actividades de HMG-CoA reductasa y succinato deshidrogenasa en mitocondrias de células de Leydig purificadas y de hígado. El precipitado de $17.000 \times g$ fue sembrado en un gradiente discontinuo de sacarosa y las interfases fueron lavadas con sacarosa $0,25 M$ antes de ser utilizadas para los ensayos enzimáticos. Los números en las abcisas representan las concentraciones de sacarosa (% P/V) de las fracciones ensayadas. La figura contiene datos representativos de uno de 3 experimentos diferentes con similares perfiles de distribución.

rrespondiente al precipitado de 17.000 x g. Estos resultados confirmaron que la HMG-CoA reductasa, en las células de Leydig de la rata, está localizada en las mitocondrias.

Cuando esta experiencia se realizó con mitocondrias de hígado, la mayor parte de la actividad de la HMG-CoA reductasa se encontró asociada a la fracción menos densa del gradiente de sacarosa (interfases 0-30 y 30-40) mostrando una distribución similar a la glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) (enzima marcadora microsomal) (Figura II.1 y Tabla II.2), indicando que las fracciones de hígado más livianas del gradiente están enriquecidas en microsomas.

DETERMINACION DE LA VELOCIDAD RESPIRATORIA, DEL CONTROL RESPIRATORIO Y DE LA RELACION FOSFORO-OXIGENO (P : O) DE LAS MITOCONDRIAS AISLADAS DE CELULAS DE LEYDIG.

Debido a que para purificar las mitocondrias aisladas de células de Leydig, se utilizaron altas concentraciones de sacarosa, que de alguna manera podrían haber dañado la integridad de las mismas, se decidió determinar los parámetros más importantes de la actividad respiratoria. Se utilizó la fracción proveniente de la interfase 40-50 puesto que era la más enriquecida en actividad de SDH. Los resultados fueron los

Tabla II.2. Actividades enzimáticas en fracciones mitocondriales purificadas de hígado de rata.

Interfases	Actividades enzimáticas		
	HMG-CoA reductasa (pmoles/hora)	Succinato deshidrogenasa (umoles/hora)	Glucosa-6-fosfatasa (umoles/hora)
0-30	164 ± 15	0,8 ± 0,3	6,2 ± 1,1
30-40	210 ± 25	2,6 ± 0,9	6,7 ± 1,2
40-50	22 ± 3	1,6 ± 0,7	2,0 ± 0,4
50-60	33 ± 5	19,0 ± 3,0	1,8 ± 0,7

Los números de las interfases del gradiente representan las concentraciones de sacarosa, (% P/V), de las fracciones ensayadas. Los valores son el promedio ± D.S. de determinaciones por triplicado y la tabla contiene datos representativos de uno de 3 experimentos con similares perfiles de distribución.

siguientes.

Consumo de oxígeno del estado de reposo (estado metabólico 4 o de respiración controlada): 31,3 nat.gr. de O₂ / min. mg de proteína.

Consumo de oxígeno del estado activo (estado metabólico 3 o de respiración activa): 44,6 nat.gr. de O₂ / min. mg de proteína.

$$\text{Control respiratorio (C.R.)} = \frac{\text{velocidad en presencia de ADP}}{\text{velocidad en ausencia de ADP}}$$

$$\text{C.R.} = \frac{44,6 \text{ nat.gr. de O}_2 / \text{min. mg de proteína}}{31,3 \text{ nat.gr. de O}_2 / \text{min. mg de proteína}} = 1,43$$

$$\text{Relación fósforo-oxígeno (P : O)} = \frac{\text{ADP agregado}}{\text{O}_2 \text{ consumido en estado 3}}$$

$$\text{P : O} = \frac{250 \text{ nmoles}}{89,2 \text{ nmoles}} = 2,8$$

Los datos observados fueron similares utilizando como sustrato succinato 10 mM o una mezcla de malato 25 mM-glutamato 25 mM, y permiten asegurar la existencia de mitocondrias.

El control respiratorio (C.R.) indica si hay acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación

oxidativa, y es un criterio muy sensible y en general el de elección para juzgar la integridad mitocondrial. Los resultados obtenidos no son óptimos, por lo que no se puede descartar que haya habido ruptura de la membrana interna mitocondrial.

CONDICIONES DE ENSAYO PARA LA ACTIVIDAD DE LA HMG-CoA REDUCTASA MITOCONDRIAL.

Las condiciones de sustratos para los ensayos se determinaron en mitocondrias purificadas (interfase 40-50 del gradiente de sacarosa) de células de Leydig (Figura II.2).

El valor de K_m para la DL-HMG-CoA (calculada según el modelo de Lineweaver-Burk) fue 0,200 mM ($r^2 = 0,994$), que representa una constante de 0,100 mM para el D-isómero activo. La concentración de NADPH con la cual se alcanzó la mitad de la actividad enzimática máxima fue aproximadamente 0,050 mM. La síntesis de mevalonato fue lineal hasta los 90 minutos con 150 ug de proteínas.

ACTIVIDAD DE LA HMG-CoA REDUCTASA EN LAS DIFERENTES FRACCIONES SUBMITOCONDRIALES DE CELULAS DE LEYDIG.

Asumiendo que la HMG-CoA reductasa en la célula de Leydig de la rata es una enzima mitocondrial, se trató de estudiar

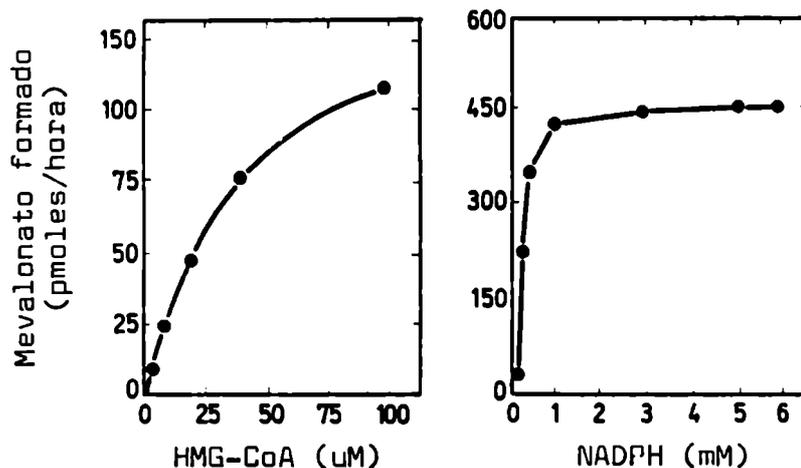


Figura II.2. Ensayo y propiedades de la actividad de la HMG-CoA reductasa en mitocondrias de células de Leydig purificadas por metrizamida. Las mitocondrias se prepararon y purificaron como se describió en Métodos. Las incubaciones se realizaron a 37°C bajo las siguientes condiciones: (a) se incubaron 50 ug de proteínas durante 60 minutos con 6 mM de NADPH y concentraciones variables de HMG-CoA; (b) se incubaron 50 ug de proteínas durante 60 minutos con 0,2 mM de HMG-CoA y concentraciones variables de NADPH.

su localización submitocondrial.

Si la HMG-CoA reductasa estuviese ubicada en la membrana externa de la mitocondria, sería relativamente accesible a la HMG-CoA citoplasmática proveniente de acetil-CoA. Por otra parte, si la enzima estuviese localizada en la matriz o en la membrana interna mitocondrial, existiría una barrera de membranas separándolas de las reservas de HMG-CoA citoplasmáticas.

La Tabla II.3 resume los resultados de los intentos de localizar a la enzima en las fracciones submitocondriales. Se consiguió una separación relativamente buena de las dos membranas como se muestra por las actividades de la monoaminoxidasa (MAO) (enzima marcadora de la membrana externa) y de la succinato deshidrogenasa (SDH) (enzima marcadora de la membrana interna) en las fracciones aisladas. La membrana externa contenía un 25% de la SDH total y un 20% de la actividad total de la HMG-CoA reductasa pero casi la totalidad de la actividad de MAO (94%).

La distribución de la HMG-CoA reductasa fue similar a la distribución de la actividad de SDH en la membrana externa, espacio intermembrana y membrana interna, mostrando que la actividad de HMG-CoA reductasa obtenida en la membrana externa

Tabla II.3. Distribución de HMG-CoA reductasa y enzimas marcadoras en fracciones submitocondriales de células de Leydig purificadas.

ENZIMAS	ACTIVIDAD EN											
	MEMBRANA EXTERNA		INTERMEMBRANA		MEMBRANA INTERNA		MATRIZ					
	A.E.(a)	T(b)	%	A.E.(a)	T(b)	%	A.E.(a)	T(b)	%	A.E.(a)	T(b)	%
HMG-CoA reductasa	0.031 ±0.005	0.116 ±0.019	20	0.040 ±0.007	0.062 ±0.011	10	0.170 ±0.020	0.233 ±0.027	40	0.063 ±0.012	0.180 ±0.034	30
Monoamino oxidasa	0.700 ±0.046	2.620 ±0.172	94	N.D.	N.D.		0.128 ±0.019	0.171 ±0.025	6	N.D.	N.D.	
Succinato deshidrogenasa	100 ± 20	380 ± 76	25	40 ± 4	60 ± 6	4	720 ± 120	960 ±160	63	40 ± 6	120 ± 18	8
Malato deshidrogenasa	192 ± 22	768 ± 88	9	192 ± 32	979 ± 163	11	576 ± 88	2,246 ± 343	27	933 ± 105	4,385 ± 493	53

(a) Actividad específica:nmoles/mg proteina.hora

(b) Actividad total:nmoles/hora

Los resultados son el promedio ± D.S. de determinaciones en 3 preparaciones celulares distintas.

y en el espacio intermembrana se deben a la contaminación de estas fracciones con membrana interna. La actividad de HMG-CoA reductasa determinada en la matriz (30%) no coincidió con la de SDH (8%), pudiendo deberse este hecho a que la HMG-CoA reductasa se encuentre unida en forma más débil a la membrana interna que la SDH y puede solubilizarse más fácilmente por el tratamiento con detergente (Lubrol WX).

HMG-CoA SINTETASA Y HMG-CoA LIASA EN FRACCIONES SUBCELULARES DE CELULAS DE LEYDIG.

Habiendo detectado actividad de HMG-CoA reductasa en la mitocondria, resultaba importante determinar la localización de HMG-CoA sintetasa y HMG-CoA liasa, enzimas responsables de la síntesis y ruptura de la HMG-CoA respectivamente.

Los resultados se muestran en la Figura II.3 y se relacionan al 100% de recuperación de las correspondientes enzimas marcadoras, asumiendo estabilidades similares en el homogenato y en las fracciones subcelulares

La mayor parte de la actividad total de la HMG-CoA sintetasa estuvo asociada a la fracción mitocondrial, aunque alguna actividad se encontró presente en el citosol. La acti-

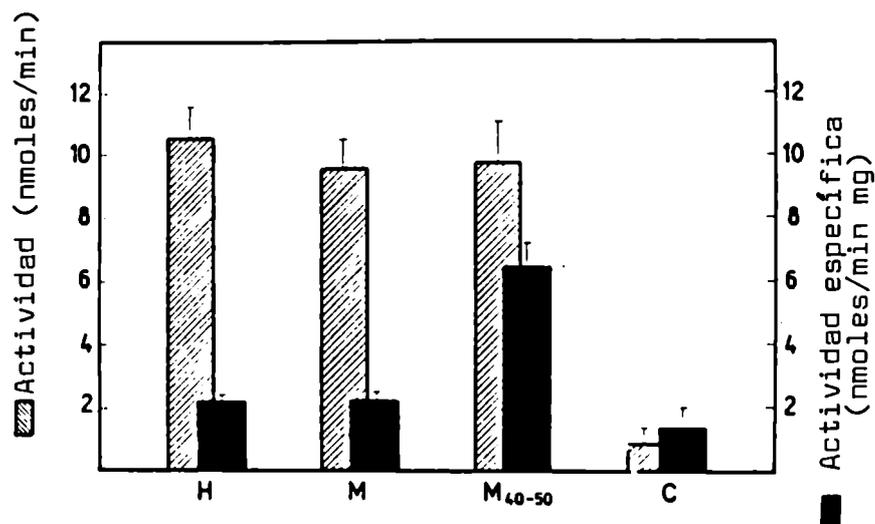


Figura II.3. Distribución subcelular de la actividad de HMG-CoA sintetasa en células de Leydig purificadas. H: homogenato; M: precipitado de 17.000 x g; M 40-50: interfase 40-50% (P/V) del gradiente de sacarosa; C: citosol. Los resultados son el promedio \pm D.S. de determinaciones por duplicado en 3 preparaciones celulares distintas.

vidad específica obtenida en las mitocondrias, previamente purificadas a través de un gradiente de sacarosa (interfase 40-50) fue aproximadamente 3 veces mayor que la encontrada en el precipitado de 17.000 x g.

También se determinó la actividad de HMG-CoA liasa en las diferentes fracciones subcelulares. No se detectó actividad en ninguna de ellas.

INCORPORACION DE ^{14}C -ACETIL-CoA A LOS ESTEROLES PRECIPITABLES POR DIGITONINA.

Existiendo cantidades apreciables de HMG-CoA sintetasa y de HMG-CoA reductasa en mitocondrias, fue natural especular acerca de la función de estas organelas en la síntesis de colesterol en las células de Leydig

Para este propósito se estudió la incorporación de ^{14}C -acetil-CoA a los esteroides precipitables por digitonina utilizando homogenato, mitocondrias purificadas (interfase 40-50) y fracción citosólica de células de Leydig (Figura II.4). Se omitieron las fracciones nuclear y microsomal dado que no se detectó actividad de HMG-CoA reductasa en las mismas (Tabla II.1). La incorporación de ^{14}C -acetil-CoA (relacionada al 100%

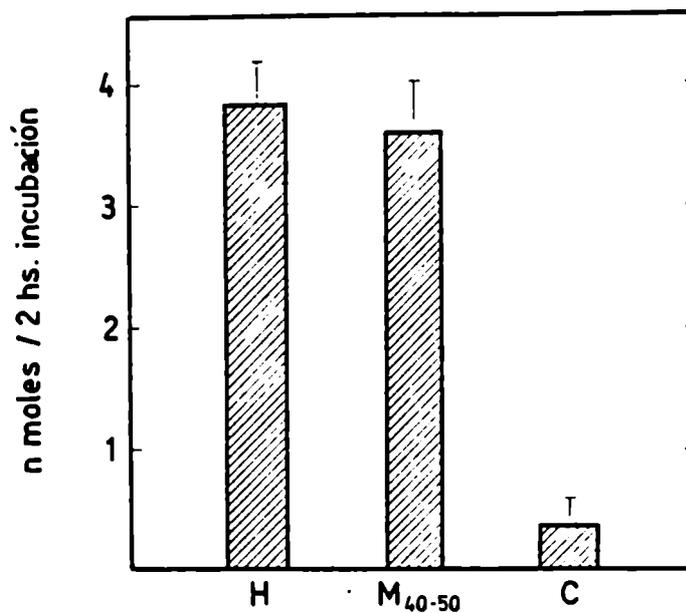


Figura II.4. Incorporación de ^{14}C -acetil-CoA a los esteroides precipitables por digitonina en fracciones subcelulares de células de Leydig purificadas. H: homogenato; M 40-50: interfase 40-50% (P/V) del gradiente de sacarosa; C: citosol. Los resultados son el promedio \pm D.S. de incubaciones por duplicado de 3 preparaciones celulares distintas.

de recuperación de las correspondientes enzimas marcadoras)
fue similar al perfil de distribución de la actividad de
HMG-CoA sintetasa encontrada en las fracciones.

DISCUSION

Está generalmente aceptado que en el testículo, la transformación de HMG-CoA a mevalonato, es el paso limitante en la biosíntesis de novo del colesterol y que la HMG-CoA reductasa, que cataliza dicha reacción, está unida al retículo endoplasmático. Más aún, las restantes enzimas del camino metabólico están localizadas o en el citoplasma o en el retículo endoplasmático e involucran a los intermediarios usuales en la formación del colesterol (351).

Contrariamente a esas suposiciones, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la HMG-CoA reductasa de las células de Leydig está unida a la membrana interna mitocondrial. Aunque no se puede excluir la presencia de esta enzima en la fracción citosólica, ya que el 36% de la actividad total está localizada en este compartimiento después del fraccionamiento celular, es posible suponer una pérdida preferencial de la HMG-CoA reductasa de las mitocondrias comparada a la succinato deshidrogenasa (SDH), la cual se une fuertemente a la membrana interna mitocondrial.

La localización de la HMG-CoA reductasa de células de Leydig en mitocondrias es interesante en comparación con la

enzima hepática (68), adrenal (25) y ovárica (212) en la rata, la cual está localizada en el retículo endoplasmático. Similar distribución mitocondrial se encontró en Saccharomyces cerevisiae (322,323).

También se observó que en las mitocondrias purificadas de células de Leydig hay una considerable cantidad de actividad de HMG-CoA sintetasa, aunque sólo se detectó una muy pequeña porción de esta enzima en la fracción citosólica. Más aún, se demostró que el colesterol se puede sintetizar a partir de acetil-CoA dentro de la mitocondria, ya que se vio, en esta organela, una significativa incorporación de ^{14}C -acetil-CoA a los esteroides precipitables por digitonina.

Debido a que la colesterogénesis desde HMG-CoA en la célula de Leydig parece ser un proceso predominantemente mitocondrial, surgió la pregunta si la HMG-CoA generada en el citoplasma podía ser utilizada como sustrato para la síntesis mitocondrial de colesterol, ya que había sido descrito que la membrana interna de las mitocondrias era impermeable a los derivados de la coenzima A (143). En este sentido se observó que la HMG-CoA reductasa tenía la misma actividad tanto en la fracción mitocondrial proveniente de la interfase 40-50

del gradiente de sacarosa como en las mitocondrias sonicadas; pero los experimentos realizados para medir la velocidad y el control respiratorios no permiten asegurar si hay integridad mitocondrial. Por lo tanto, por los resultados obtenidos no se puede afirmar si la HMG-CoA citoplasmática, atraviesa o no la membrana interna de las mitocondrias.

Por otra parte, a pesar de haberse descrito (366) que en poblaciones celulares del testículo (incluyendo espermatogonias, células de Leydig y de Sertoli) ocurría la cetogénesis, no se encontró actividad de HMG-CoA liasa en las fracciones subcelulares obtenidas, por lo que la HMG-CoA no puede ser degradada a acetoacetato y 3-hidroxiacetato, excluyendo la existencia de un camino cetogénico en la célula de Leydig y descartando la interferencia de depleción de sustrato para la HMG-CoA reductasa.

Los descubrimientos en este estudio sugieren que todas las enzimas requeridas para la conversión de acetato a colesterol en células de Leydig, están específicamente localizadas en mitocondrias, y, probablemente, en cercana asociación con el complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol, encontrado en la membrana interna de la mitocondria (267,

296,354). Esto apoya la observación que la producción de pregnenolona endógena por mitocondrias testiculares aisladas, es del mismo orden de magnitud que la producción total de esteroides por el testículo entero (200,352).

En lo referente al aporte de colesterol para la síntesis de andrógenos en las células de Leydig, observaciones anteriores (101) y este mismo trabajo de Tesis (ver Sección III), sugieren que el testículo utiliza preferencialmente el colesterol sintetizado endogenamente. Este colesterol podría sintetizarse dentro de la mitocondria desde acetil-CoA, y este precursor de 2 carbonos puede provenir de piruvato, aminoácidos o de ácidos grasos por β -oxidación. Los fosfolípidos, por acción de fosfolipasas específicas, podrían liberar los ácidos grasos que atravesarían las membranas mitocondriales para su eventual degradación a acetil-CoA. La Figura II.5 muestra un esquema de la hipótesis propuesta.

De esta manera, el colesterol no necesitaría, al menos en parte, ser transportado desde el citoplasma hacia la mitocondria para transformarse en pregnenolona. Cuando fuese necesario, el colesterol intramitocondrial podría ser provisto por los depósitos citoplasmáticos o por las lipoproteínas plasmá-

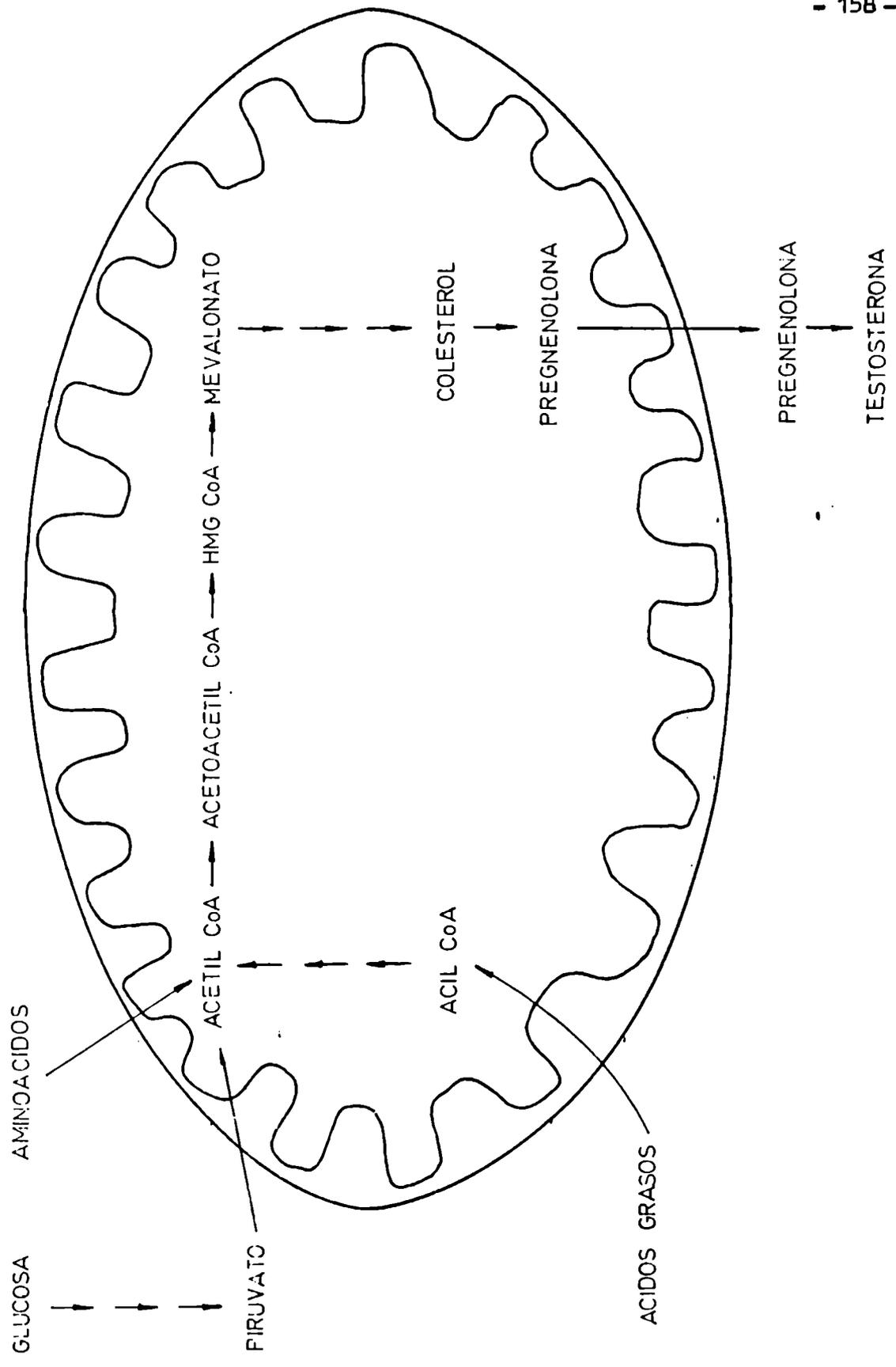


Figura II.5. Camino biosintético de colesterol a partir de acetyl-CoA en las mitocondrias de las células de Leydig del testículo de rata.

ticas después de la interacción de éstas con sus receptores de la membrana celular.

Desde otro punto de vista, muchas observaciones indican que las actividades enzimáticas en fracciones subcelulares aisladas, no siempre reflejan las actividades fisiológicas "in vivo". Sin embargo, a pesar de ello, se puede concluir que las mitocondrias de las células de Leydig tienen una función preponderante en la biosíntesis del colesterol, y que la regulación de este camino debido a su ubicación intracelular, puede estar sujeto a factores modulatorios distintos a los descriptos para hígado y glándula adrenal. La elucidación de esos factores contribuirá, indudablemente, a una mejor comprensión de los progresos involucrados en la esteroidogénesis de las células de Leydig.

Es por ello que los resultados mostrados, conducirían a una revisión de las extrapolaciones hechas en el testículo sobre la biosíntesis del colesterol, basadas en estudios realizados en otros tejidos y que son aceptados actualmente.

SECCION III.

REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA Y DEL
APORTE DE COLESTEROL PARA LA ESTEROIDOGE
NESIS EN CELULAS DE LEYDIG

RESULTADOS

Los hallazgos descriptos sobre la biosíntesis mitocondrial de colesterol y la existencia de receptores para LDL y HDL en células de Leydig, indujeron al estudio de la regulación por un lado, de la HMG-CoA reductasa, y por ende, de la síntesis de novo del precursor androgénico, y por otro, del aporte proveniente del plasma a través de la interacción de las lipoproteínas con las células intersticiales. Se utilizaron diversas condiciones experimentales y los resultados se detallan en los párrafos siguientes.

Los experimentos sobre regulación se llevaron a cabo con la HMG-CoA solubilizada por medio de un buffer con detergente, salvo especificación en contra. Ello se hizo porque los antecedentes sobre la enzima hepática indicaban que era difícil estudiar a la misma cuando estaba unida a la membrana microsomal.

RITMO CIRCADIANO DE LA HMG-CoA REDUCTASA

La existencia del ritmo diario de la HMG-CoA reductasa fue observado por primera vez en hígado de ratón (207) y luego en distintos tejidos de la rata. La actividad máxima de

la enzima es semejante en todos los casos y ocurre alrededor de la medianoche. En cambio, en la adrenal de hamster el pico máximo se detectó a las 19 horas (133).

Debido a que la secreción de testosterona por el testículo de la rata presenta un ritmo circadiano (31,261,363), se decidió determinar si existía alguna variación diaria en la actividad de la HMG-CoA reductasa de células de Leydig. La Figura III.1 muestra los resultados. Hubo una actividad máxima cerca de las 12 hs. y actividades similares en las restantes horas del día. Por ello, para los experimentos subsiguientes de regulación de la enzima, se decidió sacrificar a los animales en horarios cercanos al mediodía.

CONDICIONES DE ENSAYO PARA LA HMG-CoA REDUCTASA EN EXTRACTOS DE CELULAS DE LEYDIG.

La Figura III.2 muestra las condiciones óptimas para el ensayo de la HMG-CoA reductasa solubilizada. La formación de mevalonato, aumentando la cantidad de proteína hasta 50 ug, permaneció lineal hasta los 60 minutos; y las concentraciones de DL-HMG-CoA y NADPH con las que se llegó a la mitad de la actividad enzimática máxima, fueron a-

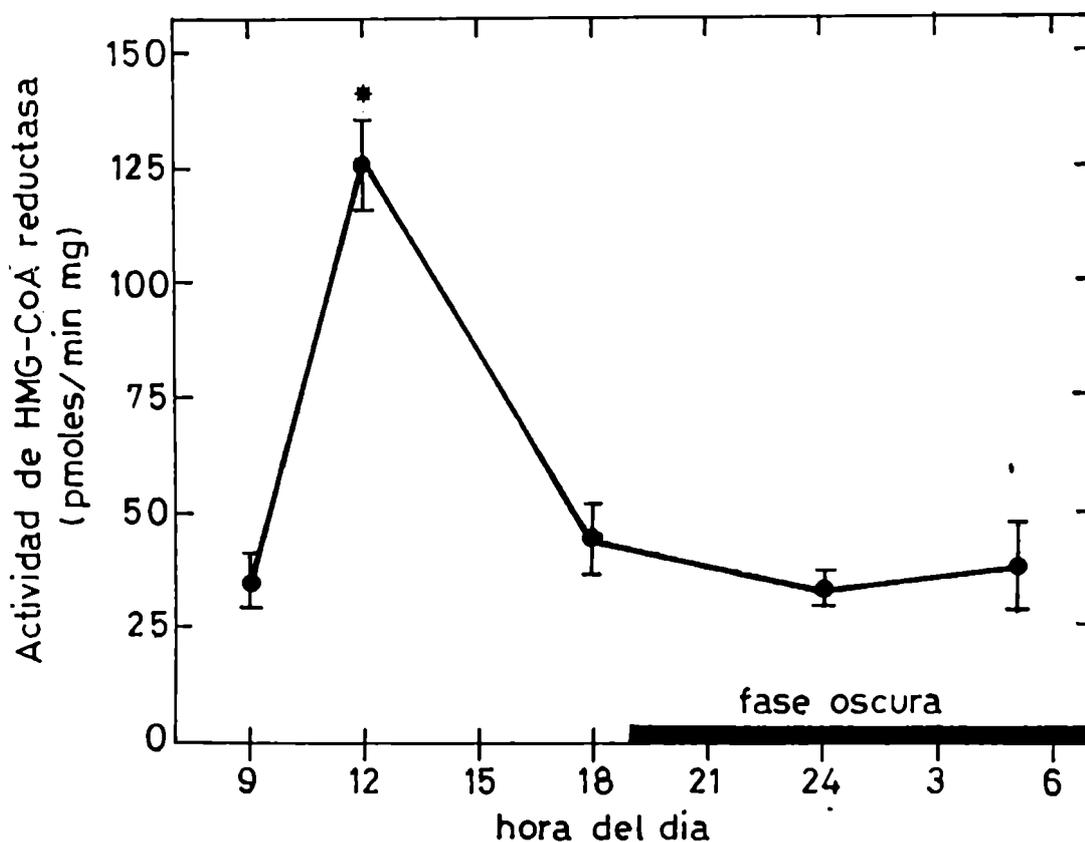


Figura III.1. Variaciones diurnas en la actividad de HMG-CoA reductasa. La actividad enzimática se midió en extractos de células de Leydig como se detalló en Materiales y Métodos. Los animales fueron mantenidos desde el nacimiento en un ritmo constante de luz-oscuridad como se indica en la figura y fueron sacrificados a las horas especificadas. Cada valor es el promedio \pm D.S. de incubaciones de 3 preparaciones celulares distintas.
*: $p < 0,001$ respecto a los valores de las restantes horas del día.

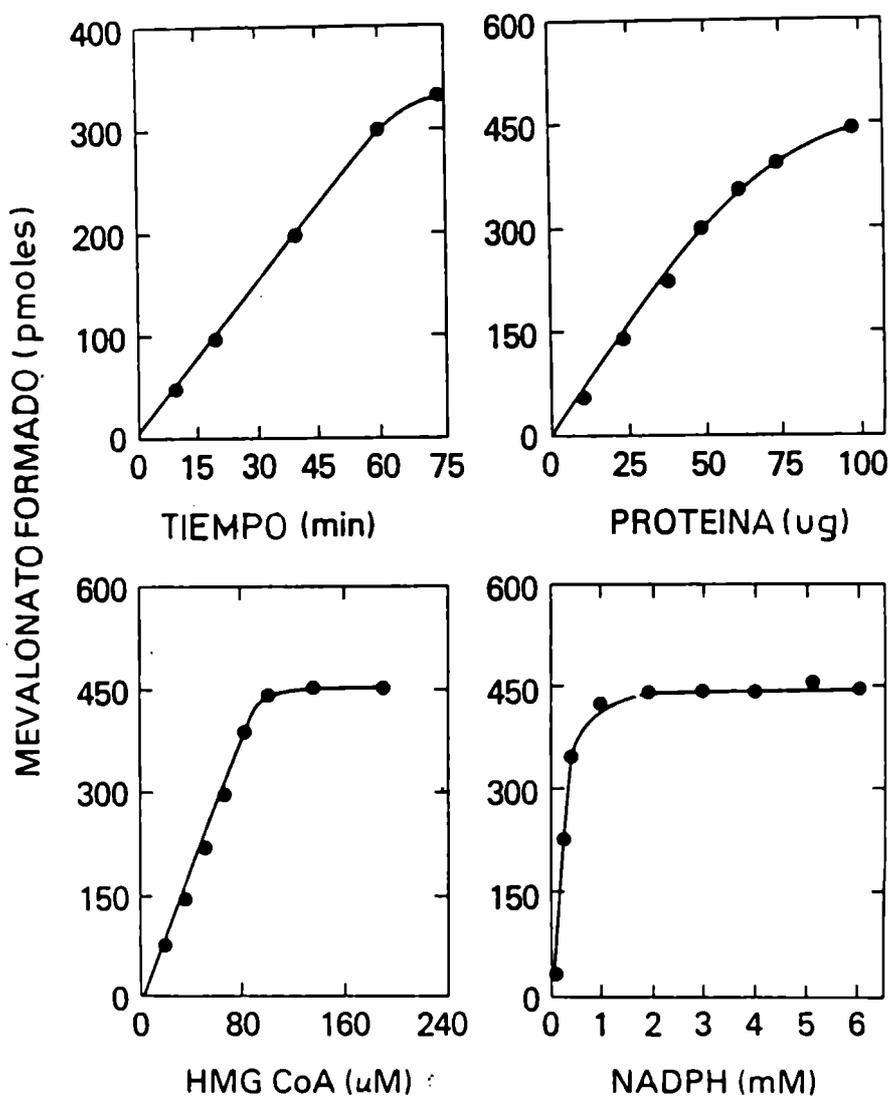


Figura III.2. Ensayo y propiedades de la actividad de la HMG-CoA reductasa en células de Leydig de la rata. Los extractos de células de Leydig se prepararon como se describió en Materiales y Métodos. Las incubaciones se realizaron a 37°C bajo las siguientes condiciones: (a) para tiempos crecientes, se incubaron 50 µg de proteínas con NADPH 5 mM y HMG-CoA 0,2 mM; (b) se incubaron concentraciones crecientes de proteínas celulares durante 30 minutos con las mismas concentraciones de NADPH y HMG-CoA que en (a); (c) se incubaron 50 µg de proteínas durante 30 minutos con NADPH 5 mM variando la concentración de HMG-CoA; (d) se incubaron 50 µg de proteínas durante 30 minutos con 0,2 mM de HMG-CoA y concentraciones variables de NADPH.

proximadamente 0,050 mM. Ya que sólo el D-isómero de la DL-HMG-CoA usada es activo, el verdadero valor de $S_{0,5}$ está alrededor de 0,025 mM

ACTIVIDAD DE LA HMG-CoA REDUCTASA DURANTE LA DESENSIBILIZACIÓN TESTICULAR INDUCIDA POR GONADOTROFINAS.

En el fenómeno de desensibilización testicular se han descrito dos tipos de lesiones en el camino enzimático esteroideogénico. Una lesión "tardía" o "lejana" que se caracteriza por un bloqueo dependiente de estrógenos, a nivel de la 17,20-desmolasa y de la 17-hidroxilasa, y un defecto biosintético anterior a la producción de pregnenolona que ocurre en células de Leydig tratadas con dosis altas de hCG (10 ug). Esta lesión "temprana" o "cercana" no es causada por estrógenos, ya que no se revierte con el antiestrógeno Tamoxifén (344) ni se reproduce por tratamiento con estradiol (276).

Para determinar si la HMG-CoA reductasa testicular podía ser modulada por gonadotrofinas "in vivo" y además si tenía alguna influencia en la naturaleza del bloqueo esteroideogénico "temprano" causado por la hormona trófica, se examinó el efecto del tratamiento de hCG sobre la actividad de la en-

zima en células de Leydig. Cuatro horas después de la inyección de 10 ug de hCG, la actividad de la HMG-CoA reductasa aumentó aproximadamente un 100% sobre los valores controles (Figura III.3). A tiempos posteriores (24 y 72 horas), se observó una marcada disminución en la actividad enzimática, coincidente con la depleción de receptores previamente descrita y con la aparición "temprana" en la biosíntesis de esteroides (118,276). Contrariamente, los animales tratados con la dosis más baja de hCG (2 ug), que sólo produce el bloqueo esteroidogénico "tardío", no mostraron cambios significativos en la actividad de la reductasa a los tiempos medidos (24 y 72 horas).

Para evaluar el funcionamiento del camino esteroidogénico entre la producción de mevalonato y colesterol, se incubaron células de Leydig de animales controles y desensibilizados (con 1 dosis de 10 ug de hCG) con ^{14}C -mevalonato en presencia de aminoglutetimida 1 mM (que inhibe el metabolismo del colesterol), y se midió la incorporación del precursor radiactivo a los esteroides precipitables por digitonina. Como se ve en la Figura III.4, las células desensibilizadas luego de 72 horas de tratamiento, no mostraron ninguna dis-

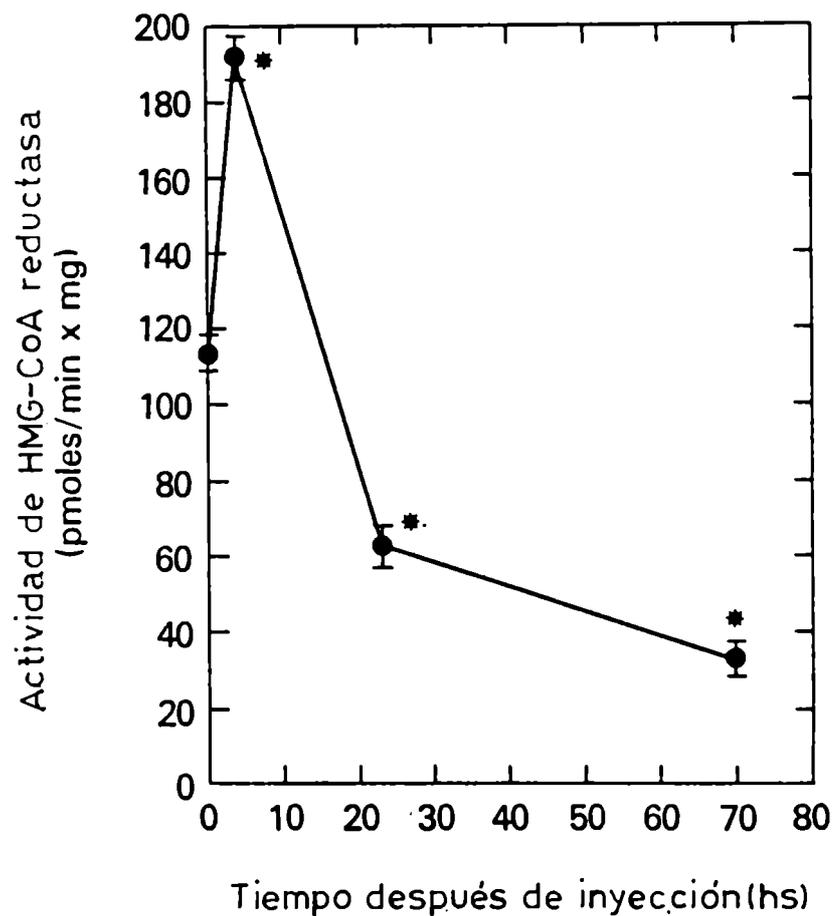


Figura III.3. Actividad de la HMG-CoA reductasa en extractos de células de Leydig después de la inyección subcutánea de 10 ug (200 U.I.) de hCG. Cada punto es el valor promedio \pm D.S. de incubaciones por duplicado de 3 preparaciones celulares distintas.
* : $p < 0,001$ respecto al tiempo cero (control).

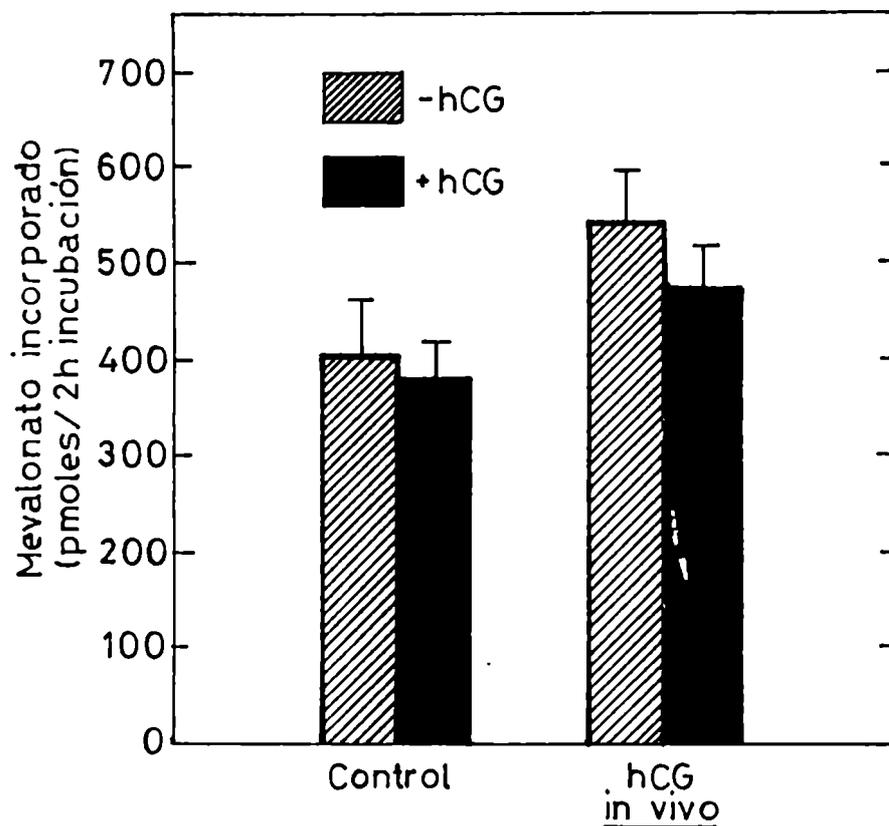


Figura III.4. Incorporación de ^{14}C -mevalonato a los esteroides precipitables por digitonina. Se incubaron células de Leydig (20×10^6 células/vial de incubación) de ratas controles y desensibilizadas por hCG (10 μg -72 horas) en la ausencia o presencia de hCG (100 ng) con MIX 0,1 mM y aminoglutetimida 1 mM durante 2 horas a 34°C . Los resultados son el promedio \pm D.S. de incubaciones por duplicado de 3 preparaciones celulares distintas.

minución en la incorporación de ^{14}C -mevalonato comparadas con las células de Leydig de animales controles. También es evidente que no se produjo estimulación por el agregado de hCG en ninguno de los dos lotes, probablemente debido a que los pasos entre mevalonato y colesterol no estén sujetos a modulación por gonadotrofinas.

En otro experimento, la incubación de células desensibilizadas con mevalonato no marcado restauró parcialmente la velocidad de producción de pregnenolona. Como se observa en la Tabla III.1, el agregado de 100 ug de mevalonato a células desensibilizadas (derecha), restauró la producción de pregnenolona al mismo nivel basal que en las células controles (izquierda), pero no aumentó la respuesta a la hCG "in vitro"; tampoco tuvo efectos adicionales sobre la esteroidogénesis en células normales, cuando se compara con la producción de pregnenolona en ausencia de precursores agregados al medio de incubación.

En cambio, el agregado de acetato, no influyó ni la actividad esteroidogénica de células de Leydig controles, ni las de las desensibilizadas, apoyando la observación que de las enzimas involucradas en los pasos desde acetato a mevalonato, al menos la HMG-CoA reductasa, está considerablemente

Tabla III.1.1. Producción de pregnenolona por células de Leydig controles y desensibilizadas en la presencia de acetato y mevalonato.

Incubación	Células controles	Células desensibilizadas
	ng/10 ⁶ células/2h.	ng/10 ⁶ células/2h.
hCG (100 ng)	-	+
Sin precursor exógeno	13,8 ± 5	40 ± 4
Acetato (100 ug)	14,2 ± 3	45 ± 7
Mevalonato (100 ug)	13,5 ± 4	42 ± 6
	5,0 ± 1,2	5,1 ± 0,8
	5,1 ± 1,0	5,6 ± 0,9
	12,2 ± 1,4 ^a	11,0 ± 2,9 ^a

Los valores son el promedio ± D.S. (n=4).

a: p < 0,001 respecto a las células desensibilizadas incubadas con acetato o sin precursor exógeno.

inhibida por una dosis desensibilizante de hCG.

INFLUENCIA DE LAS LIPOPROTEINAS TRANSPORTADORAS DE COLESTEROL
EN LA DESENSIBILIZACION TESTICULAR.

La determinación de la presencia de receptores para LDL y HDL en células de Leydig, permitió considerar la posibilidad que las lipoproteínas, bajo ciertas condiciones, pudiesen proveer el colesterol para la esteroidogénesis testicular.

Se utilizaron ratas desensibilizadas con 1 dosis de 10 ug de hCG, las cuales tenían la lesión esteroidogénica "temprana". En estos animales se había observado que los receptores para LH/hCG estaban significativamente disminuidos a las 24 horas, y que a las 72 horas la reducción llegaba a menos del 10% del total y luego había un retorno gradual a los valores controles (118). La respuesta de pregnenolona a la hCG "in vitro" estuvo reducida a las 18 y 24 horas y, como se observa en la Figura III.5 fue completamente abolida a las 72 horas. A este mismo tiempo, los niveles basales de pregnenolona también estuvieron marcadamente disminuidos, lo cual coincide con la reducción máxima de receptores para LH. Como se vio en el párrafo anterior, en tales células la actividad de HMG-CoA reducta

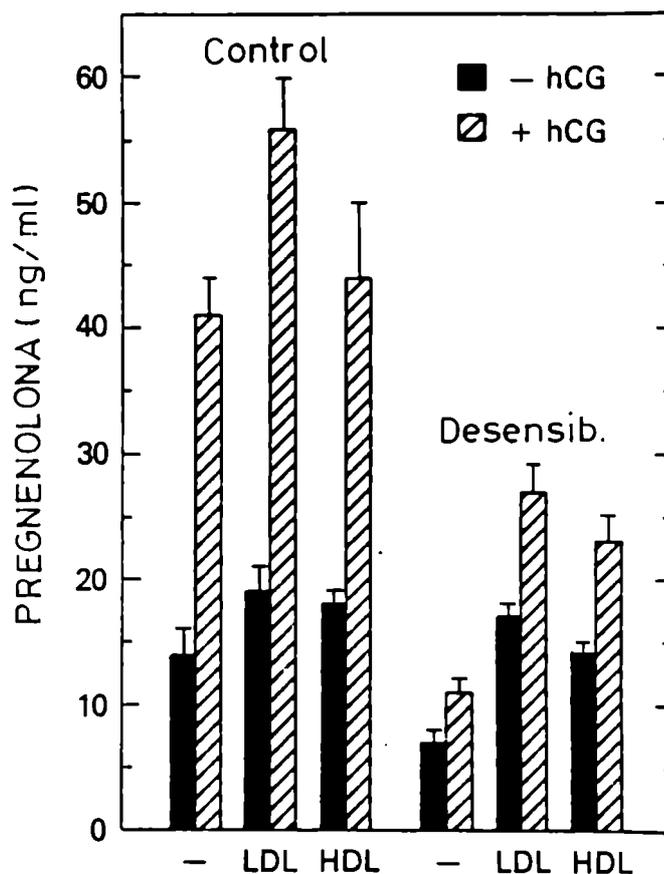


Figura III.5. Producción in vitro de pregnenolona por células de Leydig de animales controles y tratados con hCG, determinada 3 días después del tratamiento con 10 ug de la gonadotropina. Se midió la síntesis de pregnenolona a partir de precursores endógenos, en ausencia o presencia de 400 ug de LDL o HDL, durante la incubación con 100 ng de hCG en presencia de cianocetona 1 μ M y spironolactona 10 μ M durante 2 horas a 34°C. La figura contiene datos representativos de uno de 3 experimentos con resultados similares. Los valores son el promedio \pm D.S. de de terminaciones por duplicado en 2 preparaciones celulares distintas.

sa era menor a 24 y 72 horas después de la administración de hCG.

Estos resultados sugieren que la disminución en la producción de pregnenolona podría ser consecuencia de la actividad de la HMG-CoA reductasa disminuida. La Figura III.5 también muestra que hubo una reversión parcial de la lesión cuando las células de Leydig se incubaron en presencia de LDL o HDL, siendo ambas lipoproteínas igualmente efectivas si se las considera en cantidad de proteína agregada. En el mismo lote experimental, tanto la LDL como la HDL restituyeron la producción de pregnenolona basal a los mismos niveles que las ratas normales, pero no restauraron la respuesta a la estimulación gonadotrófica. Este último efecto podría estar relacionado a la disminución en el número de receptores de LH observado después de 72 horas de desensibilización.

Estas observaciones indican que una pérdida importante de receptores para LH, y presumiblemente de respuestas acopladas, es acompañada por daños en enzimas esteroideogénicas que incluyen a la HMG-CoA reductasa, y, posiblemente, a otros pasos asociados con el metabolismo del colesterol en las células de Leydig.

RECEPTORES DE LIPOPROTEINAS Y ACTIVIDAD DE HMG-CoA REDUCTASA
EN RATAS DESENSIBILIZADAS Y RESENSIBILIZADAS.

La administración de 1 dosis de 10 ug de hCG a ratas adultas, es seguida por una pérdida de receptores para LH en células de Leydig y de respuesta de AMP_c y testosterona a la estimulación "in vitro" con gonadotrofina. En cambio, una segunda dosis de hCG a los dos días posteriores a la primera, aunque mantiene disminuidos los receptores para LH y respuesta de AMP_c, permite restituir la producción de testosterona (75,78).

Para poder observar los efectos de 1 y 2 dosis de hCG sobre el aporte de colesterol para la esteroidogénesis, se determinaron la actividad de la HMG-CoA reductasa y la unión de las lipoproteínas a sus receptores en la célula de Leydig.

Para verificar que el tratamiento había sido efectivo se midieron, en las células, los receptores para LH/hCG y la producción de testosterona en respuesta a la estimulación con hCG. En la Tabla III.2 se indican los valores obtenidos que concuerdan con los datos previamente descritos (75,78).

La Figura III.6 muestra la actividad específica de la HMG-CoA reductasa. Hubo una disminución tanto en animales de-

Tabla III.2. Receptores de LH y producción de testosterona en células de Leydig de ratas controles e inyectadas con 1 ó 2 dosis de hCG.

	Receptor	Testosterona
	(fmoles/10 ⁶ células de Leydig)	(ng/10 ⁶ células de Leydig)
		Basal + hCG
Control	36.500 ± 4.200	40 ± 10 460 ± 42
1 dosis	1.260 ± 210	200 ± 7 200 ± 22
2 dosis	1.270 ± 130	220 ± 21 980 ± 78

Los valores son el promedio ± D.S. de incubaciones de 3 preparaciones celulares distintas.

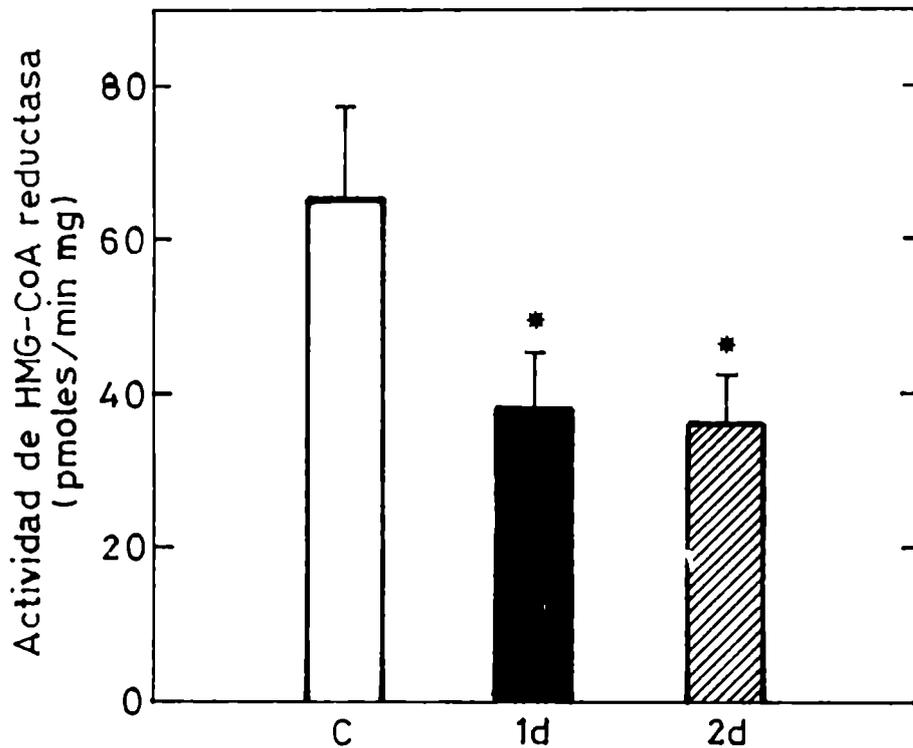


Figura III.6. Actividad de HMG-CoA reductasa en extractos de células de Leydig de animales controles y tratados con 1 (1d) ó 2 dosis (2d) de 10 ug de hCG, determinada 3 días después de la inyección de la gonadotropina. Los resultados son el promedio \pm D.S. de incubaciones de 3 preparaciones celulares
* : $p < 0,05$ respecto al control

sensibilizados como en los resensibilizados respecto a los con
troles. Cabe aclarar que estos resultados no sólo fueron obtenido
s con células de Leydig purificadas con un colchón de metri-
zamida al 11%, sino también con una subpoblación de células
(banda II) obtenidas por pasaje a través de un gradiente dia-
contínuo de la droga, las cuales son consideradas células de
Leydig maduras (28). Los resultados con animales desensibilizad
os son similares a los descritos anteriormente en este tra-
bajo.

Con respecto a los animales resensibilizados, Calvo y
col. (78) sugirieron una reversión parcial de los bloqueos en-
zimáticos "tardíos" generados en ratas desensibilizadas. A pe-
sar de ello y según se vio ahora, seguiría existiendo un bloqueo
a nivel de la HMG-CoA reductasa luego de 2 inyecciones de
hCG.

En lo referente a la unión de lipoproteínas de alta
densidad (HDL) a membranas de células de Leydig, los datos pro-
cesados según el análisis de Scatchard mediante un programa de-
sarrollado en una computadora HP 86 por el Dr. J.C. Calvo (Ins-
tituto de Biología y Medicina Experimental) se indican en la
Tabla III.3. Se observa un aumento del número de sitios sin

Tabla III.3. Constantes de disociación (Kd) y número de sitios (B_0) de la unión de $^{125}\text{-I-h-HDL}$ a membranas de células de Leydig de ratas controles e inyectadas con 1 ó 2 dosis de hCG.

	Kd (ng HDL/ml)	B_0 (ng HDL/mg de proteína de membrana)
Control	152	403
1 dosis	144	610
2 dosis	168	580

Los valores obtenidos fueron procesados según un análisis de Scatchard y utilizando el dato de máxima capacidad de unión (MCU).

cambios en la constante de disociación (Kd) tanto en los animales desensibilizados como resensibilizados.

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON 4-APP SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS EN CELULAS DE LEYDIG.

La droga 4-aminopirazolopirimidina (4-APP) bloquea la liberación de lipoproteínas desde el hígado hacia el torrente sanguíneo y de esta forma reduce los niveles circulantes del colesterol. Por esta razón, el 4-APP se utilizó para estudiar la colesterogénesis en tejidos extrahepáticos y para evaluar la contribución del colesterol plasmático en la esteroidogénesis de las gónadas y de la glándula adrenal (6,22,55,106).

Los experimentos presentados en esta parte del trabajo se realizaron para determinar los efectos del 4-APP sobre la función endócrina de las células de Leydig.

Luego de la administración de la droga a los animales, los niveles plasmáticos del colesterol disminuyeron más que el 90%. Esta disminución de 64 mg/100 ml a 3,9 mg/100 ml fue acompañada por una marcada reducción en la concentración sérica de testosterona (aproximadamente 92%) tal como se indica en la Tabla III.4. Esta brusca declinación, llevó a determi

Tabla III.4. Niveles séricos de colesterol, testosterona y LH y contenido hipofisario de LH en ratas normales y tratadas con 4-APP.

	Tratamiento	
	Control	4-APP
Colesterol (mg/dl)	64 ± 7,1 (10)	3,9 ± 0,44 (18) ^b
Testosterona (ng/dl)	346 ± 78 (10)	28 ± 4,4 (18) ^b
LH sérica (ng/ml)	38 ± 3,2 (18)	12 ± 2,8 (19) ^b
LH hipofisaria (ug/hipófisis)	569 ± 25 (19)	648 ± 24 (24) ^a

Los valores son el promedio ± D.S. del número de animales indicado entre paréntesis.

a: p < 0,05

b: p < 0,001

nar la producción de testosterona "in vitro" por las células de Leydig estimuladas con hCG en ratas normales y tratadas con 4-APP. La Figura III.7 indica respuestas casi idénticas. El hecho que las células del grupo tratado con 4-APP tuvieran el 50% de los receptores para LH/hCG (Figura III.8) no impidió que ambos lotes respondieran 15 veces sobre el basal a la estimulación máxima con hCG, con un valor de 95 ng de testosterona/ 10^6 células y un ED_{50} de 50 pg de hCG (Figura III.7).

Además de la reducción del número de receptores para LH en células de Leydig, se pensó que era posible que el tratamiento con 4-APP produjera otros efectos deletéreos sobre el sistema endócrino. En efecto, contrariamente a lo esperado, la LH plasmática disminuyó significativamente, y además hubo un aumento en el contenido hipofisario de la hormona (Tabla III.4), sugiriendo que la droga inhibe la liberación de la gonadotropina a la circulación general. Otra alteración observada fue la disminución de los receptores para prolactina en células de Leydig (Figura III.8).

Desde el punto de vista del aporte de colesterol para la síntesis de esteroides, un hallazgo interesante e

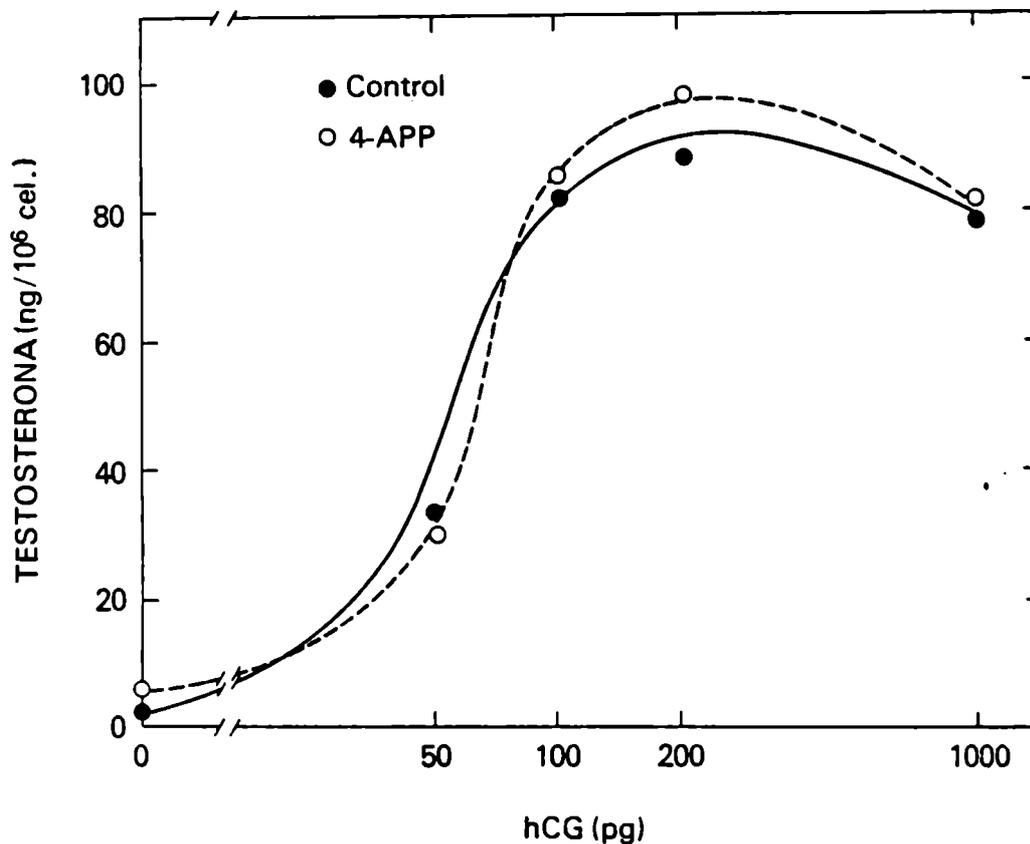


Figura III.7. Producción de testosterona por células de Leydig de ratas controles y tratadas con 4-APP (50 mg/Kg de peso corporal/día, 3 días) por incubación con distintas concentraciones de hCG. Cada punto es el promedio de valores de incubaciones por triplicado.

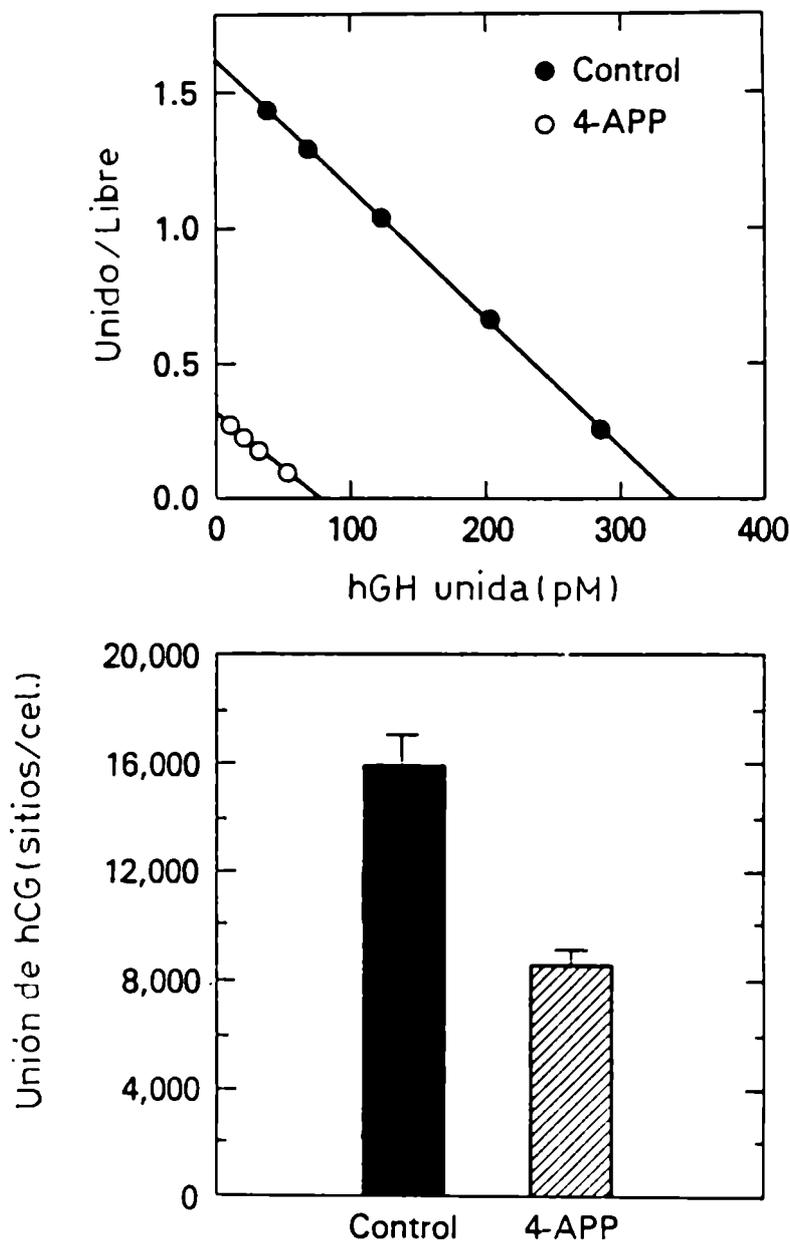


Figura III.8. Receptores de LH/hCG y lactogénicos en células de Leydig de ratas controles y tratadas con 4-APP (50 mg/kg peso corporal/día, 3 días). Panel superior: gráficos de Scatchard de los datos de unión obtenidos por incubación de membranas de células de células de Leydig con distintas concentraciones de hormona de crecimiento humana (hGH). Panel inferior: sitios de unión de LH/hCG en células de Leydig. Los resultados son el promedio \pm D.S. de incubaciones por duplicado de 2 preparaciones.

inesperado fue que la actividad de la HMG-CoA reductasa testicular no varió después del tratamiento con 4-APP (Figura III.9); en cambio, la enzima adrenal mostró un considerable aumento en su actividad cuando se bloqueó la secreción de lipoproteínas, tal como se había descrito previamente (25). Estos resultados indican que la HMG-CoA reductasa testicular, contrariamente a la de otros tejidos, no está regulada por los niveles de colesterol circulante.

La otra fuente de colesterol esteroideogénico proviene de las lipoproteínas, por lo que fue interesante estudiar la regulación de la unión de HDL a células de Leydig de animales inyectados con 4-APP. La Figura III.10 muestra un gráfico de Scatchard de la unión de ^{125}I -HDL. Hubo un aumento de sitios receptores de 85 ng de proteína de HDL/mg de proteína de membrana en el grupo control a 159 ng de proteína de HDL/mg de proteína de membrana en el grupo tratado, sin cambios en la constante de afinidad.

Anteriormente, se describió el efecto del agregado de lipoproteínas al medio de incubación de células de Leydig desensibilizadas (Figura III.5). Para poder examinar este modelo experimental en una situación en la cual las células testicu-

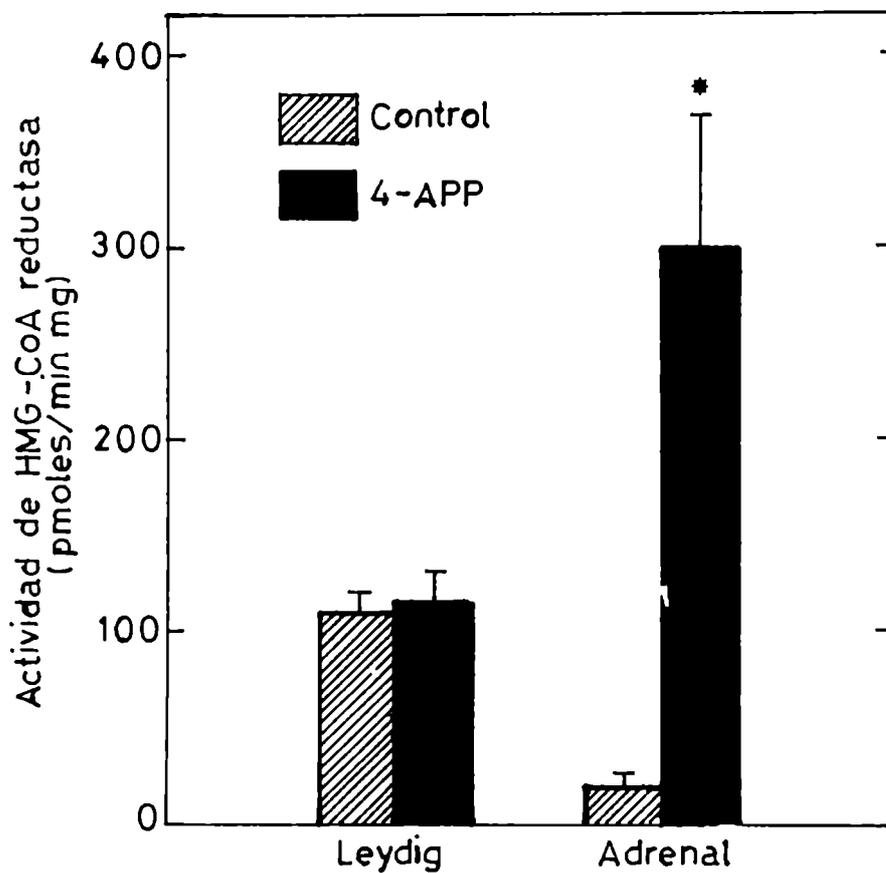


Figura III.9. Actividad de HMG-CoA reductasa en extractos de células de Leydig y glándulas adrenales de ratas controles y tratadas con 4-APP (50 mg/Kg de peso corporal/día, durante 3 días). Los resultados son el promedio \pm D.S. de incubaciones por duplicado de 3 preparaciones celulares distintas.
* : $p < 0,01$ respecto a su control.

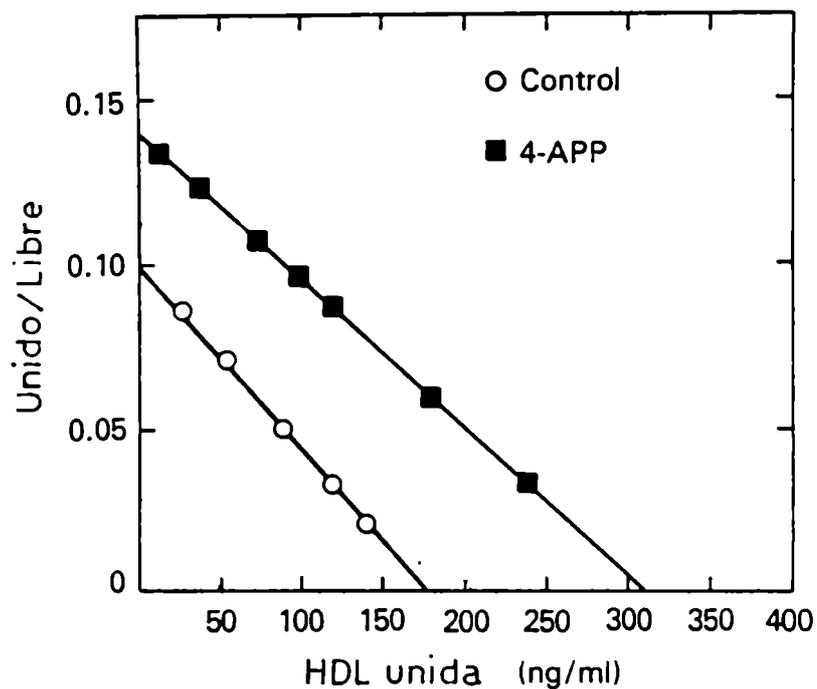


Figura III.10. Análisis de Scatchard de la unión de ^{125}I -h-HDL a membranas de células de Leydig de animales controles y tratados con 4-APP (50 mg/Kg de peso corporal/día, durante 3 días). Se incubaron alícuotas de membranas celulares con varias concentraciones de h-HDL marcada (100 cpm/ng de proteína de HDL).

lares también estuviesen depletadas de lipoproteínas, se inyectaron 10 ug de hCG el mismo día que la primera dosis de 4-APP. Los resultados de la Figura III.11 demuestran la desensibilización de los animales según se juzga por la producción de pregnenolona "in vitro" bajo estimulación con hCG. Tanto el agregado de LDL como de HDL a los medios de incubación restauró la producción de pregnenolona a los valores basales, pero a diferencia del caso anterior, no restauró la respuesta hormonal.

REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA POR FACTORES MODULATORIOS INTRACELULARES.

Los trabajos realizados acerca de la regulación aguda de la HMG-CoA reductasa hepática, indican que la enzima se modula por fosforilaciones y defosforilaciones. Por ello, se aislaron distintas fracciones a partir de hígado y de células de Leydig, de acuerdo a técnicas previamente descritas, y se incubaron con microsomas de hígado y mitocondrias de células de Leydig como fuentes enzimáticas, como se detalló en Materiales y Métodos.

La Figura III.12 muestra que la enzima hepática fue modulada tanto por los factores homólogos como por los heterólogos tal como se esperaba. En cambio, la HMG-CoA reductasa tes-

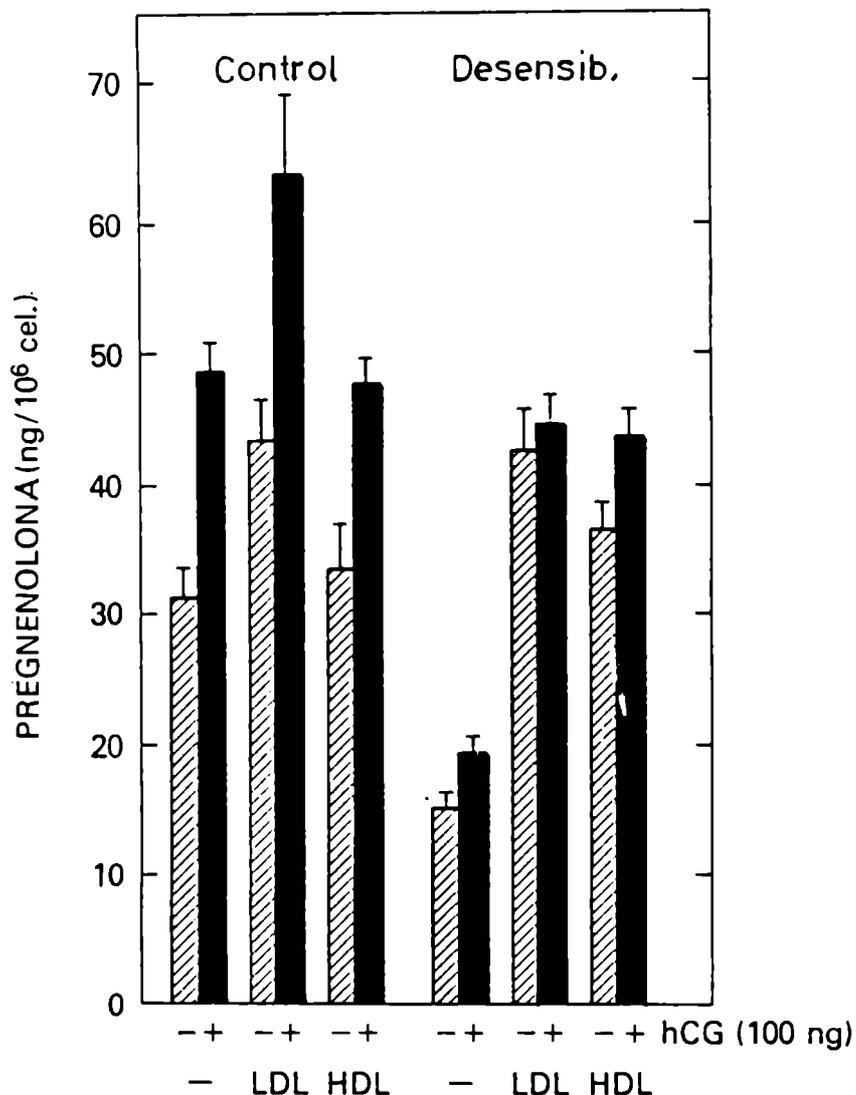


Figura III.11. Producción *in vitro* de pregnenolona por células de Leydig de animales tratados con 4-APP (50 mg/Kg de peso corporal/día, durante 3 días) y con 4-APP + hCG, determinada 3 días después de la inyección con 10 ug de la gonadotropina. Se midió la síntesis de pregnenolona a partir de precursores endógenos, en ausencia o presencia de 400 ug de LDL o HDL, durante la incubación con 100 ng de hCG en presencia de cianocetona 1 uM y spironolactona 10 uM, durante 2 horas a 34°C. La figura contiene datos representativos de 1 de 3 experimentos con resultados similares. Los valores son el promedio \pm D.S. de determinaciones por duplicado en 2 preparaciones celulares distintas.

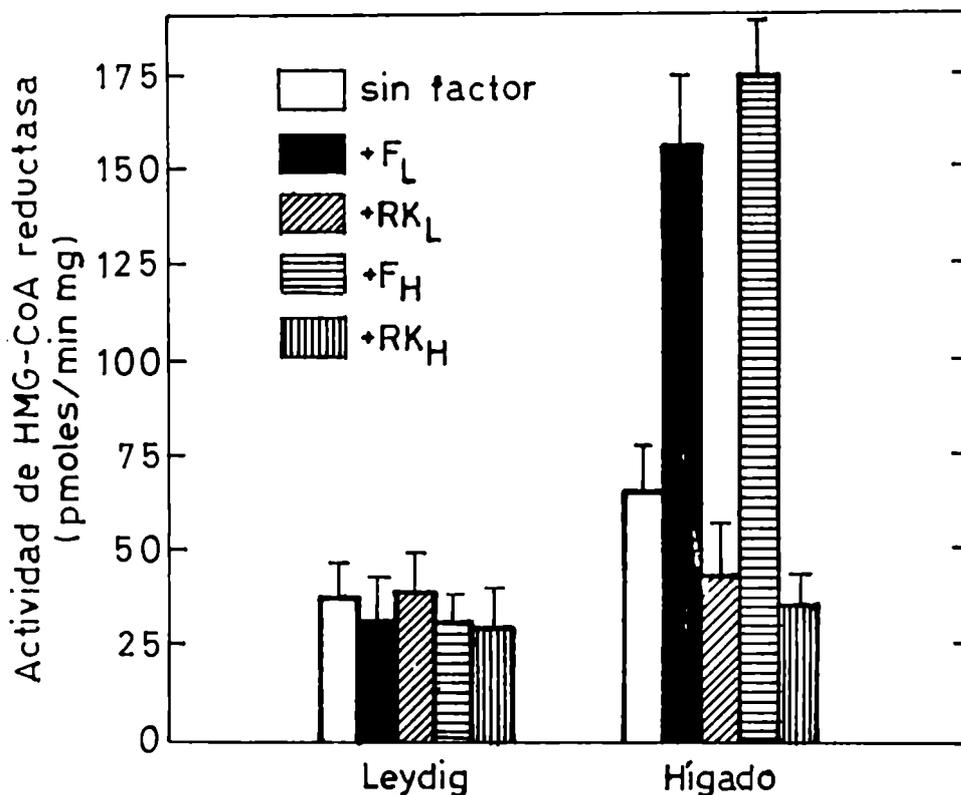


Figura III.12. Actividad de HMG-CoA reductasa en mitocondrias purificadas de células de Leydig y en microsomas de hígado de rata en presencia de factores moduladores intracelulares. Alícuotas de las fracciones subcelulares obtenidas se incubaron con los activadores (F_L y F_H) y con los inhibidores (RK_L y RK_H) obtenidos de células de Leydig e hígado respectivamente, tal como se especificó en Materiales y Métodos. Luego se determinó la actividad de la HMG-CoA reductasa. Los resultados son el promedio ± D.S. de incubaciones de 2 preparaciones celulares.

ticular no varió su actividad en ninguno de los casos.

OTROS FACTORES REGULATORIOS DE LA ACTIVIDAD DE LA HMG-CoA REDUCTASA Y DE LA FUNCION TESTICULAR.

Entre otros factores hormonales, la prolactina y la insulina intervienen en la regulación endócrina de las células de Leydig y por ello se decidió estudiar si modulaban la actividad de la HMG-CoA reductasa de las células intersticiales.

La influencia de la prolactina sobre la enzima se determinó en animales hipoprolactinémicos e hiperprolactinémicos tratados como se indicó en Materiales y Métodos. La efectividad de los tratamientos se puso de manifiesto por los valores plasmáticos de prolactina (Figura III.13).

El tratamiento con bromocriptina, que disminuyó considerablemente la prolactina sérica, y que según se describió (336) también provoca una disminución en la testosterona sérica y una inhibición de la respuesta esteroideogénica, ocasionó una reducción en la actividad de la HMG-CoA reductasa (Tabla III.5). En cambio, la hiperprolactinemia experimental, ya sea por administración de prolactina (oPRL) o por tratamiento con sulpirida, no modificó la actividad enzimática. Tampoco varió la acti-

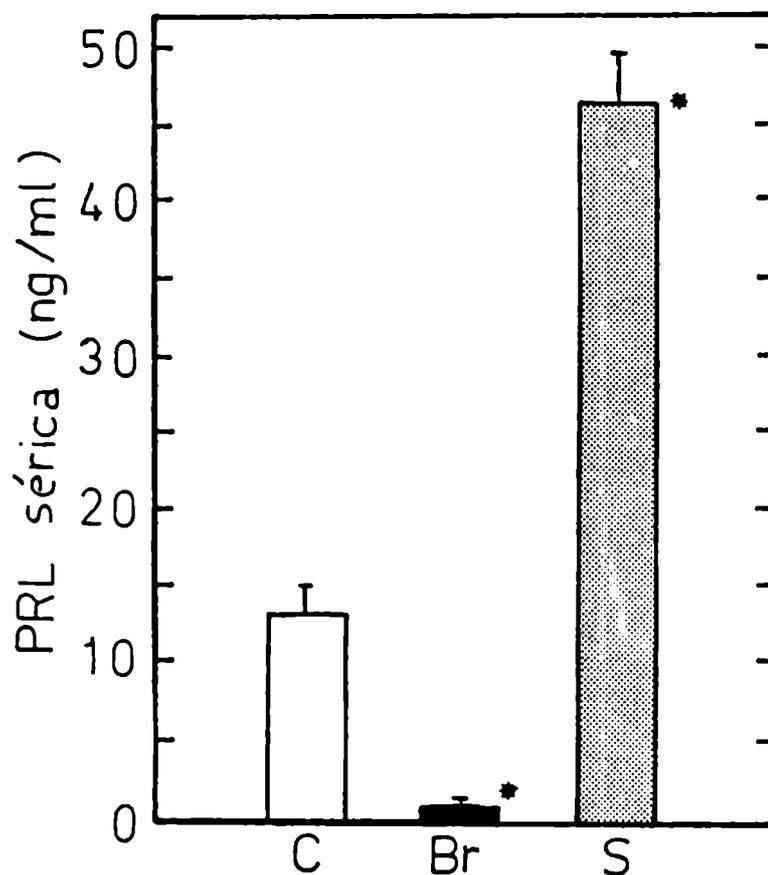


Figura III.13. Niveles séricos de prolactina (PRL) en animales controles (C), y tratados durante 9 días con bromocriptina (Br) (3 mg/Kg de peso corporal/día) o sulpirida (S) (43 mg/Kg de peso corporal/día). Cada barra representa el promedio \pm D.S. de las determinaciones correspondientes a 10 animales, realizadas por duplicado.
*: $p < 0,05$

Tabla III.5. Actividad específica de HMG-CoA reductasa en extractos de células de Leydig de ratas controles, hiperprolactinémicas e hipoprolactinémicas.

Tratamiento		Actividad específica (pmoles/mg min)
Control		56 ± 6,5
Prolactina (ug/rata/día)	50 ug	48 ± 2,5
	250 ug	47 ± 4,2
	500 ug	49 ± 1,7
Sulpirida (43 mg/Kg peso/día)		54 ± 0,7
Bromocriptina (3 mg/Kg peso/día)		42 ± 4,1*

Los resultados son el promedio ± D.S. de incubaciones de 3 preparaciones celulares distintas.

* : $p < 0,05$

vidad cuando las células de Leydig fueron incubadas en presencia de 20 ug de oPRL (Figura III.14)

Por otra parte, la diabetes experimental por estreptozotocina induce cambios en la función del testículo determinando una menor producción de testosterona. Debido a ello, se decidió ver si el estado diabético provocado por falta de insulina modificaba la síntesis de novo del colesterol en células de Leydig, midiendo la actividad de la enzima reguladora del camino. En la Figura III.15 se observa una disminución en la actividad enzimática de las ratas diabéticas, a diferencia de la actividad de la HMG-CoA reductasa adrenal que mostró un aumento considerable.

Además de la prolactina y la insulina, hay observaciones que sugieren que las hormonas tiroideas pueden afectar la función endócrina del testículo. Por lo tanto, se intentó determinar si el hipotiroidismo y el hipertiroidismo experimental tenían alguna influencia sobre la HMG-CoA reductasa de células de Leydig.

La mayoría de los trabajos sobre el eje tiroideo-testicular se realizaron con animales adultos, pero no hay dudas que la interrelación entre estas dos glándulas de secreción

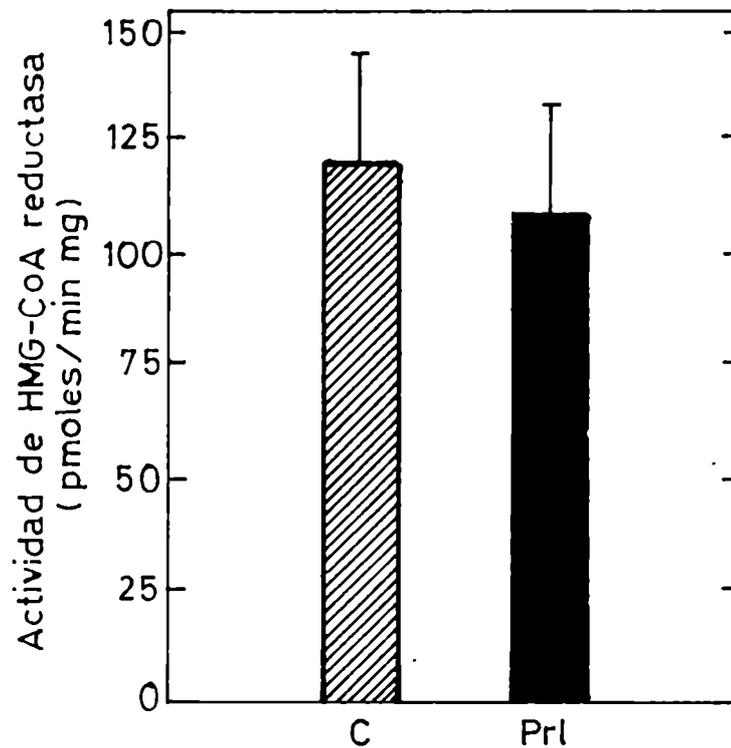


Figura III.14. Actividad de HMG-CoA reductasa en extractos de células de Leydig preincubadas en ausencia (C) o presencia de 20 ug de prolactina (Prl) a 34°C durante 3 horas. Cada barra representa el promedio \pm D.S. de determinaciones en 3 preparaciones celulares distintas.

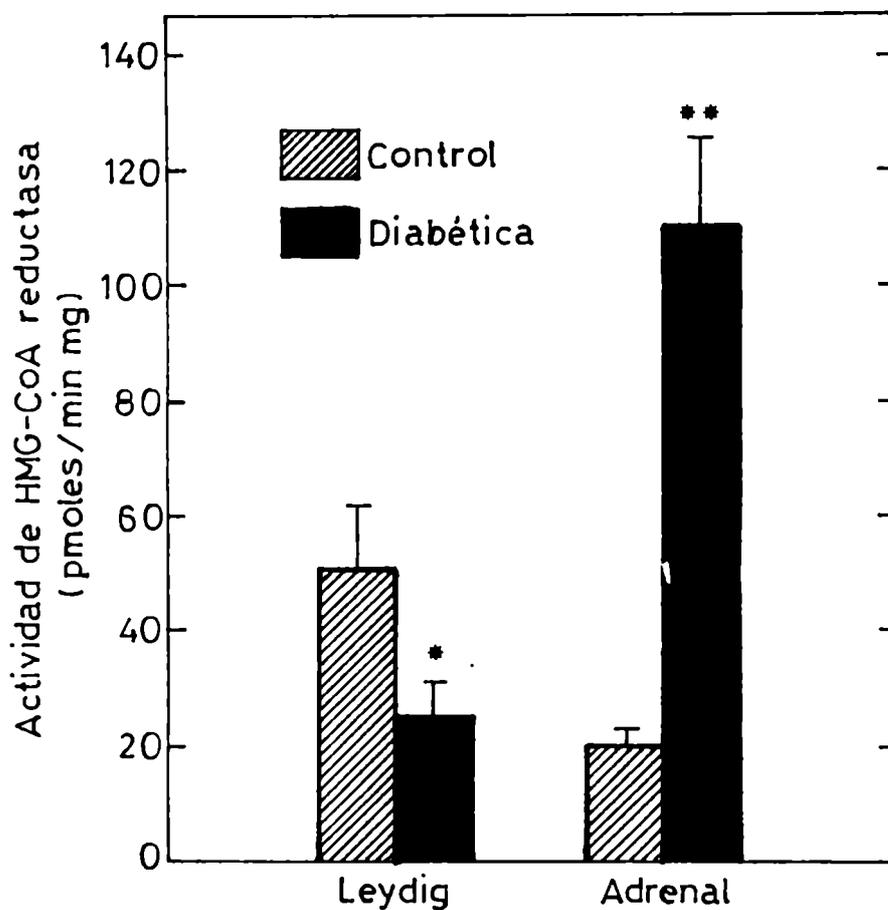


Figura III.15. Actividad de HMG-CoA reductasa en extractos de células de Leydig y de glándulas a drenales de ratas controles y diabéticas tratadas con estreptozotocina (1 dosis de 65 mg/Kg de peso corporal). Los animales fueron sacrificados 30 días después de la inyección. Cada barra representa el promedio \pm D.S. de incubaciones de 3 preparaciones distintas.
*: $p < 0,05$ respecto al control
**: $p < 0,005$ respecto al control

interna es afectada por la edad y que ocurren profundas alteraciones fisiológicas en el pasaje del estado prepupal hacia el adulto (277).Entonces,el modelo experimental elegido fue el de ratas prepúberes sometidas a un tratamiento crónico hasta el estadio de madurez sexual como se especificó anteriormente.

El tratamiento fue seguido por la inspección de la glándula tiroides y por la determinación de los niveles séricos de T_4 , T_3 y TSH.La Tabla III.6 muestra que el grupo hipotiroideo (Tx) tuvo significativamente disminuidos los valores de T_4 y T_3 respecto al control,con un aumento en la TSH.El grupo hipertiroideo (Hr) presentó un aumento de T_4 y T_3 y una disminución significativa en el nivel de TSH.Aunque no se realizó un control de captación de alimentos por parte de los animales en estudio,la duración de los tratamientos fue lo suficientemente prolongada como para asegurar estados patológicos bien establecidos (311,312).

La actividad de la HMG-CoA reductasa disminuyó significativamente tanto en los animales hipo como hipertiroideos (Figura III.16).En cambio,la preincubación de las células de Leydig con T_4 10^{-5} M no modificó la actividad enzimática respecto al control (Figura III.17).

Tabla III.6. Niveles séricos de T₄, T₃ y TSH en ratas controles(C), hipotiroi
deas(Tx) e hipertiroideas(Hr).

	Tratamiento		
	C	Tx	Hr
T ₄ (ug/dl)	5,2 ± 0,9	1,1 ± 0,5 ^c	14,1 ± 3,4 ^b
T ₃ (ng/dl)	142 ± 18	58 ± 15 ^c	207 ± 64
TSH (ng/ml)	297 ± 66	4392 ± 1220 ^b	176 ± 67 ^a

Los valores son el promedio ± D.S. de determinaciones en 6 animales.

a: p < 0,05

b: p < 0,005

c: p < 0,001

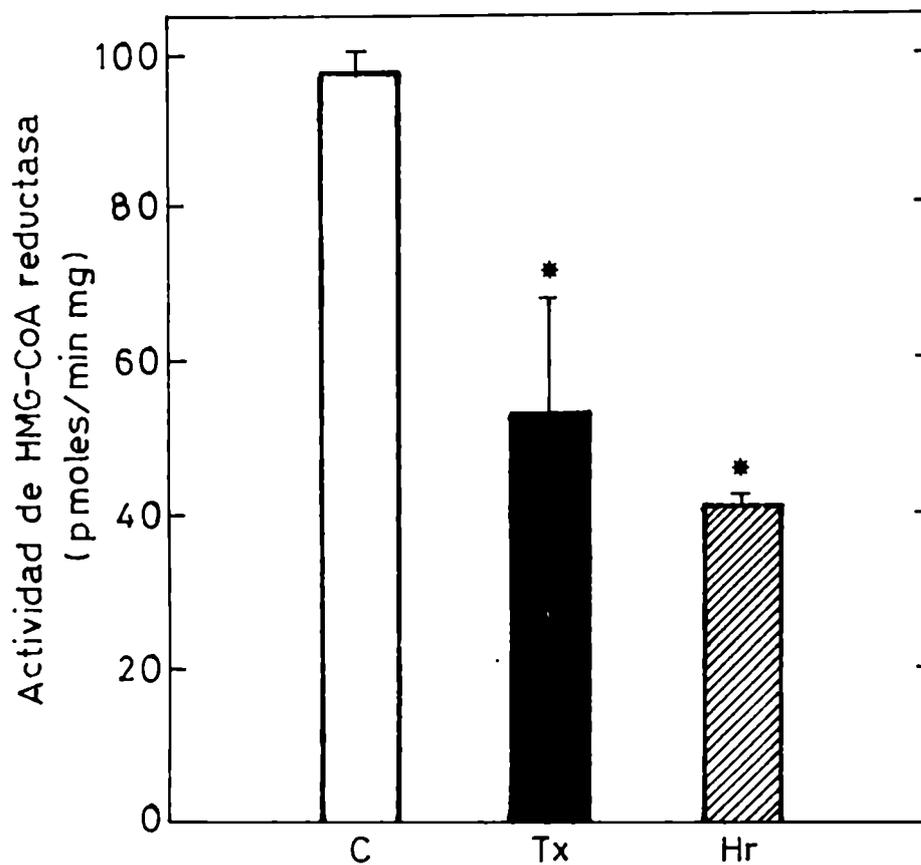


Figura III.16. Actividad de HMG-CoA reductasa en extractos de células de Leydig obtenidas de animales controles (C), hipotiroideos (Tx) e hipertiroideos (Hr) tratados como se describió en Materiales y Métodos. Cada barra representa el promedio \pm D.S. de incubaciones de 3 preparaciones.
* : $p < 0,05$

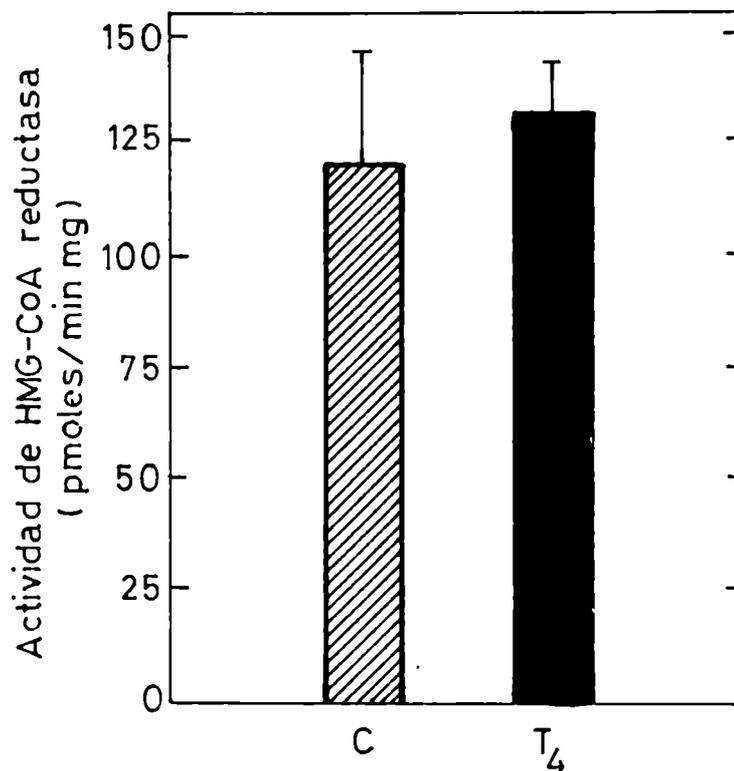


Figura III.17. Actividad de HMG-CoA reductasa en extractos de células de Leydig preincubadas en ausencia (C) o presencia de tiroxina (T₄) 10⁻⁵ M, a 34°C durante 3 horas. Cada barra representa el promedio ± D.S. de incubaciones de 3 preparaciones celulares distintas.

Para correlacionar los resultados obtenidos con la sin tesis de testosterona, se incubaron células de Leydig en presencia de 0-5 ng de hLH y se midió la producción del andrógeno y del AMP_c liberado al medio de incubación.

En la Figura III.18 se observa que los animales hipertiroideos presentaron un basal de testosterona aproximadamente 3 veces mayor que los controles, con una respuesta máxima similar, en concordancia con el AMP_c liberado (Figura III.19). Respecto al grupo hipotiroideo, mostró el mismo valor basal que los controles con una respuesta máxima de testosterona netamente disminuída (Figura III.18), pero no hubo variaciones en la liberación del nucleótido cíclico, comparado con los controles (Figura III.19).

También se cuantificaron los niveles séricos de testosterona en los mismos animales, observándose que, tanto los hipotiroideos como los hipertiroideos, tenían las concentraciones circulantes significativamente disminuídas respecto a las ratas controles (Figura III.20).

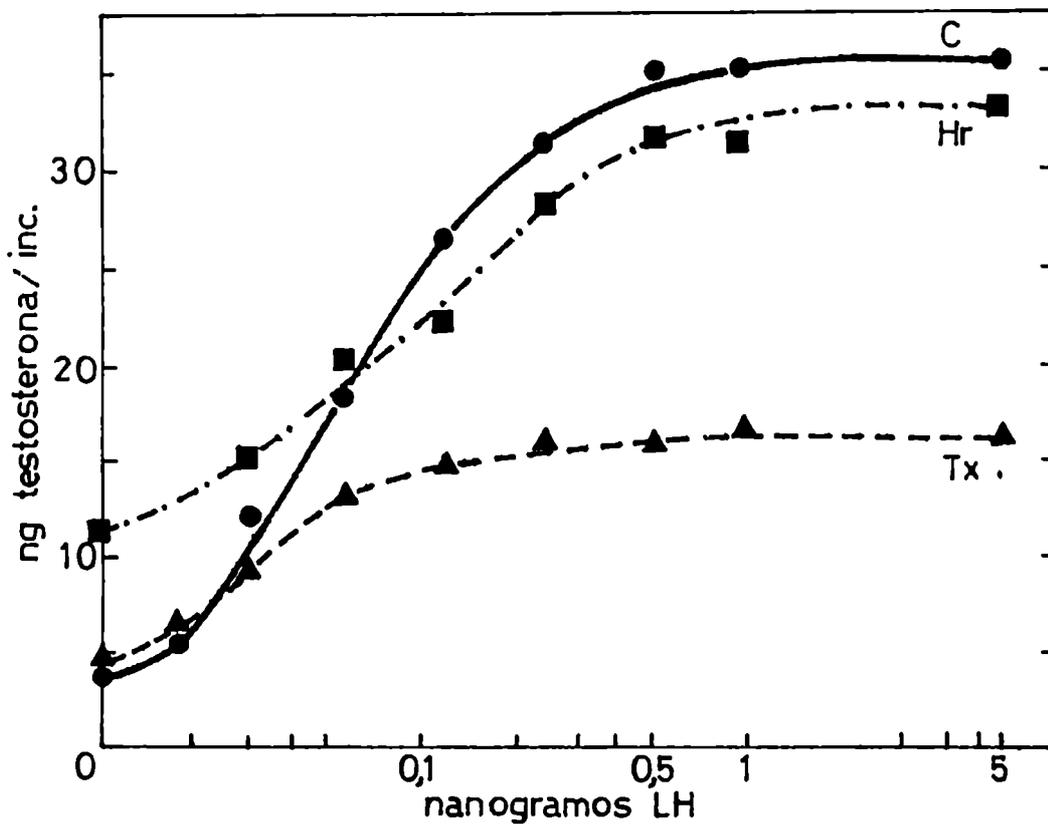


Figura III.18. Producción de testosterona por células de Leydig de ratas controles (C), hipotiroideas (Tx) e hipertiroideas (Hr) tratadas como se describió en Materiales y Métodos. Las células de Leydig (2×10^6 células/incubación) se incubaron en presencia de distintas concentraciones de hLH. Cada punto es el promedio de valores de incubaciones por triplicado.

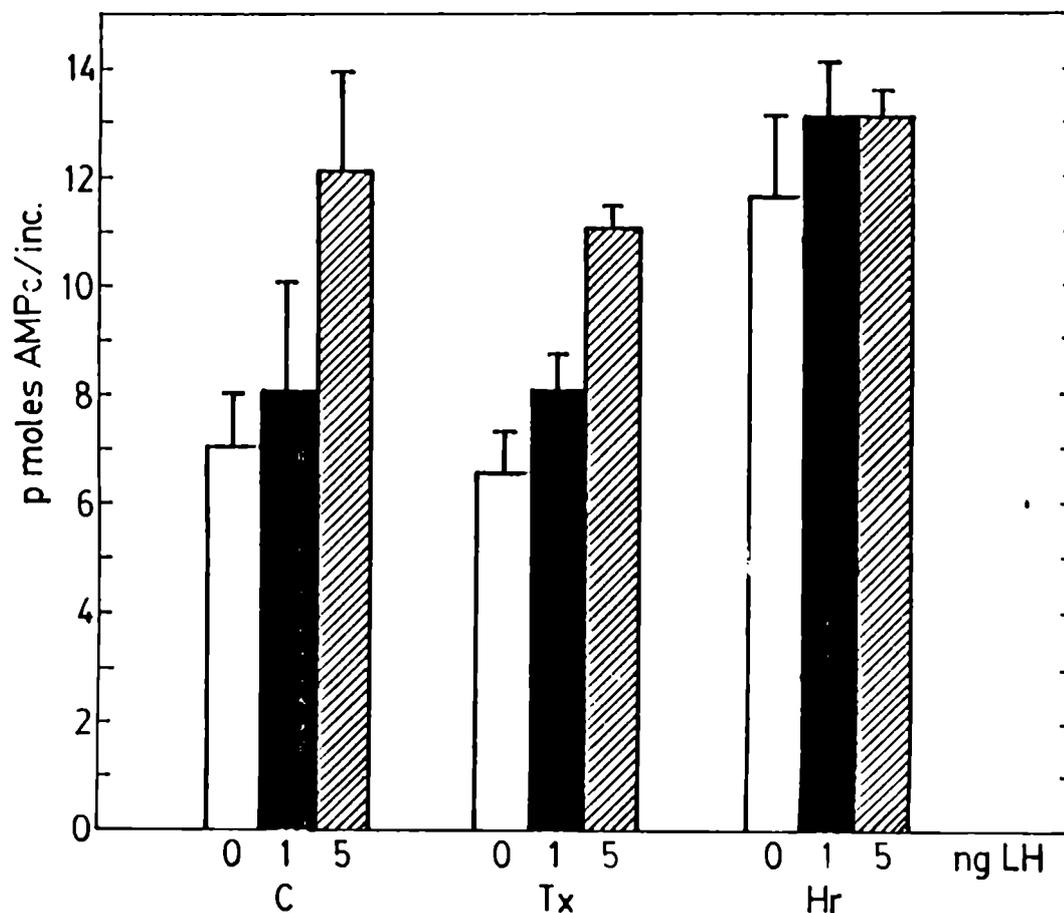


Figura III.19. Producción de AMP por células de Leydig de ratas controles (C), hipotiroideas (Tx) e hipertiroideas (Hr) tratadas como se describió en Materiales y Métodos. Las células de Leydig (2×10^6 células/incubación), se incubaron en ausencia (0) o en presencia de 1 y 5 ng de hLH. Cada barra representa el promedio \pm D.S. de valores de incubaciones por triplicado.

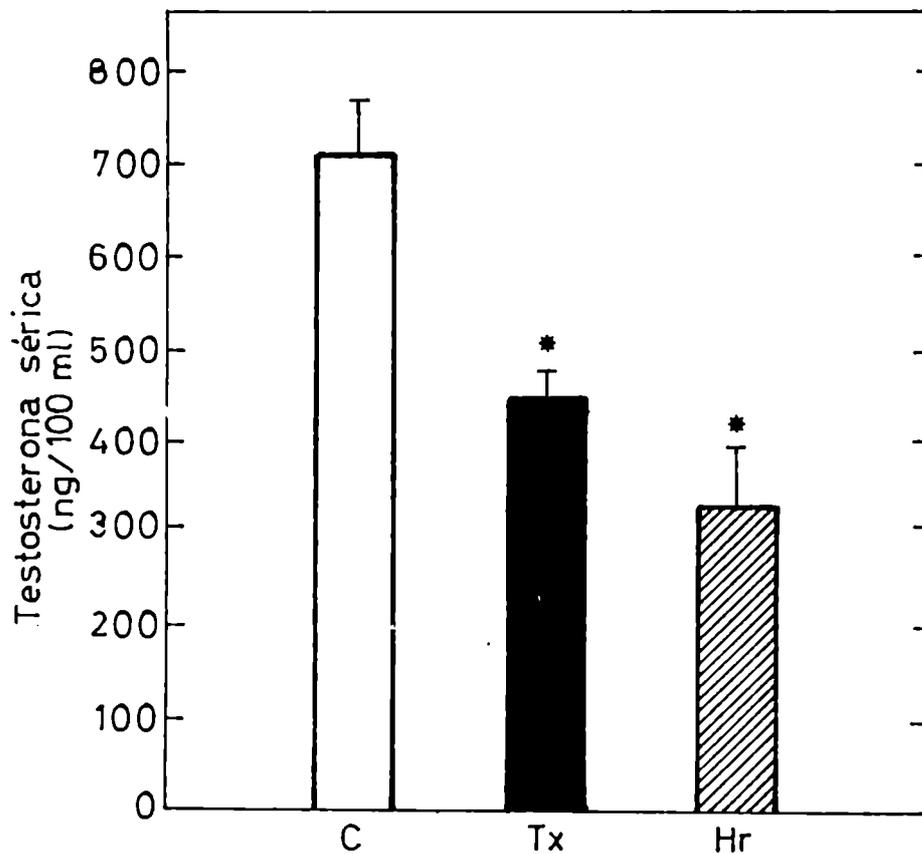


Figura III.20. Niveles séricos de testosterona de ratas controles (C), hipotiroideas (Tx) e hipertiroideas (Hr) tratadas como se indicó en Materiales y Métodos. Cada barra representa el promedio \pm D.S. de determinaciones en 6 animales.
*: $p < 0,05$

DISCUSION

La síntesis de testosterona en las células de Leydig, requiere al colesterol como un precursor no sólo necesario, sino obligatorio, y la deficiencia del mismo conducirá inevitablemente a una función endócrina del testículo alterada. Por lo tanto, se decidió estudiar la regulación del aporte del colesterol para la síntesis androgénica en la rata, bajo distintas condiciones experimentales.

El estudio de la biosíntesis de novo llevó necesariamente a considerar a la enzima regulatoria del camino, la HMG-CoA reductasa, y por otra parte, la descripción en este mismo trabajo, de receptores para lipoproteínas en células de Leydig, condujo a intentar dilucidar su modulación y su probable importancia en la esteroidogénesis de las gónadas del macho adulto.

En primera instancia, la HMG-CoA reductasa mostró un ritmo circadiano de actividad, que difiere a los descriptos para otros tejidos de distintas especies de mamíferos. En la glándula adrenal de la rata existe un ciclo diario con un pico de actividad cerca de medianoche, que ocurre 3 - 5 horas después de la mayor concentración plasmática de corticoeste-

roides (25).

Este aumento en la actividad enzimática que sigue a las concentraciones sanguíneas máximas de esteroides adrenales, puede representar un mecanismo por el cual la glándula reemplaza el colesterol celular que se consumió para la síntesis de hormonas. En el caso de la adrenal de hamster, se observaron variaciones sincrónicas en la actividad de la HMG-CoA reductasa y las concentraciones de corticoesteroides plasmáticos, con los máximos coincidentes aproximadamente a las 19 horas, sugiriendo que la secreción de esteroides por la adrenal de hamster, utilizaría principalmente el colesterol sintetizado de novo (225).

En el testículo de rata, también existe una variación diaria en la secreción de testosterona, pero, a pesar de que hay divergencias respecto a la hora que ocurre la mayor secreción, varios autores encontraron un pico máximo entre las 10 y las 13 horas (31, 210, 261, 361, 363). En este trabajo, se vio que la actividad máxima de la HMG-CoA reductasa testicular ocurre alrededor del mediodía, lo cual representaría un caso similar al descrito para la adrenal de hamster.

La hormona luteinizante es el factor trófico principal para las células de Leydig. Por ello, se decidió estudiar su efecto sobre la HMG-CoA reductasa y las lipoproteínas transportadoras de colesterol, utilizando como modelo experimental la desensibilización y la resensibilización testicular. Con la dosis menor de hCG (2 ug) que produce la lesión esteroideogénica " tardía " (a nivel de la 17-hidroxilasa y 17,20-desmolasas), la actividad de la reductasa no tuvo modificaciones, pero la dosis mayor (10 ug), que genera lesiones antes de pregnenolona, varió la actividad respecto al control pero no indujo cambios en las enzimas entre mevalonato y colesterol.

La existencia de una lesión en la HMG-CoA reductasa, se corroboró cuando el agregado de mevalonato, pero no de acetato, restauró la producción basal de pregnenolona en células desensibilizadas. En cambio, ninguno de los dos sustratos aumentó la respuesta a la hCG " in vitro ", ni influenció la actividad esteroideogénica de las células controles. La ausencia de algún efecto de acetato o mevalonato sobre la producción de pregnenolona en estas células controles, puede deberse a la dificultad de modificar los depósitos metabólicos normales intracelulares de esos precursores por agregado de compuestos

exógenos.

El hecho de que el mevalonato permite a las células de animales desensibilizados restituir su nivel basal de pregnenolona pero no la respuesta a la hCG " in vitro ", y además, que el agregado de LDL o HDL sólo restaure parcialmente la producción del esteroide al estímulo gonadotrófico, sugiere la presencia de un defecto adicional en el metabolismo del colesterol.

La acumulación de este metabolito en mitocondrias de células desensibilizadas apoya esta hipótesis (14). Efectivamente, Hattori y col. (172) describieron recientemente la existencia de un factor proteico inhibitorio lábil al calor, que está presente en las mitocondrias de células de Leydig normales y que es marcadamente activado por tratamiento con hCG. Esta sustancia modula competitivamente al complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol, específicamente afectando el transporte electrónico entre uno o más componentes de la cadena, contribuyendo a la lesión esteroideogénica " temprana " y sirviendo como un regulador endógeno de la biosíntesis de hormonas esteroides.

En resumen, una dosis desensibilizante de 10 ug de hCG

produce, en las células de Leydig de la rata, lesiones en por lo menos cuatro enzimas del camino biosintético desde acetato hasta testosterona, a saber : HMG-CoA reductasa, sistema de clivaje de la cadena lateral del colesterol, 17,20-desmolasa y 17-hidroxilasa. En cambio, el tratamiento de los animales con una segunda dosis de 10 ug de hCG restaura la respuesta esteroidogénica aún con bajos niveles de receptores y de producción de AMP cíclico.

Calvo y col. (78) demostraron que hay una reversión parcial de las lesiones de 17,20-desmolasa y 17-hidroxilasa. Sin embargo, los resultados presentados aquí demuestran que sigue existiendo un bloqueo en la HMG-CoA reductasa de las ratas resensibilizadas. Este dato, junto con el aumento del número de sitios receptores para HDL en las células de Leydig de animales tratados con 1 ó 2 dosis de hCG, sugieren que las células, al tener disminuída su síntesis endógena de colesterol, tenderían a mantener la provisión normal de este precursor esteroidogénico, aumentando el aporte del colesterol extracelular mediante un incremento de la unión de las lipoproteínas plasmáticas a la membrana celular, y una posterior entrada del mismo al citoplasma. De esta forma, en las células

desensibilizadas, el colesterol se acumularía en parte como tal y en parte como pregnenolona debido a los bloqueos enzimáticos posteriores. En cambio, en las células resensibilizadas, al revertirse parcialmente las lesiones de la 17,20-desmolasa y 17-hidroxilasa, el precursor originaría una mayor producción de testosterona sin necesidad de un aumento previo de AMP cíclico.

La disminución de la HMG-CoA reductasa inducida por hormonas puede ser debida a inactivación de esta enzima por una fosforilación dependiente de AMP cíclico que sigue a la fase inicial de estimulación con grandes dosis de hCG, o bien a cambios en la cantidad de enzima como fue propuesta por Azhar y col. para el ovario (20).

La depleción paralela de receptores para LH acentuaría la actividad enzimática reducida debido a la pérdida del soporte trófico de la hormona. Esta disminución mediada por receptor en la actividad de HMG-CoA reductasa, y el aumento a las 4 horas después de una dosis de hCG, indican que la enzima está sujeta tanto a regulación aguda como crónica por gonadotrofinas, resultados que agregan un paso adicional para la modulación de la síntesis de testosterona en células de

Leydig.

Por otra parte, el 4-APP, que disminuye drásticamente los niveles de colesterol plasmático, ha sido una herramienta útil para estudiar la importancia relativa de la síntesis de novo intracelular y del aporte extracelular del colesterol lipoproteico para la biosíntesis de esteroides.

El tratamiento de los animales con la droga, provocó un aumento de la síntesis de colesterol endógeno, a partir de precursores, en glándula suprarrenal y ovario pero no en el testículo de la rata (9), lo cual está de acuerdo con resultados de este trabajo en que la HMG-CoA reductasa testicular, a diferencia de la adrenal, no modificó su actividad al disminuir la concentración de colesterol circulante.

La brusca disminución en la testosterona sérica en las ratas tratadas con 4-APP sería, a primera vista, consistente con que las lipoproteínas proveerían el colesterol a las células de Leydig para la síntesis de andrógenos. La determinación de receptores para LDL y HDL apoyaría esta suposición. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio indican que las extrapolaciones de la reducción en el colesterol plasmático como debidas a una esteroidogénesis testicular dismi-

nuída, deben ser tomadas con precaución. No se puede excluir que la administración de 4-APP a los animales provoque otras alteraciones sobre el sistema endócrino, ya que no sólo se observó una disminución en la LH sanguínea, sino también en el número de receptores para la gonadotropina y para prolactina en las células de Leydig.

La disminución en la LH circulante es contraria al aumento esperado debido a la retroalimentación negativa para la testosterona disminuída. La explicación para esta discrepancia aparente la dió el descubrimiento del aumento significativo en el contenido hipofisario de LH, sugiriendo que el 4-APP inhibe la liberación de la hormona a la circulación, de la misma forma que ocurre con las lipoproteínas en el hígado.

En un trabajo reciente, Blank y col. (46) demostraron que una dosis baja de 4-APP (5 mg/Kg de peso corporal) reducía marcadamente el colesterol sérico pero no alteraba los niveles circulantes de LH y testosterona, a diferencia de lo observado en este estudio con dosis elevadas (50 mg/Kg de peso corporal) que causaron reducciones paralelas de ambas hormonas. De esta manera, parece que la secreción de testosterona

bajo administración de la droga, sólo es alterada cuando también disminuye la secreción de gonadotropina.

La manutención de la respuesta de testosterona " in vitro " por estimulación con hCG en los animales tratados con 4-APP, coincide con los experimentos " in vivo " de Blank y col. La disminución del 50 % en el número de receptores para LH en ratas hipocolesterolémicas, no impidió las respuestas normales debido a que las células de Leydig poseen un gran número de receptores en exceso (80). Por lo tanto, la reducción en la producción de testosterona sería una consecuencia directa del nivel circulante disminuido de LH y ocurriría independientemente de la concentración plasmática de colesterol.

Además, el hecho que una dosis baja de 4-APP (46) disminuya la provisión extracelular del esterol sin alterar la LH, ni la testosterona ni la respuesta del testículo a la hCG, indica que este órgano es capaz de mantener la producción de andrógenos a partir de precursores endógenos.

Todos estos resultados, en conjunto con la observación de que la HMG-CoA reductasa de células de Leydig de animales hipocolesterolémicos no varía su actividad, apoyan las conclusiones de los experimentos clásicos de Morris y Chaikoff (266)

de que en el testículo de la rata, el colesterol biosintetizado de novo es el sustrato primario para la síntesis androgénica, contrariamente a lo que sucede en otras glándulas esteroidogénicas. Esta diferencia puede atribuirse a las cantidades absolutas de esteroides producidos por los distintos órganos, ya que la secreción de estas hormonas por las adrenales y ovarios luteinizados de la rata es aproximadamente cinco veces mayor que la del testículo.

Las diversas anomalías moleculares provocadas por el 4-APP, hicieron considerar en qué forma la droga podía alterar la unión de las lipoproteínas a las células de Leydig. Se observó un aumento en el número de receptores para HDL sin cambios en la afinidad, resultado que concuerda con la descripción previa para la unión de LDL a la glándula adrenal (213). Este aumento de receptores puede representar una respuesta de la célula ante la disminución de los niveles circulares de lipoproteínas que afecta el aporte extracelular de colesterol.

También se investigó la relación entre lipoproteínas y esteroidogénesis cuando ratas desensibilizadas (10 ug de hCG) se trataron simultáneamente con 4-APP. Los animales desensibi-

lizados restauraron parcialmente la respuesta a la hCG " in vitro " en presencia de LDL y HDL, en cambio, con la dosis conjunta de 4-APP, a pesar de recuperarse el nivel basal de pregnenolona, no hubo respuesta ante el estímulo gonadotrófico. Probablemente ello pudo deberse a que en esas ratas, la desensibilización en términos de depleción de receptores, fue más severa debido a que, además de la reducción en los sitios de unión para LH producida por la inyección de hCG, el 4-APP por sí mismo produjo una disminución adicional del 50 % en esos sitios de unión. De esta forma, parecería que la respuesta esteroideogénica de las células desensibilizadas a la estimulación aguda por hCG, no está limitada por la disponibilidad de colesterol sino que dependería del estado hormonal de la célula de Leydig.

Los resultados de producción de pregnenolona en presencia de lipoproteínas, mostraron que tanto la h-LDL como la h-HDL fueron efectivas en estimular la producción del esteroide, lo cual está de acuerdo con la descripción de receptores para ambas lipoproteínas en células de Leydig. Sin embargo, el significado fisiológico de la acción de la LDL sobre los tejidos esteroideogénicos de la rata es cuestionable, ya que, en este

mamífero, el colesterol es transportado a través del torrente sanguíneo, principalmente por la fracción de HDL.

Desde otro punto de vista varios grupos de trabajo, utilizando hígado de rata (35, 37, 38, 56, 59, 153, 196, 197, 275), demostraron que la HMG-CoA reductasa está modulada, tanto " in vivo " como " in vitro ", por un sistema bicíclico como el esquematizado en la Figura g (ver Introducción), en el que intervienen fosfatasas y quinasas que son reguladas reversiblemente. La HMG-CoA reductasa cuando está fosforilada es inactiva; cuando se defosforila, se activa.

Estudios publicados sobre la regulación de la enzima en tejidos esteroideogénicos, realizados principalmente en glándula adrenal de hamster (223, 224), demostraron la presencia de dos factores : uno activador y el otro inhibidor de la actividad enzimática, con propiedades similares a los descriptos en hígado de rata.

Uno de los objetivos de este trabajo fue la dilucidación de la existencia de factores modulatorios en células de Leydig de rata. Para ello se purificaron parcialmente distintas fracciones a partir de hígado de rata y de células de Leydig. Los resultados indicaron que tanto los factores aislados

de hígado como los de células intersticiales, modularon a la HMG-CoA reductasa hepática en la forma conocida. En cambio, la reductasa de células de Leydig no varió su actividad ni con factores hepáticos ni con los propios.

Cabe recordar en este punto lo que ya se describió anteriormente acerca de que la HMG-CoA reductasa testicular es tá unida a la membrana interna mitocondrial, a diferencia de hígado, adrenal y ovario en los cuales la actividad enzimática está asociada a los microsomas.

La importancia de ese hallazgo sobre la ubicación subcelular de la enzima, clave en el camino biosintético del colesterol, radica en que permite un nuevo enfoque para el estudio de su regulación, ya que al situarse dentro de las mitocondrias, la doble membrana de estas organelas se transformaría en una barrera selectiva para los factores moduladores citoplasmáticos imposibilitando que estos actúen en células de Leydig.

Los datos obtenidos apoyarían esta hipótesis, quedando por resolver aún cuales son los mecanismos regulatorios intracelulares de la HMG-CoA reductasa en células de Leydig, que influirán finalmente en la síntesis del precursor obligato-

rio de los esteroides testiculares.

Respecto a la regulación hormonal, ya se discutió de qué manera la enzima era modulada por la LH, pero también fue de interés determinar, si la reductasa testicular podía estar bajo control regulatorio por otros factores hormonales.

Los resultados obtenidos mostraron que las ratas hipoprolactinémicas (por tratamiento con bromocriptina), que habían presentado testosterona sérica disminuída e inhibición de la respuesta de las células de Leydig a la estimulación por hCG " in vitro " (336), tenían, además, la actividad de la HMG-CoA reductasa gonadal disminuída. En cambio, los animales hiperprolactinémicos (por administración de prolactina o sulpirida) no variaron la actividad enzimática respecto a los controles. Tampoco hubo cambios cuando las células de Leydig se incubaron en presencia de prolactina.

Estas observaciones indicarían, que la deficiencia en la producción de testosterona en ratas hipoprolactinémicas puede deberse, en parte, al menor aporte del precursor obligatorio proveniente de la biosíntesis de novo. Sin embargo, Ramachandra y Bartke (292) demostraron en ratas que el tratamiento con bromocriptina producía un aumento en el contenido

testicular de ésteres de colesterol, lo cual sugiere una inhi
bición del complejo enzimático que escinde la cadena lateral
del mismo. Por lo tanto, para que este compuesto se acumule
en el testículo, necesariamente debería haber una mayor entrada
desde el plasma a expensas de un aumento en el número de
sitios receptores para lipoproteínas. Tal aumento de sitios
receptores, fue observado en el ovario de ratas tratadas con
bromocriptina (284).

Los requerimientos de prolactina para una actividad
normal de HMG-CoA reductasa serían similares a los descritos
para la 5- α -reductasa de próstata y túbulos seminíferos (29);
pero no se puede descartar algún efecto directo de la bromo-
criptina sobre la enzima, ya que se vió que la inyección in-
tratesticular del agonista dopaminérgico, producía una dis-
minución en la producción basal de testosterona (336). Más
aún, la disminución en la actividad de la HMG-CoA reduc-
tasa, podría ser consecuencia de una simultaneidad de efectos
por bajos niveles plasmáticos de prolactina y acción directa
de la bromocriptina.

Por otra parte, en las ratas diabéticas se producen una
serie de cambios en la función testicular normal que conducen

a una menor producción de andrógenos por las células intersticiales. El estudio de las causas de esta disfunción determinó el hallazgo de alteraciones en la producción de NADPH y de un bloqueo enzimático a nivel de la 17-hidroxilasa (75, 76). La medición de la actividad de HMG-CoA reductasa indicó que estaba disminuída, lo cual sugiere que además de las lesiones mencionadas, también hay un bloqueo en la provisión intracelular del colesterol.

Contrariamente, la enzima de adrenal mostró un considerable aumento en su actividad, que concuerda con la hipersecreción de glucocorticoides por la glándula en el estado diabético (114). Está demostrado que en la adrenal, el colesterol usado para la esteroidogénesis, proviene principalmente de las lipoproteínas plasmáticas. En este caso, el aporte del precursor, vía lipoproteínas, no sería suficiente, por lo que se necesitaría una síntesis intracelular aumentada para proveer a las células de la suprarrenal de la enorme demanda, debido a la gran producción de esteroides.

Estos resultados sobre la actividad de la HMG-CoA reductasa en ratas diabéticas, muestran otra diferencia entre los mecanismos de regulación de la enzima del testículo respecto a otros órganos productores de esteroides.

Entre los factores estudiados en este trabajo, las disfunciones tiroideas también modularon a la HMG-CoA reductasa de células de Leydig. En animales hipotiroideos, la actividad enzimática resultó disminuída comparada con los normales. Al respecto, Guder y col. (160) demostraron que en ratas tratadas con ^{131}I , la actividad de HMG-CoA reductasa hepática era 50 % inferior que los controles.

Para poder relacionar el aporte del colesterol de novo con la síntesis de testosterona, se incubaron células de Leydig del grupo hipotiroideo con cantidades crecientes de LH. Se observó una respuesta máxima inferior a la de los animales controles, sin cambios en la producción de AMP cíclico, lo cual indica alteraciones posteriores a la formación del nucleótido.

La demostración de que en ratas hipotiroideas haya una acumulación intratesticular de colesterol (280), posiblemente relacionada con el concomitante aumento del colesterol plasmático (258, 358), sugiere un bloqueo en la metabolización del compuesto. Trabajos realizados en mitocondrias de adrenal de rata, mostraron que la tiroidectomía afectaba la transformación de colesterol a pregnenolona, disminuyendo el consumo de

oxígeno, la actividad de la cadena hidroxilante (42) y la concentración de citocromo P-450 (269). Más aún, se describió que los testículos de ratas hipotiroideas acumulan ácido ascórbico, y los autores suponen que ello se debe a que no puede ser utilizado en las reacciones de hidroxilación del camino esteroidogénico (90, 280).

La síntesis disminuída de testosterona concuerda también con la menor concentración circulante del andrógeno que afecta la fertilidad del macho (160, 244).

Indudablemente, la falta de hormonas tiroideas, provoca una disminución en la síntesis de colesterol y de testosterona, pero no puede descartarse alguna acción directa de la TSH, ya que los altos niveles circulantes en los animales hipotiroideos favorecerían la unión con sus receptores en la célula de Leydig, antagonizando de alguna manera el efecto estimulante de las gonadotrofinas (5).

En lo referente al hipertiroidismo, la medición de la actividad de la HMG-CoA reductasa indicó que estaba disminuída en las células de Leydig de los animales tratados comparada con los controles, por lo que la biosíntesis de novo del colesterol también tendría que ser inferior a lo normal.

Sin embargo, al evaluar la respuesta celular a varias concentraciones de LH, la producción de testosterona en las ratas hipertiroideas presentó un valor máximo comparable a los controles, pero el basal fue aproximadamente tres veces mayor. El perfil de liberación de AMP cíclico al medio de incubación se mostró similar al del andrógeno tanto en los valores basales como en la respuesta máxima.

Estos resultados concuerdan con los trabajos de Schneider y col. (310), quienes demostraron que los testículos de ratas adultas tirotóxicas producían más testosterona que los controles cuando se incubaban en presencia de pregnenolona. Estos autores también encontraron que no había variación en los niveles de LH plasmática, sugiriendo la posibilidad de algún efecto directo de T_4 sobre el testículo.

La biosíntesis de precursores de testosterona distales a pregnenolona no cambió por el tratamiento con T_4 , por lo cual esta hormona podría ejercer su acción induciendo la 17- β -hidroesteroide deshidrogenasa microsomal, en una manera análoga a la estimulación de adenosina trifosfatasa, una enzima de membrana y a la esteroide Δ^4 reductasa, otra enzima microsomal.

La inducción de la enzima está de acuerdo con la regulación de síntesis de RNA y proteínas por hormonas tiroideas. De hecho, Oppenheimer y col. (278) detectaron un reducido número de sitios de unión para T_3 en testículo de rata, tejido que se suponía refractario a la acción de las hormonas tiroideas.

Aunque los cambios " in vitro " no siempre se correlacionan con similares cambios " in vivo ", el hecho que haya un valor basal de producción de testosterona aumentado, con niveles plasmáticos del andrógeno disminuido después del tratamiento con T_4 , implicaría que el metabolismo de la testosterona está aumentado. Kato y col. (209) encontraron que la tirotóxicosis en ratas machos, conducía a un incremento en la actividad de la $\Delta-4$ esteroide reductasa para metabolizar testosterona, confirmando trabajos previos de otros autores (54, 253, 291).

Por otra parte, el NADPH es un cofactor indispensable para diversas reacciones de la esteroidogénesis, entre ellas, el paso de colesterol a pregnenolona. El estudio de las enzimas generadoras de NADPH : glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa,

mostró un aumento en las actividades específicas de las tres, en el testículo de ratas prepúberes y púberes tratadas durante 30 días con 25 ug de T_4 diarios (16, 17), sugiriendo que esas enzimas pueden estar influenciadas directamente por hormonas tiroideas y no por gonadotrofinas y testosterona.

Aunque no se haya realizado ningún trabajo al respecto, el hipertiroidismo también podría afectar, de alguna manera, al paso regulatorio en la síntesis de testosterona, o sea el complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol, sistema que está sujeto a modulación por diversos factores.

El hecho de haberse observado una disminución en la actividad de la HMG-CoA reductasa, lo cual implica menor producción de colesterol, es contradictorio con el aumento en la síntesis basal de testosterona. Por lo tanto, es probable un mayor aporte del precursor androgénico, a partir de las lipoproteínas plasmáticas, a través de una mayor captación por un aumento en el número de sitios receptores para las mismas; esta hipótesis debe ser demostrada.

Si la disminución en la actividad de la HMG-CoA reductasa en el hipertiroidismo, era debida a un efecto directo de

de las hormonas tiroideas sobre la misma, tal como se sugirió para las enzimas generadoras de NADPH y para la 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la incubación de las células de Leydig con T_4 debía mostrar un esquema similar al observado " in vivo " respecto a la actividad enzimática.

Los resultados demostraron que no fue así, por lo tanto, la HMG-CoA reductasa podría no estar regulada directamente por T_4 , al menos en forma aguda. No puede descartarse alguna influencia en la regulación a largo plazo, ya que como se mencionó, la enzima limitante de la biosíntesis del colesterol, puede ser regulada por fosfo-defosforilación, o por cambios en las velocidades de síntesis y degradación.

En resumen, los resultados obtenidos demuestran que las disfunciones tiroideas generadas en la prepubertad, afectan el correcto funcionamiento de las células de Leydig del animal adulto, ya sea en la producción de testosterona o en la síntesis de colesterol. Es claro, además, que concentraciones circulantes de hormonas tiroideas distintas de las fisiológicas, impiden que la HMG-CoA reductasa testicular desarrolle una actividad normal.

CONCLUSIONES GENERALES

CONSIDERACIONES FINALES

La síntesis de testosterona en el testículo de los mamíferos ocurre luego de una serie de eventos intracelulares sutilmente regulados, que comienzan cuando la hormona luteinizante (LH), secretada por la hipófisis anterior, se une a sus receptores específicos en la membrana de la célula de Leydig. Para esta biosíntesis, es imprescindible que la célula disponga de cantidades adecuadas de colesterol, precursor obligatorio de todos los esteroides.

Asimismo, está reconocido que, además de la LH, son necesarias otras hormonas para el correcto funcionamiento de los caminos metabólicos esteroidogénicos gonadales.

En este trabajo se enfocó la atención sobre las fuentes posibles de colesterol para la biosíntesis de testosterona en las células de Leydig, ya sea vía lipoproteínas plasmáticas que lo transportan por la circulación general o a partir de la biosíntesis de novo intracelular. Se estudió especialmente a la enzima regulatoria de este camino, la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) y su modulación por múltiples factores.

Los datos obtenidos se resumen a continuación.

1) Se desarrolló una técnica para purificar las lipoproteínas marcadas con ^{125}I y separarlas del trazador no incorporado, que se basa en la utilización de una cromatografía en columna con un gel de poliacrilamida - agarosa.

2) Se detectó la presencia de sitios de unión de alta afinidad para lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL y HDL) en células de Leydig purificadas y se determinaron los parámetros cinéticos de la unión : temperatura óptima y tiempo para llegar al equilibrio.

3) Los estudios realizados sobre la unión de las lipoproteínas a sus receptores sugirieron que siempre es necesario tener en cuenta la máxima capacidad de unión (M.C.U) del ligando al tejido en cuestión, para determinar los valores de las constantes de afinidad (K_a). De no ser así, dichos valores resultarían inferiores a los correctos.

4) Se determinó que la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), en células de Leydig, está unida, principalmente, a la membrana interna mitocondrial, a diferencia del hígado, adrenal y ovario de rata, donde la actividad enzimática está asociada al retículo endoplasmático.

5) Se describió la existencia de un camino mitocondrial de síntesis de colesterol a partir de acetil-CoA, que conduce a una revisión de las extrapolaciones hechas para el testículo a partir de datos obtenidos en otros tejidos.

6) Se descartó la formación de cuerpos cetónicos en células de Leydig ya que no se observó actividad medible de HMG-CoA liasa.

7) La HMG-CoA reductasa testicular presentó un ritmo circadiano con un pico máximo de actividad al mediodía que difiere de los ciclos diarios de la enzima hepática y de otros órganos esteroideogénicos de rata y hamster.

8) En el fenómeno de desensibilización testicular, se describió una lesión adicional en el camino biosintético de testosterona, a nivel de la enzima limitante de la síntesis del colesterol. No se observaron bloqueos en los pasos entre mevalonato y colesterol. También se vió que la HMG-CoA reductasa es regulada no sólo en forma crónica sino también aguda por la hormona luteinizante (LH), bajo tratamiento con cantidades elevadas de gonadotropina coriónica humana (hCG).

9) La incubación de células de Leydig desensibilizadas, con LDL o HDL, restituyó sólo parcialmente la producción de

pregnenolona, sugiriendo un defecto adicional entre colesterol y el esteroide, recientemente comprobado por otros autores.

10) El tratamiento de los animales con dos dosis de hCG mantuvo la desensibilización de HMG-CoA reductasa, y además, la inyección de 1 ó 2 dosis de la gonadotropina aumentó el número de sitios receptores para HDL.

11) Los resultados obtenidos sugerirían que el aporte principal de colesterol para la esteroidogénesis en testículo de rata, proviene de la síntesis de novo.

12) A diferencia con la HMG-CoA reductasa de otros tejidos esteroideogénicos, en las células intersticiales, la enzima no estuvo regulada por retroalimentación por los niveles de colesterol circulante.

13) Se definieron las causas por las cuales la droga hipocolesterolémica 4-aminopirazolopirimidina (4-APP), conduce a una disminución en la síntesis de testosterona. Se demostró que además de producir sus efectos primarios, actúa a distintos niveles provocando alteraciones sobre el sistema endocrino, entre ellas, inhibiendo la liberación de LH hipofisaria al torrente circulatorio y aumentando los sitios recepto-

res para HDL en células de Leydig.

14) Se observó que existen factores fosforilantes y defosforilantes citoplasmáticos en células de Leydig, que modulan a la HMG-CoA reductasa hepática de la misma forma que sus propios factores, pero que no actúan sobre la enzima mitocondrial de testículo, probablemente debido a su diferente compartimentalización subcelular.

15) Otra hormona que moduló a la HMG-CoA reductasa fue la prolactina, ya que ratas inyectadas con bromocriptina presentaron una actividad enzimática disminuída. Sin embargo, no se excluye un efecto directo del agonista dopaminérgico sobre la enzima.

16) Los animales diabéticos, además de las lesiones ya descritas, que causan una disminución en la síntesis de testosterona, también presentaron un bloqueo en la HMG-CoA reductasa testicular. Contrariamente, en la glándula adrenal, se vió un aumento considerable en la actividad enzimática concordante con una hiperproducción de glucocorticoides.

17) El hipotiroidismo y el hipertiroidismo experimental en ratas prepúberes, afectaron la esteroidogénesis testicular de estos animales sacrificados en el estadio de madurez

sexual.

En el hipotiroidismo se encontró que había una disminución en la actividad de HMG-CoA reductasa. También se vió una síntesis de testosterona menor que en los animales controles ante el estímulo gonadotrófico, lo cual puede ser la causa de los niveles circulantes disminuídos del andrógeno.

En el grupo hipertiroideo, también hubo una inhibición en la actividad de la HMG-CoA reductasa. Sin embargo, la incubación de células de Leydig durante cuatro horas con T_4 , no modificó la actividad enzimática.

Los resultados " in vivo " son contradictorios con el aumento en la producción basal de testosterona, por lo que se propone que debe haber un aumento en la captación de las lipoproteínas plasmáticas transportadoras de colesterol para proveer el precursor para la esteroidogénesis.

De los párrafos anteriores se pueden inferir algunas conclusiones generales.

La HMG-CoA reductasa de las células de Leydig de la rata presenta varias diferencias comparada con la enzima hepática y con la de otros órganos esteroidogénicos tales como la glándula suprarrenal y el ovario. No sólo su ubicación subce-

lular es distinta sino también sus mecanismos de regulación, característica esta última que bien puede ser consecuencia de la primera. Tales diferencias en los mecanismos regulatorios incluyen experimentos con factores intracelulares, efecto del 4-APP, influencia de la diabetes experimental y ritmo circadiano de actividad. Además, la enzima puede ser regulada tanto por la LH, como por otras hormonas tales como las tiroideas, la prolactina, y también, probablemente por la insulina.

Pero si la HMG-CoA reductasa tiene características distintas, también las células de Leydig se diferencian de los tejidos adrenal y ovárico respecto a la provisión de colesterol para la esteroidogénesis. Estos dos utilizan principalmente el proveniente de las lipoproteínas. En el testículo, en cambio, predomina la síntesis de novo y la explicación tal vez se encuentre en las mayores cantidades de esteroides que producen la adrenal y el ovario cuando se comparan con la gónada del macho.

Estos últimos resultados provinieron de experimentos en los cuales se utilizó el 4-APP, que si bien resultó una herramienta muy útil, también produjo efectos secundarios no eses

perados. Por lo tanto, los trabajos en los cuales se realizan tratamientos con drogas, en general, y con el 4-APP, en particular, deben hacerse con precaución, ya que los efectos deletéreos ocasionados pueden conducir a una malinterpretación de los datos observados.

Finalmente, si bien no existen dudas del papel fundamental de la LH en la estimulación de la esteroidogénesis en las células de Leydig, las evidencias indican que la producción de testosterona está modulada por otras hormonas, entre ellas, la FSH, la prolactina y la insulina. En este trabajo se vió que concentraciones de T_3 y T_4 diferentes de la fisiológica, además de modular a la HMG-CoA reductasa, indujeron cambios en la producción normal de testosterona por las células intersticiales. Esto apoya las observaciones que también las hormonas tiroideas forman parte de ese complejo multihormonal que regula y mantiene el correcto funcionamiento de las gónadas masculinas.

Pero, si bien es cierto que de este trabajo de Tesis se puede llegar a tener en consideración alguna conclusión, también es cierto que cada resultado probablemente genere más de una pregunta a resolver. La veracidad o no de las hipóte-

tesis planteadas a la luz de los datos obtenidos, sólo se comprobará con el decurso del tiempo. Tal vez nunca imaginó Aristóteles que después de sus estudios sobre castración en las aves, transcurrirían más de 2000 años en los cuales hubo importantes descubrimientos, que aún no terminan de dilucidar, los mecanismos moleculares que intervienen en la síntesis de esteroides.

Recordando una vez más el pensamiento de Ramón y Cajal " No hay temas agotados..... ", se puede pensar que mientras el hombre no desista, los intrincados mecanismos extra e intracelulares de regulación seguirán exigiendo el discernimiento y astucia del científico, pues, aparte del Creador, hay un único ente que conoce a la célula, y es, precisamente, la célula misma.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Acevedo, H.F.; Axelrod, L.R.; Ishikawa, E. y Takaki, F. (1963). J.Clin.Endocrinol.Metab. 23 : 885.
- 2 - Allain, C.C.; Poon, L.S.; Chan, C.S.G.; Richmond, W. y Fu, C. (1974). Clin.Chem. 20 : 470.
- 3 - Allison, A.C. y Davies, P. (1974). Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 28 : 419.
- 4 - Ambrosi, B.; Travaglini, P.; Beck-Peccoz, P.; Bara, R.; Elli, R.; Parracchi, A. y Faglia, G. (1976). J.Clin. Endocrinol.Metab. 43 : 700.
- 5 - Amir, S.M.; Sullivan, R.C. e Ingbar, S.H. (1978). Endocrinology 103 : 101.
- 6 - Andersen, J.M. y Dietschy, J.M. (1976). Science 193 : 903.
- 7 - Andersen, J.M. y Dietschy, J.M. (1976). Biochem.Biophys. Res.Commun. 72 : 880.
- 8 - Andersen, J.M. y Dietschy, J.M. (1977). J.Biol.Chem. 252 : 3652.
- 9 - Andersen, J.M. y Dietschy, J.M. (1978). J.Biol.Chem. 253 : 9024.
- 10 - Andersen, J.M. y Dietschy, J.M. (1979) J.Lipid Res. 20 : 740.
- 11 - Anderson, D.W. (1978). Lancet 1 : 819.
- 12 - Anderson, R.G.W.; Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1977). Cell 10 : 351.
- 13 - Anderson, R.G.W.; Vasile, E.; Mello, R.J.; Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1978) Cell 15 : 919.
- 14 - Aquilano, D.R.; Tsai Morris, C.H. y Dufau, M.L. (1984). 7th. International Congress of Endocrinology, Quebec, Canadá, Abstr. 162.

- 15 - Aron, M. y Benoit, J. (1934). C.R.Séanc.Soc.Biol. 116 : 218.
- 16 - Aruldhas, M.M.; Valivullah, H.M. y Govindarajulu, P. (1982). Biochim.Biophys.Acta 715 : 121.
- 17 - Aruldhas, M.M.; Valivullah, H.M. y Govindarajulu, P. (1984). Biochim.Biophys.Acta 797 : 143.
- 18 - Arzac, J.P. (1950). J.Clin.Endocrinol. 10 : 1465.
- 19 - Ascoli, M. y Puett, D. (1977). FEBS Lett. 75 : 77.
- 20 - Azhar, S.; Chen, Y.D. y Reaven, G.M. (1984). Biochemistry 23 : 4533.
- 21 - Azhar, S. y Menon, K.M.J. (1981). J.Biol.Chem. 256 : 6548.
- 22 - Azhar, S.; Menon, M. y Menon, K.M.J. (1981). Biochim. Biophys.Acta 665 : 362.
- 23 - Back, P.; Hamprecht, B. y Lynen, F. (1969). Arch.Biochem. Biophys. 133 : 11.
- 24 - Bakker, J. (1982). En: Proceedings of the Second European Testis Workshop. The Netherlands.
- 25 - Baksi, S.N. (1973). J.Endocrinol. 59 : 655.
- 26 - Balasubramaniam, S.; Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1977). Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A 74 : 1421.
- 27 - Balasubramaniam, S.; Goldstein, J.L.; Faust, J.R. y Brown, M.S. (1976). Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A 73 : 2564.
- 28 - Balasubramaniam, S.; Goldstein, J.L.; Faust, J.R. Brunsche de, G.Y. y Brown, M.S. (1977). J.Biol.Chem. 252 : 1771.
- 29 - Balsam, A.; Sexton, F. y Ingbar, S.H. (1981). Life Sci. 28 : 1727.

- 30 - Barañao, J.L.S. (1981). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Bs.As).
- 31 - Barañao, J.L.S. y Dufau, M.L. (1983). J.Biol.Chem. 258 : 7322.
- 32 - Bartke, A.; Steele, R.F.; Musto, N. y Caldwell, B.V. (1973). Endocrinology 92 : 1223.
- 33 - Becú, D. (1984). Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica (Universidad de Bs.As).
- 34 - Bedrak, E. y Samuels, L.T. (1969). Endocrinology 85 : 1186.
- 35 - Beg, Z.H.; Allmann, D.W. y Gibson, D.M. (1973). Biochem. Biophys. Res. Commun. 54 : 1362.
- 36 - Beg, Z.H. y Gibson, D.M. (1973). Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 32 : 480 A.
- 37 - Beg, Z.H.; Stonik, J.A. y Brewer, H.B. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 75 : 3678.
- 38 - Beg, Z.H.; Stonik, J.A. y Brewer, H.B. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 76 : 4375.
- 39 - Bell, F.P. (1973). Exp. Mol. Pathol. 19 : 293.
- 40 - Bell, J.B.G.; Vinson, G.P.; Hopkin, D.J. y Lacy, D. (1968). Biochim. Biophys. Acta 164 : 412.
- 41 - Benahmed, M.; Reventos, J. y Saez, J.M. (1983). Endocrinology 112 : 1952.
- 42 - Benelli, C.; Michel, D. y Michel, R. (1982). J. Steroid Biochem. 16 : 749.
- 43 - Berthold, A.A. (1849). Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med. p. 42.
- 44 - Bilheimer, D.W.; Eisenberg, S. y Levy, R.I. (1972). Biochim. Biophys. Acta 260 : 212.

- 45 - Billiar, R.B. y Eik-Nes, K.B. (1965). Biochim. Biophys. Acta 104 : 503.
- 46 - Blank, M.S.; Loumaye, E.; Sgoutas, D.S.; Catt, K.J. y Dufau, M.L. (1983). Endocrinology 112 : 1973.
- 47 - Blaquier, J.A.; Cameo, M.S. y Burgos, M.H. (1972). Endocrinology 90 : 839.
- 48 - Bockaert, J.; Hunzicker-Dunn, M. y Birnbaumer, L. (1976). J. Biol. Chem. 251 : 2653.
- 49 - Bolté, E.; Condert, S. y Lefebvre, Y. (1974). J. Clin. Endocrinol. Metab. 38 : 394.
- 50 - Borkowski, A.J.; Levin, S.; Delcroix, C. y Klastersky, J. (1970). J. Appl. Physiol. 28 : 42.
- 51 - Borkowski, A.J.; Levin, S.; Delcroix, C.; Mahler, A. y Verhas, V. (1967). J. Clin. Invest. 46 : 797.
- 52 - Bouin, P. y Ancel, P. (1903). Arch. Zool. Exp. Gen. 1 : 437.
- 53 - Boveris, A. y Stoppani, D.M. (1970). Arch. Biochem. Biophys. 141 : 641.
- 54 - Bradlow, H.L.; Fukushima, D.K.; Zumoff, B.; Hellman, L. y Gallagher, T.F. (1966). J. Clin. Endocrinol. Metab. 26 : 831.
- 55 - Brecher, P.I. y Hyun, Y. (1978). Endocrinology 102 : 1404.
- 56 - Bricker, L.A. y Levey, G.S. (1972). J. Biol. Chem. 247 : 4914.
- 57 - Brout, B.C.; Wiest, W.G. y Collins, D.C. (1982). Endocrinology 110 : 1572.
- 58 - Brown, B.L.; Albano, J.D.M.; Ekins, R.P. y Sgherzi, A.M. (1971). Biochem. J. 121 : 561.

- 59 - Brown, M.S.; Brunschede, G.Y. y Goldstein, J.L. (1975).
J.Biol.Chem. 250 : 2502.
- 60 - Brown, M.S.; Dana, S.E. y Goldstein, J.L. (1974). J.Biol.
Chem. 249 : 789.
- 61 - Brown, M.S.; Dana, S.E. y Goldstein, J.L. (1975) J.Biol.
Chem. 250 : 4025.
- 62 - Brown, M.S.; Dana, S.E. y Siperstein, M.D. (1974 b). J.
Biol. Chem. 249 : 6585.
- 63 - Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1975). Cell 6 : 307.
- 64 - Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1976). Science 191 : 150.
- 65 - Brown, M.S.; Kovanen, P.T. y Goldstein, J.L. (1980). Ann.
N.Y.Acad.Sci. 348 : 48.
- 66 - Bruce, H.M. y Sloviter, H.A. (1957). J.Endocrinol. 15 :
72.
- 67 - Bruni, J.F.; Marshall, S.; Dibbet, J.A. y Meites, J. (1975).
Endocrinology 97 : 558.
- 68 - Bucher, N.L.R.; Overath, P. y Lynen, F. (1960). Biochim.
Biophys.Acta 40 : 491.
- 69 - Burstein, S. y Gut, M. (1971). Recent Prog.Horm.Res.
27 : 303.
- 70 - Burstein, S. y Gut, M. (1973). Ann.N.Y.Acad.Sci. 212 :
262.
- 71 - Burstein, S. y Gut, M. (1976). Steroids 28 : 115.
- 72 - Burstein, S.; Kimball, H.L. y Gut, M. (1970). Steroids
15 : 809.
- 73 - Burstein, S.; Middleditch, B.S. y Gut, M. (1974). Biochem.
Biophys.Res.Commun. 61 : 692.

- 74 - Butenandt, A. (1931). Z. Angew. Chem. 44 : 905.
- 75 - Calvo, J.C. (1979). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Bs.As).
- 76 - Calvo, J.C., Biella de Souza Valle, L.; Barañao, J.L.S.; Tesone, M. y Charreau, E.H. (1979). Horm. Metab. Res. 11 : 161.
- 77 - Calvo, J.C.; Radicella, J.P. y Charreau, E.H. (1983). Biochem. J. 212 : 259.
- 78 - Calvo, J.C.; Radicella, J.P.; Pignataro, O.P. y Charreau, E.H. (1984). Mol. Cell Endocrinol. 34 : 31.
- 79 - Carr, B.R. y Simpson, E.R. (1981). Endocrinology 108 : 2154.
- 80 - Catt, K.J. y Dufau, M.L. (1973). Nature New Biol. (Lond) 244 : 219.
- 81 - Catt, K.J. y Dufau, M.L. (1973). Adv. Exp. Med. Biol. 36 : 379.
- 82 - Catt, K.J.; Tsuruhara, T. y Dufau, M.L. (1972). Biocnem. Biophys. Acta 279 : 194.
- 83 - Cavazos, L.F. y Melampy, R.M. (1954). Am. J. Anat. 95 : 467.
- 84 - Ceska, M.; Sjodin, A.V. y Grossmuller, F. (1971). Biochem. J. 121 : 139.
- 85 - Cigorraga, S.; Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1978). J. Biol. Chem. 253 : 4297.
- 86 - Clinkenbeard, K.D.; Reed, W.D.; Mooney, R.A. y Lane, M.D. (1975). J. Biol. Chem. 250 : 3108.
- 87 - Clinkenbeard, K.D.; Sugiyama, T.; Moss, J.; Reed, W.D. y Lane, M.D. (1973). J. Biol. Chem. 248 : 2275.
- 88 - Coffey, J.C.; French, F.S. y Nayfeh, S.N. (1971). Endocrinology 89 : 865.

- 89 - Cohen, P.; Nimmo, G.A. y Antoniow, J.F. (1977). *Biochem.J.* 162 : 435.
- 90 - Conn, E.I. y Stumpf, P.K. (1972). En: *Outlines of Biochemistry*. Wiley (Ed.), New York, p. 227.
- 91 - Conn, P.M.; Tsuruhara, T.; Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1977). *Endocrinology* 101 : 639.
- 92 - Conti, M.; Harwood, J.P.; Haueh, A.J.W.; Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1976). *J.Biol.Chem.* 251 : 7729.
- 93 - Contopoulos, A.N.; Simpson, M.E. y Koneff, A.A. (1958). *E Endocrinology* 63 : 642.
- 94 - Cook, K.M. (1960). *Iowa Acad.Sci.* 67 : 463.
- 95 - Cooke, B.A.; Janszen, F.H.A.; Clotscher, W.F. y van der Molen, H.J. (1975). *Biochem.J.* 150 : 413.
- 96 - Cooke, B.A.; Janszen, F.H.A. y van der Molen, H.J. (1975). *Acta Endocrinol. Suppl.* 199 . Abstr. 41.
- 97 - Cresto, J.C.; Udrisar, D.P.; Camberos, M.C.; Basabe, J.C.; Gomez Acuña, P. y de Majo, S.F. (1981). *Acta Physiol. Lat.Am.* 31 : 13.
- 98 - Crew, F.A.E. (1925). *Proc.R.Soc.Edimburgh.* B 45 ; 252.
- 99 - Chance, B. y Williams, G.R. (1956). *Adv.Enzimol.* 17 : 65.
- 100 - Chapman, M.J. (1980). *J.Lipid Res.* 21 : 789.
- 101 - Charreau, E.H.; Attramadal, A.; Torjesen, P.A.; Purvis, K.; Calandra, R.S.; Hansson, V. (1977). *Mol.Cell.Endocrinol.* 6 : 303.
- 102 - Chen, D.I. y Payne, A.H. (1977). *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 74 : 1589.
- 103 - Chen, Y.I.; Kraemer, F.B.; Reaven, G.M. (1980). *J.Biol. Chem.* 255 : 9162.

- 104 - Christensen, K. (1975). En: Handbook of Physiology. Section 7, Vol 5, Cap.3, Geifer, S.R. (Ed.).
- 105 - Christensen, K. y Mason, N. (1965). Endocrinology 76:646.
- 106 - Christie, M.H.; Strauss III, J.F. y Flickinger, G.L. (1979). Endocrinology 105 : 92.
- 107 - Chu, J.P. (1944). Endocrinology 34 : 90.
- 108 - Da Costa, E. y Carlson, R.J. (1933). Am.J.Physiol. 104:247.
- 109 - David, K.; Dingemans, E.; Freud, J. y Laqueur, E.Z. (1935). Physiol.Chem. 233 : 281.
- 110 - Davis, J.S.; Clark, M.R. y Marsh, J.M. (1981). Proceedings of the 63rd Annual Meeting of the Endocrine Society. Cincinnati, OH., p. 89, Abstr. 27.
- 111 - Davis, J.S.; Farese, R.V. y Marsh, J.M. (1981). Endocrinology 109 : 469.
- 112 - de Jong, F.H.; Hey, A.H. y van der Molen, H.J. (1973). J.Endocrinol. 57 : 277.
- 113 - Dempsey, E.W.; Greep, R.O. y Deane, H.W. (1949). Endocrinology 44 : 88.
- 114 - de Nicola, A.F.; Tornello, S.; Heller, C. y Fridman, D. (1981). En: Fundamentals and Therapy. Agarwal, M.C. (Ed.) (Elsevier/North Holland Biomedical Press) p. 213.
- 115 - Dexter, R.N.; Fishman, L.M. y Ney, R.L. (1970). Endocrinology 87 : 836.
- 116 - Di Pietro, D.L.; Brown, R.D. y Strott, C.A. (1972). J.Clin. Endocrinol.Metab. 32 : 619.
- 117 - Drosowsky, M.; Menon, K.M.J.; Forchielli, E. y Dorfman, R. I. (1965). Biochim.Biophys.Acta 104 : 229.
- 118 - Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1978). Vitamins and Hormones 36 : 461.

- 119 - Dufau, M.L.; Tsuruhara, T.; Horner, K.A.; Podestá, E.J. y Catt, K.J. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 74: 3419.
- 120 - Dufau, M.L.; Watanabe, K. y Catt, K.J. (1973). Endocrinology 92 : 6.
- 121 - Dugan, R.E.; Slakey, L.L.; Briedis, A.V. y Porter, J.W. (1972). Arch. Biochem. Biophys. 152 : 21.
- 122 - Dyson, A.L.M.B. y Orgebin-Crist, M.C. (1973). Endocrinology 93 : 391.
- 123 - Edelstein, C.; Kezdy, F.J.; Scanu, A.M. y Shen, B.W. (1979). J. Lipid Res. 20 : 143.
- 124 - Edwards, P.A. (1975). Arch. Biochem. Biophys. 170 : 188.
- 125 - Edwards, P.A. y Fogelman, A.M. (1976). Fed. Proc. 35 : 1472.
- 126 - Edwards, P.A. y Gould, R.G. (1972). J. Biol. Chem. 247 : 1520.
- 127 - England, S. y Siegel, L. (1969). Meth. Enzimol. 13 : 99.
- 128 - Estabrook, R.W. (1967). Meth. Enzimol. 10 : 41.
- 129 - Farese, R.V. y Sabir, M.A. (1979). Biochim. Biophys. Acta 575 : 299.
- 130 - Farese, R.V. y Sabir, M.A. (1980). Endocrinology 106 : 1869.
- 131 - Farese, R.V.; Sabir, M.A. y Larson, R.E. (1980 b). J. Biol. Chem. 255 : 7232.
- 132 - Farese, R.V.; Sabir, M.A. y Larson, R.E. (1980 c) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 77 : 7189.
- 133 - Farese, R.V.; Sabir, M.A. y Larson, R.E. (1981 a). Biochemistry 20 : 6047.
- 134 - Farese, R.V.; Sabir, M.A. y Larson, R.E. (1981 c). Endocrinology 109 : 1895.
- 135 - Farese, R.V.; Sabir, M.A. y Larson, R.E. (1982 a). Biochemistry 21 : 3318.

- 136 - Farese, R.V.; Sabir, M.A. y Vandor, S.L. (1979). J. Biol. Chem. 254 : 6842.
- 137 - Farese, R.V.; Sabir, M.A.; Vandor, S.L. y Larson, R.E. (1980 a). J. Biol. Chem. 255 : 5728.
- 138 - Fewster, M.E.; Pirrie, R.E. y Turner, D.A. (1967). Endocrinology 80 : 263.
- 139 - Flint, A.P.F. y Armstrong, D.T. (1971). Biochem. J. 123 : 143.
- 140 - Fluckinger, E. y Wagner, H.R. (1968). Experientia 24 : 1130.
- 141 - Folis, G.; Van Vliet, S. (1976). Clin. Res. 24 : 279 A.
- 142 - Frank, A.L. y Christensen, A.K. (1968). J. Cell Biol. 36 : 1.
- 143 - Fritz, I.B. y Marguis, N.R. (1965). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 54 : 1226.
- 144 - Gavin, J.R.; Roth, J.; Neville, D.M.; De Meyts, P. y Buell, D.N. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71 : 84.
- 145 - Glazener, E.W. y Jull, M.A. (1946). Poultry Sci. 25 : 236.
- 146 - Goldfarb, S. (1972). FEBS Lett. 24 : 153.
- 147 - Goldfarb, S. y Pitot, H.C. (1971). J. Lipid Res. 12 : 512.
- 148 - Goldstein, J.L.; Anderson, R.G.W. y Brown, M.S. (1979) Nature 279 : 679.
- 149 - Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70 : 2804.
- 150 - Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1977). Ann. Rev. Biochem. 46 : 897.

- 151 - Goldstein, J.L.; Brunschede, G.Y. y Brown, M.S. (1975). J. Biol.Chem. 250 : 7854.
- 152 - Goldstein, J.L.; Dana, S.E. y Brown, M.S. (1974). Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A. 71 : 4288.
- 153 - Goodwin, C.D. (1975). Fed.Proc. 34 : 548.
- 154 - Gould, R.G. y Popják, G. (1957). Biochem.J. 66 : 51.
- 155 - Gould, R.G. y Swyryd, E.A. (1966). J.Lipid Res. 7 : 698.
- 156 - Gould, R.G. y Taylor, C.B.; (1950). Fed.Proc.Fed.Amer.Soc. Exp.Biol. 9 : 179.
- 157 - Greep, R.O. (1939). Anat.Record 73, Suppl. 2 : 23.
- 158 - Greep, R.O. y Fevord, H.L. (1937). Endocrinology 21 : 611.
- 159 - Greep, R.O.; Fevord, H.L. y Hisaw, F.L. (1936). Anat.Record 65 : 261.
- 160 - Guder, W.; Nolte, I y Wieland, O. (1968). Europ.J.Biochem. 4 : 273.
- 161 - Gwynne, J.T.; Mahafee, D.; Brewer, H.D. y Ny, R.J. (1976). Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 73 : 4329.
- 162 - Gwynne, J.T. y Strauss III, J.F. (1982). Endocrine Rev. 3 : 229.
- 163 - Hafiez, A.A.; Bartke, A. y Lloyd, C.W. (1972). J.Endocr. 53 : 223.
- 164 - Hafiez, A.A.; Lloyd, C.W. y Bartke, A. (1972). J.Endocr. 52 : 327.
- 165 - Hall, P.F.; Charponnier, C.; Nakamura, M. y Gabbiami, G. (1979). J.Steroid Biochem. 11 : 1361.
- 166 - Hall, P.F. y Eik-Nes, K.B. (1963). Biochim.Biophys.Acta 86 : 604.

- 167 - Hall, P.F.; Irby, D.C. y de Kretser, D.M. (1969). *Endocrinology* 84 : 488.
- 168 - Hall, P.F. y Koritz, S.B. (1965). *Biochemistry* 4 ; 1037.
- 169 - Hall, P.F. y Okazaki, K. (1966). *Biochemistry* 5 : 1202.
- 170 - Hammet, F.S. (1923). *Am.J.Anat.* 32 : 37.
- 171 - Haour, F. y Saez, J.M. (1977). *Mol.Cell.Endocrinol.* 7 : 17.
- 172 - Hattori, M.; Aquilano, D. y Dufau, M.L. (1984). *J.Steroid Biochem.* 21 : 265.
- 173 - Havel, R.J.; Eder, H.A. y Bragdon, J.H. (1955). *J.Clin.Invest.* 34 : 1345.
- 174 - Havel, R.J.; Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1980). En: *Metabolic Control and Disease*. Bondy, P.K.; Rosenberg, L.E. Eds. S.W.B., Saunders Co. Philadelphia, p.393.
- 175 - Hay, R.W.; Pottenger, L.A.; Reingold, A.L.; Gets, G.S. y Wisler, R.W. (1971). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 44 : 1471.
- 176 - Hellig, H.; Gottereau, D.; Lefebvre, Y. y Bolté, E. (1970). *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 30 : 624.
- 177 - Hellig, H. y Savard, K. (1966). *Biochemistry* 5 : 2944.
- 178 - Henderson, J.F. (1963). *J.Lipid Res.* 4 : 68.
- 179 - Hickman, P.E.; Horton, B.J. y Sabine, J.R. (1972). *J.Lipid Res.* 13 : 17.
- 180 - Higgins, M.; Kawachi, T. y Rudney, H. (1971). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 45 : 188.
- 181 - Higgins, M. y Rudney, H. (1973). *Nature New Biol. (London)* 246 : 60.
- 182 - Hinkle, P.M. y Tashjian, A.H. (1975). *Biochemistry* 14 : 3845.

- 183 - Holzbauer, M. (1971). Br.J.Pharmacol. 43 : 560.
- 184 - Hoschoian, J.C. y Brownie, A.C. (1967). Steroids 1 : 49.
- 185 - Howland, B.E. e Ibrahim, E.A. (1973). Experientia 29 : 1398.
- 186 - Howland, B.E. e Ibrahim, E.A. (1974). Horm.Res. 5 : 193.
- 187 - Hsueh, A.J.W.; Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1976). Biochem.Biophys.Res.Comm. 72 : 1145.
- 188 - Hsueh, A.J.W.; Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1977). Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 74 : 592.
- 189 - Huang, F.L. y Glinemann, W.H. (1975). Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 72 : 3004.
- 190 - Huggins, C.; Moulton, S.H. (1948). J.Exptl.Med. 88 : 169.
- 191 - Huhtaniemi, I. (1977). J.Steroid Biochem. 8 : 491.
- 192 - Huston, T.M. y Wheeler, R.S. (1949). Poultry Sci. 28 : 262.
- 193 - Ikonen, M. y Niemi, J. (1966). Nature 212 : 716.
- 194 - Inano, H.; Inano, A. y Tamaoki, B. (1970). J.Steroid Biochem. 1 : 83.
- 195 - Inano, H.; Nakano, H.; Shikita, M. y Tamaoki, B. (1967). Biochim.Biophys.Acta 137 : 540.
- 196 - Ingebritsen T.S. y Gibson, D.M. (1980). En: Molecular Aspects of Cellular Regulation. Vol.1, Cohen, P. (Ed). (Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam). p.63.
- 197 - Ingebritsen, T.S.; Lee, H.S.; Parker, R.A. y Gibson, D.M. (1978). Biochem.Biophys.Res.Comm. 81 : 1268.
- 198 - Jackson, R.L.; Morrisett, J.D. y Gotto, J.A.M. (1976). Physiol.Rev. 56 : 259.

- 199 - Janszen, F.H.A., Cooke, B.A. y van der Molen, H.J. (1977).
Biochem.J. 162 : 341.
- 200 - Janszen, F.H.A.; Cooke, B.A.; van Driel, M.J.A. y van der
Molen, H.J. (1976). J.Endocrinol. 70 : 345.
- 201 - Janszen, F.H.A.; Cooke, B.A.; van Driel, M.J.A. y van der
Molen, H.J. (1978). Biochem.J. 170 : 9.
- 202 - Jarlstedt, J.; Steward, V.W. (1968). Endocrinology 82 :
1063.
- 203 - Jeske, D.C. y Dietschy, J.M. (1980). J.Lipid Res. 21 :
364.
- 204 - Johnson, D.C. (1974). Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 145 : 610.
- 205 - Jones, G.E.; Delp, E. y Foote, E.C. (1946). Endocrinology
38 : 337.
- 206 - Kalland, G.A.; Vera, A.; Peterson, M. y Swerdloff, R.S.
(1978). Endocrinology 102 : 476.
- 207 - Kandutsch, A.A. y Saucier, S.E. (1969). J.Biol.Chem. 244 :
2299.
- 208 - Karaboyas, G.C. y Koritz, S.B. (1965). Biochemistry 4 :
462.
- 209 - Kato, R.; Takahashi, A. y Omori, Y. (1970). Biochim.Bio-
phys.Acta 208 : 116.
- 210 - Keating, R.J. y Tcholakian, R.K. (1979). Endocrinology
104 : 184.
- 211 - Kebabian, J.M.; Zatz, M.; Romero, J.A. y Axelrod, J. (1975).
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 72 : 3735.
- 212 - Kovanen, P.T.; Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1978). J.
Biol.Chem. 253 : 5126.
- 213 - Kovanen, P.T.; Goldstein, J.L.; Chappel, D.A. y Brown, M.S.
(1980). J.Biol.Chem. 255 : 5591.

- 214 - Krum, A.A.; Morris, M.D. y Bennett, L.L. (1964). *Endocrinology* 74 : 543.
- 215 - Lakshmanan, M.R.; Dugan, R.E.; Nepokroeff, C.M.; Ness, G.C. y Porter, J.W. (1975). *Arch. Biochem. Biophys.* 168 : 89.
- 216 - Lakshmanan, M.R.; Nepokroeff, C.M.; Ness, G.C.; Dugan, R.E. y Porter, J.W. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50 : 704.
- 217 - Lansnitzki, I. En: *Prolactin and Carcinogenesis, Fourth Tenows Workshop, Cardiff* (A.R. Boyns y R. Griffiths Eds.), Alpha Omega Alpha, Cardiff, 1972.
- 218 - Leake, D.S. y Bowyer, D.E. (1977). *Biochem. Soc. Trans.* 5 : 130.
- 219 - Leathem, J.H. (1961). En: *Sex and Internal Secretions*. Ed.: Young, W.C. Williams & Wilkins. Baltimore. p. 666.
- 220 - Lacroix, E.; Eechaute, W. y Leusen, I. (1975). *Steroids* 25 : 649.
- 221 - Lefebvre, A.; Morera, A.M. y Saez, J.M. (1978). *FEBS Lett.* 89 : 287.
- 222 - Lehoux, J.G. y Lefebvre, A. (1980). *J. Steroid Biochem.* 12 : 479.
- 223 - Lehoux, J.G. y Lefebvre, A. (1981). *Life Sci.* 29 : 1913.
- 224 - Lehoux, J.C.; Lefebvre, A.; Belisle, S. y Bellabarba, D. (1982). *Life Sci.* 31 : 867.
- 225 - Lehoux, J.G. y Preiss, B. (1980). *Endocrinology* 107 : 215.
- 226 - Lesniak, M.A. y Roth, J. (1976). *J. Biol. Chem.* 251 : 3720.
- 227 - Levy, H.; Deane, H.W. y Rubin, B.L. (1959). *Endocrinology* 65 : 932.

- 228 - Leydig, F. (1850). Z.Wiss.Zool. 2 : 1.
- 229 - Libertun, G. (1980). Ed. Radioinmunoanálisis. López Eds. (Buenos Aires).
- 230 - Lindner, H.R. (1961). J.Endocrinol. 23 : 139.
- 231 - Liscum, L.; Cummings, R.D.; Anderson, R.G.; De Martino, G. N.; Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1983). Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A. 80 : 7165.
- 232 - Long, C.H.N. (1974). Recent Prog.Horm.Res. 1 : 99.
- 233 - Lowitt, S ; Farese, R.V.; Sabir, M.A. y Root, A.W. (1982). Endocrinology 111 : 1415.
- 234 - Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193 : 265.
- 235 - Lloyd, B.J. (1972). Gen.Comp.Endocrinol. 19 : 428.
- 236 - Mac Farlane, A.S. (1958). Nature 182 : 53.
- 237 - Magrini, G.; Ebiner, J.R.; Burkhalt, D.; Felber, J.P. (1976). J.Clin.Endocrinol.Metab. 43 : 944.
- 238 - Mahley, R.W.; Innerarity, T.L.; Bersot, T.P.; Lipson, A. y Margolis, S. (1978). Lancet 2 : 807.
- 239 - Mahley, R.W.; Weisgraber, K.H. e Innerarity, T.L.; (1979). Biochim.Biophys.Acta 575 : 81.
- 240 - Mahley, R.W.; Weisgraber, K.H.; Innerarity, T.L.; Brewer Jr, H.B. y Assman, G. (1975). Biochemistry 14 : 2817.
- 241 - Major, P.W.; Armstrong, D.T. y Greep, R.O. (1967). Endocrinology 81 : 19.
- 242 - Mancini, R.E.; Nolzco, J. y de la Balze, F.A. (1952). Anat. Record 114 : 127.

- 243 - Mancini, R.E.; Vilar, O.; Lavieri, J.C.; Andrada, J.A. y Heinrich, J.J. (1963). Am.J.Anat. 112 : 203.
- 244 - Maqsood, M. (1952). Biol.Rev. 27 : 281.
- 245 - Markwell, M.A.K.; Hass, S.M.; Beiber, L.L. y Tolbert, N.I. (1978). Anal.Biochem. 87 : 207.
- 246 - Marsh, J.M. (1975). Adv. Cyclic Nucleotide Res. 6 : 137.
- 247 - Masket, B.H.; Levy, R.I. y Fredickson, D.S. (1973). J.Lab. Clin.Med. 81 : 794.
- 248 - Mason, J.I.; Estabrook, R.W. y Purvis, J.L. (1973). Ann.N.Y. Acad.Sci. 212 : 406.
- 249 - Mason, N.R. y Savard, K. (1964). Endocrinology 75 : 215.
- 250 - Mathur, R.S.; Wiqvist, N. y Diezfalusy, E. (1972). Acta Endocrinol. 71 : 792.
- 251 - Mawinney, M.G.; Belis, J.A.; Thomas, J.A. y Lloyd, J.W. (1975). J.Pharmacol.Exp.Ther. 192 : 242.
- 252 - McEnergy, W.B. y Nelson, W.O. (1953). Endocrinology 52 : 93.
- 253 - McGuire, J.S. y Tomkins, G.M. (1959). J.Biol.Chem. 234 : 791.
- 254 - Menard, R.H.; Latif, S.A. y Purvis, J.L. (1975). Endocrinology 97 : 1587.
- 255 - Mendelson, C.; Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1975). J.Biol. Chem. 250 : 8818.
- 256 - Mendelson, C.; Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1975). Biochim. Biophys.Acta 411 : 222.
- 257 - Menon, K.M.J.; Dorfman, R.I. y Forchielli, E. (1967). Biochim.Biophys.Acta 148 : 486.
- 258 - Mishkel, M.A. y Crowther, S.M. (1976). Clin.Chim. Acta 74 : 139.

- 259 - Mitropoulos, K.A.; Venkatesan, S.; Balasubramaniam, S. y Peters, T.J. (1978). Eur.J.Biochem. 82 : 419.
- 260 - Mizutani, S.; Tsujimura, T.; Akashi, S. y Matsumoto, K. (1977). J.Clin.Endocrinol.Metab. 44 : 1023.
- 261 - Mock, E.J.; Norton, H.W. y Frankel, A.I. (1978). Endocrinology 103 : 1111.
- 262 - Molitch, M.; Edmonds, M.; Jones, E.E. y Opell, W.D. (1976). Am.J.Physiol. 230 : 907.
- 263 - Mombrial, F.C.; Begeot, M.; Leduque, P.; Dubois, P.; Saez, J. y Haour, F. (1984). Biochem.Biophys.Res.Commun. 118 : 206.
- 264 - Montagna, W. y Hamilton, J.B. (1952). Anat.Record 112 : 237.
- 265 - Mori, M. y Marsh, J. (1982). J.Biol.Chem. 257 : 6178.
- 266 - Morris, M.D. y Chaikoff, I.L. (1959). J.Biol.Chem. 234 : 1095.
- 267 - Moyle, W.R.; Jungas, R.L. y Greep, R.O. (1973). Biochem.J. 134 : 415.
- 268 - Mukherjee, C. y Caron, M.J. (1975). Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 72 : 1945.
- 269 - Negrie, C.; Bouhnik, J.; Michel, O. y Michel, R. (1978). J. Steroid Biochem. 9 : 1001.
- 270 - Negro-Vilar, A.; Saad, W.A. y McCann, S.M. (1977). Endocrinology 100 : 729.
- 271 - Nepokroeff, C.M.; Lakshmanan, M.R.; Ness, G.C.; Dugan, R.E. y Porter, J.W. (1974). Arch.Biochem.Biophys. 160 : 387.
- 272 - Niemi, M. y Ikonen, M. (1962). Endocrinology 70 : 167.
- 273 - Nimmo, G.A. y Cohen, P. (1978). Eur.J.Biochem. 87 : 341.

- 274 - Niswender, G.D.; Midgley, A.R.; Monroe, S.E. y Reichter, L. E. (1968). Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 128 : 807.
- 275 - Nordstrom, J.L.; Rodwell, V.W. y Mitschelen, J.J. (1977). J.Biol.Chem. 252 : 8924.
- 276 - Nozu, K.; Matsuura, S.; Catt, K.J. y Dufau, M.L. (1981). J.Biol.Chem. 256 : 10012.
- 277 - Odell, W.D. y Swerdloff, R.S. (1976). Res.Prog.Horm.Res. 32 : 289.
- 278 - Oppenheimer, J.H.; Schwartz, H.L. y Surks, M.I. (1974). Endocrinology 95 : 897.
- 279 - Osborne Jr., J.C. y Brewer Jr., H.B. (1977). Adv.Protein Chem. 31 : 253.
- 280 - Panda, J.N. y Jindal, S.K. (1980). Andrologia 12 : 444.
- 281 - Payne, A.; Downing, J.R. y Wong, K.L. (1980). Endocrinology 106 : 1424.
- 282 - Payne, F. (1944). Anat.Record 88 : 337.
- 283 - Pennington, R.J. (1961). Biochem.J. 80 : 649.
- 284 - Pignataro, O.P.; Tesone, M.; Ladenheim, R.G. y Charreau, E. H. (1984). XXIX Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Abstr. 265.Bs.As (Arg).
- 285 - Podestá, E.J.; Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1976). Mol.Cell. Endocrinol. 5 : 109.
- 286 - Porter, J.C. y Klaiber, M.S. (1965). Am.J.Physiol. 209 : 811.
- 287 - Preiss, B. y Lehoux, J.G. (1979). Biochem.Biophys.Res. Commun. 88 : 1140.
- 288 - Preslock, J.P. (1980). J.Steroid Biochem. 13 : 965.
- 289 - Quarfordt, S.H. y Hilderman, H.L. (1970). J.Lipid Res. 11 : 528.

- 290 - Radding, C.N. y Steinberg, D. (1960). J.Clin. Invest. 39 : 1560.
- 291 - Rall, J.E.; Robbins, J. y Lewallen, C.G. (1964). En: The Hormones. Eds.: Thimann, K.U. y Astwood, E.B. Vol. V, p. 376. Academic Press, New York.
- 292 - Ramachandra, M. y Bartke, A. (1984). Experientia 40 : 88.
- 293 - Raskin, P.; McGarry, J.D. y Foster, D.W. (1974). J. Biol. Chem. 249 : 6029.
- 294 - Rasmussen, A.T. (1932). En: Special Cytology (2^a Ed.) Ed: Cowdry, E.V. New York, Hoover. Vol. 3, p. 1673.
- 295 - Rodwell, V.W.; McNamara, D.J. y Shapiro, D.J. (1973). Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol. 38 : 373.
- 296 - Rommerts, F.F.G. y Brinkman, A.O. (1981). Mol. Cell. Endocrinol. 21 : 15.
- 297 - Rosenblum, M.F.; Huttler, C.R. y Strauss III, J.F. (1981). Endocrinology 109 : 1518.
- 298 - Rubin, R.T.; Gouin, P.R.; Lubin, A.; Poland, R.E. y Pirke, K.M. (1975). J. Clin. Endocrinol. Metab. 40 : 1027.
- 299 - Rubin, R.T.; Poland, R.E. y Tower, B.B. (1976). J. Clin. Metab. 42 : 112.
- 300 - Roheim, P.S.; Haft, D.E.; Gidez, L.I.; White, A. y Eder, H.A. (1963). J. Clin. Invest. 42 : 1277.
- 301 - Ryser, H.J.P. (1968). Science 159 : 390.
- 302 - Samuels, M.T.; Bussman, L.; Matsumoto, K. y Huseby, R.A. (1975). J. Steroid Biochem. 6 : 291.
- 303 - Samuels, L.T.; Short, J.G. y Huseby, R.A. (1964). Acta Endocrinol. 45 : 487.
- 304 - Savard, K.; Marsh, J.M. y Rice, B.F. (1965). Recent Prog. Horm. Res. 21 : 285.

- 305 - Savion, N.; Laherty, R.; Cohen, D.; Lui, G.M. y Gospodarowicz, D. (1982). *Endocrinology* 110 : 13.
- 306 - Scanu, A.M. (1972). *Biochim.Biophys.Acta* 265 : 417.
- 307 - Scatchard, G. (1949). *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 51 : 660.
- 308 - Schaefer, E.J.; Foster, D.M.; Jenkins, L.L.; Lindgren, F.T.; Berman, M.; Levy, R.I. y Brewer Jr., H.B. (1979). *Lipids* 14 : 511.
- 309 - Schnaitman, C.A. y Greenawalt, J.W. (1968). *J.Cell,Biol.* 38 : 158.
- 310 - Schneider, G.; Kopachi, K.; Ohanian, H.; Bonnefond, V.; Mittler, J. y Ertel, N.H. (1974). *Endocrinology* 105 : 674.
- 311 - Schoenheimer, R. y Breusch, F. (1933). *J.Biol.Chem.* 103 : 439.
- 312 - Schuler, L.A.; Langenber, K.K.; Gwynne, J.T. y Strauss III, J.F. (1981). *Biochim.Biophys.Acta* 664 : 583.
- 313 - Schuler, L.A.; Toaff, M.E. y Straus III, J.F. (1981). *Endocrinology* 108 : 1476.
- 314 - Searcy, R.L. y Bergquist, L.M. (1960). *Clin.Chim.Acta* 5 : 192.
- 315 - Shapiro, D.J.; Nordstrom, J.L.; Mitschelen, J.J.; Rodwell, V.W. y Schinke, P.Y. (1975). *Biochim.Biophys.Acta* 370 : 369.
- 316 - Shapiro, D.J. y Rodwell, V.W. (1969). *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 37 : 867.
- 317 - Sharpe, R.M. (1976). *Nature* 264 : 644.
- 318 - Shefer, S.; Hauser, S.; Lapar, U. y Mosbach, E.H. (1973). *J.Lipid Res.* 14 : 400.
- 319 - Shen, B.W.; Scanu, A.M. y Kezdy, F.J. (1977). *Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A* 74 : 837.

- 320 - Shettles, L.B. y Jones, G.E.S. (1942). Anat. Record 84 : 531.
- 321 - Schiff, T.S.; Roheim, P.S. y Eder, H.A. (1971). J. Lipid Res. 12 : 596.
- 322 - Shimizu, I.; Nagai, J.; Hatanaka, H. y Katsuki, H. (1973). Biochim. Biophys. Acta 296 : 310.
- 323 - Shimizu, I.; Nagai, J.; Hatanaka, H.; Saito, E. y Katsuki, H. (1971). J. Biochem. (Tokyo) 70 : 175.
- 324 - Simpson, E.R. (1979). Mol. Cell. Endocrinol. 13 : 213.
- 325 - Silverman, S.C.; Steinman, C.M. y Cohn, Z.A. (1977). Ann. Rev. Biochem. 46 : 669.
- 326 - Siperstein, M.D. y Guest, M.J. (1960). J. Clin. Invest. 39 : 642.
- 327 - Slakey, L.L.; Craig, M.C.; Beytia, E.; Briedis, A.; Feldbruegge, D.H.; Drugan, R.E.; Quereshi, A.A.; Subbarayan, C. y Porter, J.W. (1972). J. Biol. Chem. 247 : 3014.
- 328 - Smelser, G.K. (1939). Anat. Record 73 : 273.
- 329 - Snedecor, J.G. (1968 a). Gen. Comp. Endocrinol. 10 : 277.
- 330 - Solano, A.R.; Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1979). Endocrinology 105 : 372.
- 331 - Solod, F.A.; Armstrong, D.T. y Greep, R.O. (1966). Steroids 7 : 607.
- 332 - Srere, P.A.; Chaikoff, I.L. y Dauben, W.G. (1948). J. Biol. Chem. 176 : 829.
- 333 - Steinman, R.M.; Silver, J.M. y Cohn, Z.A. (1974). J. Cell Biol. 63 : 949.
- 334 - Stieve, H. (1930). En: Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen. Ed. von Müllendorf, W. Berlin. Vol 7, parte 2. p. 1.

- 335 - Stone, D. y Hechter, O. (1954). Arch. Biochem. Biophys. 51 : 457.
- 336 - Suescun, O.; de las Heras, M.; Calvo, J.C.; Radicella, J.P. Charreau, E.H. y Calandra, R.S. (1984). XXIX Reunión de la Soc. Argent. Invest. Clin. Abstr. 100 (Argentina).
- 337 - Sugiyama, T.; Clinkenbeard, K. Moss, J. y Lane, M.D. (1972). Biochem. Biophys. Res. Commun. 48 : 255.
- 338 - Tamaoki, B. (1973). J. Steroid Biochem. 4 : 89.
- 339 - Tcholakian, R.K.; Chowdhury, M. y Steinberger, E. (1974). J. Endocrinol. 63 : 411.
- 340 - Tesone, M. (1978). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Bs. As.).
- 341 - Thorell, J.J. y Johansson, B.G. (1971). Biochem. Biophys. Acta 251 : 363.
- 342 - Thorner, M.D.; McNeily, A.S.; Hagan, L. y Besser, G.M. (1974). Brit. Med. J. 2 : 419.
- 343 - Toren, D.; Menon, K.M.; Forchielli, E. y Dorfman, R.I. (1964). Steroids 3 : 381.
- 344 - Tsuruhara, T.; Dufau, M.L.; Cigorruga, S.E. y Catt, K.J. (1977). J. Biol. Chem. 252 : 9002.
- 345 - Turek, R.W. y Strauss III, J.F. (1982). J. Clin. Endocrinol. Metab. 54 : 367.
- 346 - Turley, S.D.; Andersen, J.M. y Dietschy, J.M. (1981). J. Lipid Res. 22 : 551.
- 347 - Turner, C.W. (1959). En: Reproduction in domestic animals. Eds.: Cole, H.H. y Cupps, P.T. Vol 1, p. 155. Academic Press, New York.
- 348 - Utiger, R.D. (1979). En: De Groot, L.J.; Cahill Jr., G.f.; Steimberger, E.; Winegrad, A.I. Eds. Endocrinology Grune & Stratton, New York, p. 479.

- 349 - Vacas, M.I. (1981). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Bs.As.).
- 350 - van der Molen, H.J. y Eik-Nes, K.B. (1971). Biochim. Biophys. Acta 248 : 343.
- 351 - van der Molen, H.J. y Rommerts, F.F.G. (1981). En: The Testis, Ed.: Burger, H. y de Kretser, D., p. 213, New York.
- 352 - van der Vusse, G.J.; Kalkman, M.L. y van der Molen, H.J. (1973). Biochim. Biophys. Acta 297 : 179.
- 353 - van der Vusse, G.J.; Kalkman, M.L. y van der Molen, H.J. (1974). Biochim. Biophys. Acta 348 : 404.
- 354 - van der Vusse, G.J.; Kalkman, M.L. y van der Molen, H.J. (1975). Biochim. Biophys. Acta 380 : 473.
- 355 - van Leusden, H. y Viller, C.A. (1965). Steroids 6 : 31.
- 356 - van Tienhoven, A. (1968). En: Reproductive Physiology of Vertebrates. Saunders. Philadelphia, Pennsylvania.
- 357 - Walsh, E.L.; Cuyler, W.K. y Mc Cullagh, D.R. (1934). Am. J. Physiol. 107 : 508.
- 358 - Walton, K.W.; Scott, P.J.; Dykes, P.W. y Davies, J.W. (1965). Clin. Sci. 29 : 217.
- 359 - Wattenberg, L.W. (1958). J. Histochem. Cytochem. 6 : 225.
- 360 - White, L.W. y Rudney, H. (1970). Biochemistry 9 : 2725.
- 361 - Wilson, M.J.; McMillin, J.M.; Seal, U.S. y Ahmed, K. (1976). Experientia 32 : 944.
- 362 - Wilwerth, A.M.; Martinez Campos, C. y Reineke, E.P. (1954). Poultry Sci. 33 : 729.
- 363 - Wong, C.H.; Döhler, K.D.; Geerlings, H. y Mühlen, A. (1983). Horm. Res. 17 : 202.

364 - Yamanaka, H.; Kirdani, R.Y.; Saroff, J.; Murphy, G.P.;
Sandberg, A.A. (1975). Am.J.Physiol. 229 : 1102.

365 - Yanaihara, T. y Troňn, P. (1972). J.Clin.Endocrinol.Metab.
34 : 783.

366 - Yount, E.A. y Harris, R.A. (1982). Arch.Biochem.Biophys.
217 : 503.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'E.A. Yount', written in a cursive style with a large loop at the end.A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R.A. Harris', written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.