

Tesis de Posgrado

Efectos de la prolactina sobre el testículo y vesículas seminales en roedores

Gonzalez, Silvia Inés

1993

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:

Gonzalez, Silvia Inés. (1993). Efectos de la prolactina sobre el testículo y vesículas seminales en roedores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2588_Gonzalez.pdf

Cita tipo Chicago:

Gonzalez, Silvia Inés. "Efectos de la prolactina sobre el testículo y vesículas seminales en roedores". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2588_Gonzalez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA
SOBRE EL TESTICULO Y
VESICULAS SEMINALES
EN ROEDORES**

Silvia Inés Gonzalez

TESIS DE DOCTORADO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

1993

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE EL
TESTICULO Y VESICULAS SEMINALES EN
ROEDORES**

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias
Químicas

Autor: Lic. Silvia Inés Gonzalez

Director: Dr. Ricardo S. Calandra

Lugar de Trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental

1993

Tesis
2588
uj 2

El presente Trabajo de Tesis ha sido realizado en el Instituto de Biología y Medicina Experimental, Vuelta de Obligado 2490, Buenos Aires, Argentina.

A José Luis, Federico, Guillermo y Martín

A mis papás

A mis hermanas

Si te caes siete veces, levántate ocho.

-Proverbio Chino-

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo S. Calandra, quien supo brindarme su consejo y su modo personal de orientación y estímulo para la concreción de este trabajo, por opinar y escuchar siempre mis opiniones.

A los Dres. Ernesto Podestá y Alejandro De Nicola, por haberme permitido continuar con la realización de mis tareas de investigación en el Instituto de Biología y Medicina Experimental.

Al Dr. Enrique del Castillo por su colaboración en la preparación de ratas con homotransplante.

Al Dr. A. Bartke por su colaboración en la preparación de ratones con homotransplante,

A la Dra. María Olga Suescun por facilitarme la utilización de las ratas con Tumor 7315a.

A la Dra. María Irene Vacas de Tejero por su amistad, su incondicional e inestimable consejo y estímulo y por haber creído en mi cuando ni yo misma podía hacerlo.

A la Dra. Selva B. Cigorruga por su infaltable apoyo, sus observaciones precisas y coherentes y por su sincera y cálida disposición y amistad.

A la Dra. Rosa Erra Balsells de Reca por estar siempre dispuesta a brindarme esa cuota de equilibrio y serenidad tan ausentes en mi espíritu.

A la Lic. Susana B. Rulli, Paula Durante, Dra. Helena F. Scheingart y Dr. Hector Coirini por su paciencia e invalorable ayuda en la preparación de esquemas y dibujos de este trabajo.

A mis compañeras de Laboratorio: Isabel, Olga, Susana, Paula y Mónica por crear el ambiente indispensable para la realización de la tarea diaria.

A la Lic. María Teresa Di Vietro por su eficiente colaboración y dedicación.

Al personal del Instituto de Biología y Medicina Experimental por cooperación en la realización del trabajo diario.

Al Instituto de Biología y Medicina Experimental por haberme permitido disponer de todos los elementos que posibilitaron el desarrollo de este trabajo.

A José Luis, Federico, Guillermo y Martín por su infinita paciencia, comprensión y cariño que hicieron posible que este trabajo pudiera finalmente concretarse.

Abreviaturas utilizadas

ADN	ácido desoxiribonucleico
AE	actividad específica
AMPc	adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucleico
AT	N ¹ -acetil transferasa
dansilo	p-dimetilamino-naftalensulfónico
DE50	dosis efectiva 50
DHT	5 α -dihidrotestosterona, 5 α -androstano-17 β -ol-30ona
3 α / β -Diol	5 α -androstano-3 α / β , 17 β -Diol
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
ES	error estandard
Esd	espermidina
Esp	espermina
FSH	hormona folículo estimulante
GH	hormona de crecimiento
hCG	gonadotrofina coriónica humana
3 β -HDH	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
3 α / β -HOR	3 α / β -hidroxiesteroide óxido reductasa
LH	hormona luteinizante
NAD	nicotinamida-adenina-dinucleótido

ODC	ornitina decarboxilasa
PGF	factor de crecimiento plaquetario
PRL	prolactina
PRL-o	prolactina ovina
Pu	putrescina, 2,4-diaminobutano
RIA	radioinmunoensayo
SamDC	S-adenosil-metionina decarboxilasa
SCC	complejo enzimático que rompe la cadena lateral del colesterol
SCP2	proteína transportadora de colesterol
T	testosterona, 4-androsteno-17 β -ol-3-ona
TCA	ácido tricloroacético
TGF	factor de crecimiento transformante
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UI	Unidades internacionales

CONSIDERACIONES GENERALES.....1

INTRODUCCION

Tracto genital masculino.....4

Anatomía de las vesículas seminales.....6

Anatomía del testículo.....6

Células de Leydig.....11

Biosíntesis de andrógenos.....14

Regulación de la síntesis de andrógenos.....20

Metabolismo de la testosterona.....22

5 α -Reductasa.....26

3 α / β -Hidroxiesteroide óxido-reductasa.....29

Prolactina.....31

Mecanismo de acción de la prolactina.....34

Efecto de la prolactina sobre testículo.....35

Efecto de la prolactina sobre vesículas seminales.....38

Efecto de la prolactina en la etapa puberal.....39

Poliaminas: estructura y función.....43

Biosíntesis de poliaminas.....46

Regulación de la biosíntesis de poliaminas.....49

Fisiología de las poliaminas en los órganos sexuales
accesorios.....51

Modulación de la actividad ornitina decarboxilasa por prolactina.....	53
---	----

<u>OBJETIVOS</u>	56
-------------------------------	----

MATERIALES Y METODOS

Drogas y reactivos.....	59
-------------------------	----

ANIMALES

Preparación de ratas con homotransplante.....	60
---	----

Preparación de ratones enanos con homotransplante.....	61
--	----

Preparación de ratas con implante de Tumor 7315a.....	62
---	----

Inyección intratesticular de prolactina.....	64
--	----

PREPARACION DE TEJIDOS

a.- Homogenato de testículo.....	65
----------------------------------	----

b.- Preparación de microsomas.....	65
------------------------------------	----

c.- Obtención de túbulos seminíferos y células intersticiales.....	66
--	----

d.- Cultivo primarios de células de Leydig.....	68
---	----

METODOS

Viabilidad celular.....	69
-------------------------	----

Determinación de la actividad 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.....	70
---	----

Producción de andrógenos "in vitro"

a.- Testículos enteros decapsulados.....	71
--	----

b.- Suspensión de células intersticiales.....	72
c.- Células intersticiales en cultivos primarios.....	72
Efecto "in vitro" de prolactina	
a.- Incubación de testículos con prolactina.....	73
b.- Incubaciones de túbulos seminíferos y suspensiones de células de Leydig.....	74
c.- Efecto de prolactina en células de Leydig en cultivo primario.....	74
Determinación de la actividad 5 α -reductasa.....	75
Determinación de la actividad 3 α / β hidroxisteroide óxido-reductasa.....	77
Determinación de hormonas proteicas.....	78
Determinación de andrógenos.....	79
Determinación de ADN.....	80
Incorporación de uridina.....	81
Determinación de AMPc.....	82
Determinación de ornitina decarboxilasa.....	83
Determinación de putrescina y poliaminas.....	84
Determinación de acetilpoliaminas.....	86
Otros Métodos	
Determinación de proteínas.....	87
Análisis estadístico.....	87

RESULTADOS

I.- EFECTO DE LA PRL SOBRE EL TESTICULO

I. A.- ESTUDIOS "IN VIVO"

I. A. 1.- Estudios en ratas con homotransplante de hipófisis

Valores hormonales séricos.....	88
Producción de andrógenos "in vitro" por testículo total.....	89
Producción de andrógenos "in vitro" por células de Leydig....	91
Actividad 5 α -reductasa en homogenato testicular.....	91
Actividad 5 α -reductasa en microsomas testiculares.....	94

I. A. 2.- EFECTO LOCAL "IN VIVO" DE PROLACTINA

Inyección intratesticular de prolactina y actividad 5 α -reductasa.....	96
---	----

I. A. 3.- ESTUDIOS EN RATAS CON TUMOR 7315a

Perfil hormonal sérico.....	98
Efecto del implante del Tumor 7315a sobre la actividad 5 α -reductasa testicular.....	99
Efecto del implante del Tumor 7315a sobre el peso testicular.....	99
Efecto del implante del Tumor 7315a sobre actividad ODC y niveles de poliaminas testiculares.....	99

I. B.- ESTUDIOS "IN VITRO"

I. B. 1.- Efecto "in vitro" de prolactina sobre el metabolismo de andrógenos.

Incubación de testículo entero con prolactina.....106

Incubación de prolactina ovina con fracciones testiculares aisladas.....109

I. B. 2.- Efecto de prolactina ovina en cultivos primarios de células de Leydig.

Morfología de los cultivos.....113

Producción basal de andrógenos de las células intersticiales en cultivo.....116

Respuesta esteroidogénica de las células intersticiales en cultivo.....116

Curva dosis-respuesta a hCG.....119

Producción de AMPc en células intersticiales en cultivo.....119

Efecto agudo de la prolactia sobre la producción basal de 3α -Diol.....119

Efecto prolongado de PRL sobre la producción de 3α -Diol.....123

Actividad 5α -reductasa y $3\alpha/\beta$ -hidroxiesteroide oxidoreductasa en células de Leydig en cultivo.....126

Incorporación de ^3H -uridina en células de Leydig en cultivo.....126

II. EFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE LAS VESICULAS SEMINALES

II. 1.- ESTUDIOS EN RATAS CEPA BUFFALO PORTADORAS DE TUMOR 7315a

Niveles hormonales séricos.....	129
Efecto del Tumor 7315a sobre el peso de las vesículas seminales.....	129
Efecto del Tumor 7315a sobre actividad de ornitina decarboxilasa en vesiculas seminales e hígado.....	131
Efecto del Tumor 7315a sobre los niveles de poliaminas en vesículas seminales.....	131

II. 2.- ESTUDIOS EN RATONES ENANOS DE LA CEPA AMES (df/df)

Perfil hormonal sérico.....	138
Efecto de la prolactina sobre el peso corporal.....	140
Efecto de la prolactina sobre el peso de vesículas seminales.....	140
Efecto de la prolactina sobre la actividad ornitina decarboxilasa en vesículas seminales.....	142
Efecto de la prolactina sobre los niveles de poliaminas en vesículas seminales.....	145
Efecto de la prolactina sobre los niveles de acetil- poliaminas en vesículas seminales.....	148

<u>DISCUSION</u>	154
<u>CONCLUSIONES</u>	181
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	183

CONSIDERACIONES GENERALES

"La vida es una relación entre moléculas
y no una propiedad de cada molécula".

Pauling, 1960.

Las glándulas endócrinas y sus hormonas son una advertencia que la vida es un estado de la materia altamente improbable, que depende, para su mantenimiento, del éxito con el cual los sistemas químicos, altamente complejos y sensibles, continúan sus actividades en un entorno que les resulta fundamentalmente hostil. Este éxito puede ser alcanzado sólo si las partes constituyentes de los sistemas químicos están armoniosamente integrados y continuamente regulados en respuesta a los cambios en las condiciones tanto internas como externas.

El progreso de la evolución orgánica depende, por lo tanto, del establecimiento de mecanismos coordinados. La importancia de los agentes químicos, conocidos como hormonas, radica en la contribución que estos compuestos han hecho para que se cumpla este requerimiento tan fundamental de la vida.

A lo largo de la evolución hay un desarrollo paralelo de las células productoras de hormonas (glándulas endócrinas), sus productos hormonales, el mecanismo intracelular que permite a las células responder a tales productos y los tejidos auxiliares, los

cuales participan regulando la función de la glándula. Las glándulas endócrinas tienen un papel central en todos los procesos fundamentales de la vida de un organismo: adaptación a circunstancias nutricionales o del entorno que amenazan la vida o la salud; perpetuación de la especie, es decir, la reproducción; crecimiento y diferenciación estructural y bioquímica.

La prolactina (PRL), a diferencia de otras hormonas hipofisarias, no se ha especializado desde las primeras etapas de la evolución de los vertebrados, en una función principal única. En cambio, esta hormona está involucrada en una amplia variedad de eventos celulares, muchos de los cuales, son particulares de una especie o grupo. Esta multiplicidad de efectos sugiere que la molécula de PRL ha estado sujeta a procesos evolutivos que le han permitido adquirir nuevas capacidades durante el curso de la filogenia de los vertebrados (Blum, 1975). Esta multiplicidad de acciones, ha llevado a Nicoll (1980) a proponer que la ontogenia de la función de la hormona refleja su historia filogenética.

La evidencia disponible sugiere que las funciones más destacadas de la hormona, a lo largo de la escala evolutiva, han sido las acciones osmoregulatorias y los efectos sobre el crecimiento y desarrollo.

En los mamíferos, la acción de PRL se consideró inicialmente restringida al proceso de lactancia. Sin embargo, en la actualidad, es indiscutida la influencia de esta hormona en la función reproduc-

tiva, así como en el desarrollo y crecimiento de las glándulas sexuales accesorias.

El propósito del presente trabajo ha sido contribuir a ampliar el conocimiento en algunos de los procesos en los que participa la PRL.

INTRODUCCION

Tracto genital masculino

El tracto genital masculino de los roedores está formado por los testículos y un conjunto de glándulas y conductos como está esquematizado en la Figura 1.

Los testículos, que serán los encargados de la producción de los espermatozoides, se desarrollan en el interior de la cavidad abdominal del embrión masculino. Antes del nacimiento descienden hacia el escroto, un saco cubierto de piel que se encuentra suspendido en la región genital. Del testículo emerge el conducto deferente, el cual desemboca en el epidídimo, órgano encargado de la maduración y transporte del esperma. A partir de ambos epidídimos, se origina el conducto espermático, el que se prolonga a través del conducto inguinal y penetra en la cavidad pélvica. Cada conducto deferente desemboca en un conducto eyaculador corto, los que luego de atravesar la próstata, se comunican con la uretra. Esta, recorriendo el pene en toda su extensión, desemboca en el exterior por medio del meato uretral.

El plasma seminal se forma a partir de las secreciones de un conjunto de glándulas accesorias tales como próstata, glándulas bulbouretrales o de Cowper, glándulas de Littré, glándulas prepuciales y vesículas seminales.

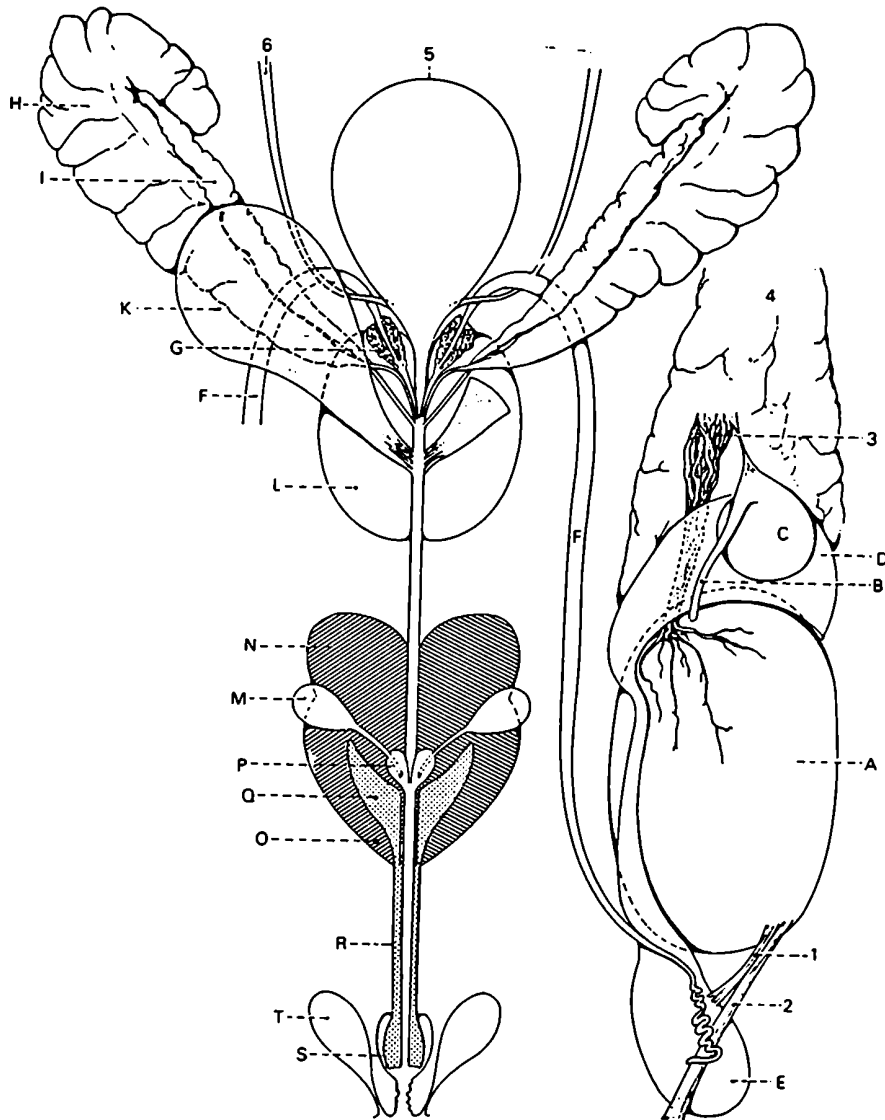


Figura 1: Esquema del tracto genital masculino de la rata.

A: testículo; B+C: porción extratesticular de la rete testis; D: cabeza del epidídimo; E; cola del epidídimo; F: ductus deferente; G: glándula del ductus deferente; H: vesículas seminales; I: glándula coagulante; K: lóbulo ventral de la próstata; L: lóbulo dorsolateral de la próstata; M: glándula bulbouretral; N: músculo bulbocavernoso; O: músculo isquiocavernoso; P: divertículo uretral; Q: extremo proximal del pene; R: cuerpo del pene; S: glándula penial; T: glándula prepucial; 1: ligamento propio del testículo; 2: ligamento de la cola epididimaria; 3: plexo pampiniforme; 4: tejido adiposo; 5: vesícula urinaria; 6: ureter.

Anatomía de las vesículas seminales

Las vesículas seminales fueron así denominadas por la creencia equivocada que eran receptáculos o reservorios de esperma. (Setchell y Brooks, 1988). Consisten en un par de glándulas con forma de bolsa o saco, pero en su cara interna presenta un intrincado sistema de pliegues que forman divertículos irregulares. El epitelio es pseudoestratificado, formado por una fila de células basales redondeadas y otra de células columnares. El resto de la glándula se compone de tejido conectivo suelto, una capa de tejido muscular liso y un revestimiento externo de tejido conectivo (Figura 2) (Levey y Szego, 1955; Mariotti y Mawhinney, 1982).

Anatomía del testículo

Los testículos de todos los mamíferos consisten en un par de órganos ovoides rodeados por una cápsula tejido conectivo denso, la túnica albugínea. Esta, a su vez, está cubierta, anterior y lateralmente, por la túnica vaginalis (de Kretser y Kerr, 1988). Interiormente, cada testículo está formado por dos compartimientos enteramente distintos en yuxtaposición. Un compartimiento interno, no vascularizado: los túbulos seminíferos, que junto con el epidídimo forma una unidad funcional para la producción, maduración y alma-

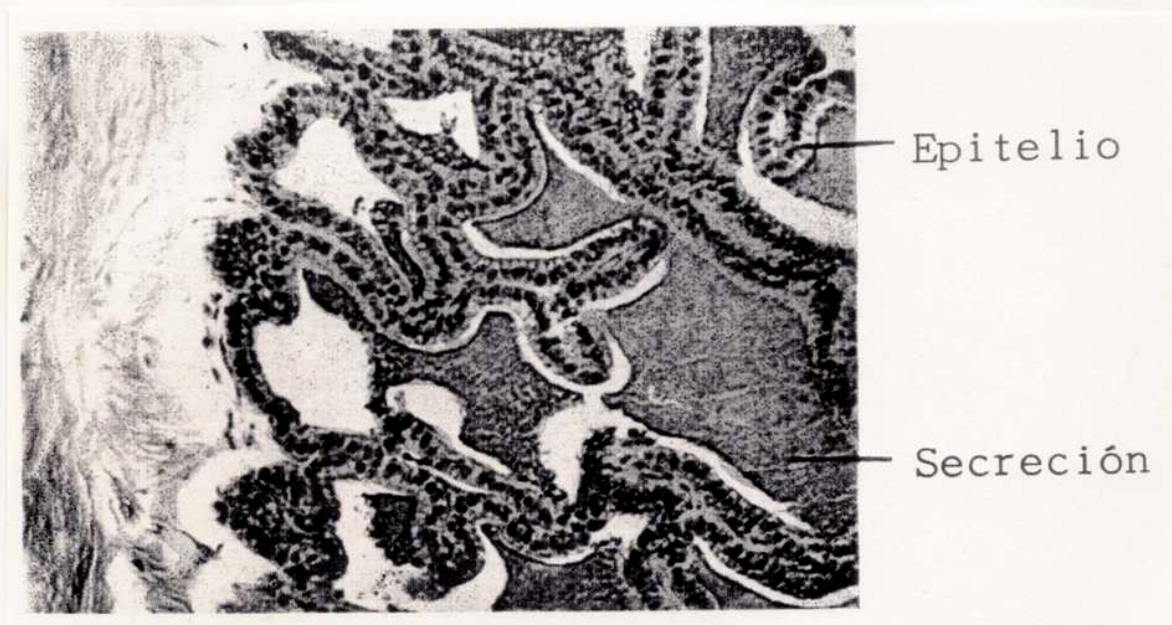


Figura 2: Microfotografía de un corte de vesícula seminal de ratón.

Se observa el intrincado sistema de pliegues del epitelio. Aumento 175 X.

cenamiento de los espermatozoides; y un segundo compartimiento, altamente vascularizado, que contiene las células intersticiales: fibroblastos, macrófagos (Niemi y col., 1986), linfocitos (Ritchie y col., 1984) y, principalmente, células de Leydig, productoras de hormonas androgénicas. Mientras que los túbulos y sus elementos celulares retienen un alto grado de orden y organización anatómica, las células de Leydig están distribuidas al azar alrededor de los túbulos, rodeadas de tejido conectivo suelto, que forma el tejido intersticial (Figura 3).

A pesar de la aparente dualidad de función e independencia anatómica, se logra un alto grado de interacción bioquímica entre los dos compartimientos. El proceso de espermatogénesis puede ser sólo mantenido en presencia de andrógenos. La transferencia de sustancias entre los dos compartimientos está limitado por una barrera de difusión presente dentro del túbulo a nivel de las células de Sertoli. Pares adyacentes de células de Sertoli se unen de una manera especial y se divide al epitelio seminífero en dos pequeños compartimientos: un compartimiento basal, que representa el espacio entre la túnica propia del túbulo y la unión de las células de Sertoli, que contienen las espermatogonias y un compartimiento adluminal, que consiste en el área por encima de la unión de las células, se continúa con el lumen del túbulo y alberga las células germinales remanentes. Esta barrera es altamente discriminatoria (Dym y Fawcet, 1970). Ciertas proteínas plasmáticas (ferri-

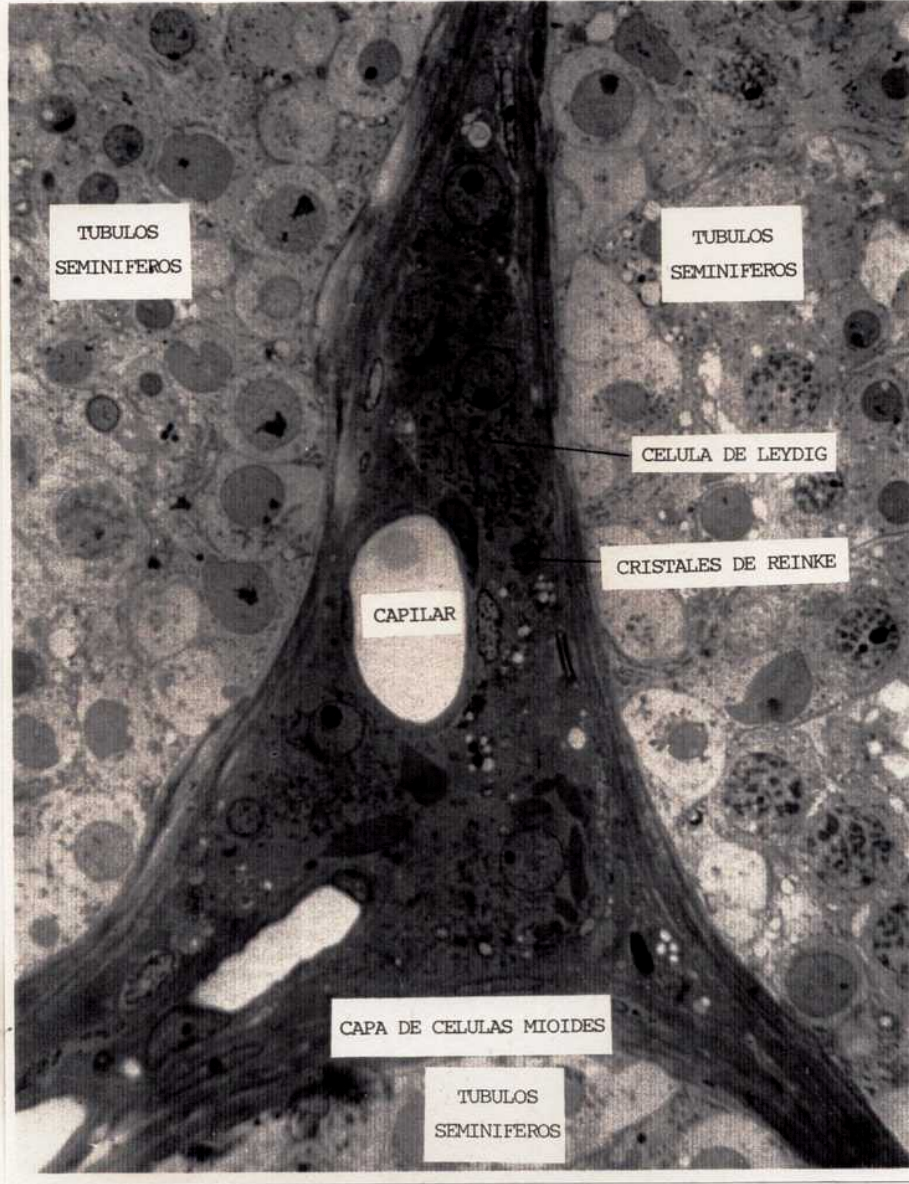


Figura 3: Microfotografía de un corte de testículo humano.

Se observan los túbulos seminíferos y el tejido intersticial. Aumento 1400 X.

tina, albúmina) no pueden atravesar la barrera, mientras que proteínas tales como FSH y LH se transfieren fácilmente entre los dos compartimientos. Esta discriminación también ocurre con compuestos de bajo peso molecular. Ciertos azúcares y aminoácidos pasan fácilmente, pero no otros compuestos de peso molecular equivalente. Existe un alto grado de transferencia de esteroides entre los fluidos de ambos compartimientos.

Células de Leydig

En el año 1850, Franz Leydig describió las células intersticiales del testículo de varios mamíferos. Las principales características observadas en las células de Leydig son comunes a todos los vertebrados, si bien existen algunas diferencias entre especies (Christensen, 1975) (Figura 4). Estas células tienen forma poligonal con un diámetro promedio de 15 μm y poseen una membrana plasmática que presenta, a menudo, pliegues o microvellosidades. La organela citoplasmática más prominente es el abundante retículo endoplásmico liso, cuya superficie provee los sitios de localización para numerosas enzimas necesarias en el proceso esteroidogénico. El retículo endoplásmico consiste en una serie de membranas interconectadas formando túbulos de 800 - 1200 Å de diámetro, que constituyen una malla continua a través del citoplasma. Se observan también, zonas

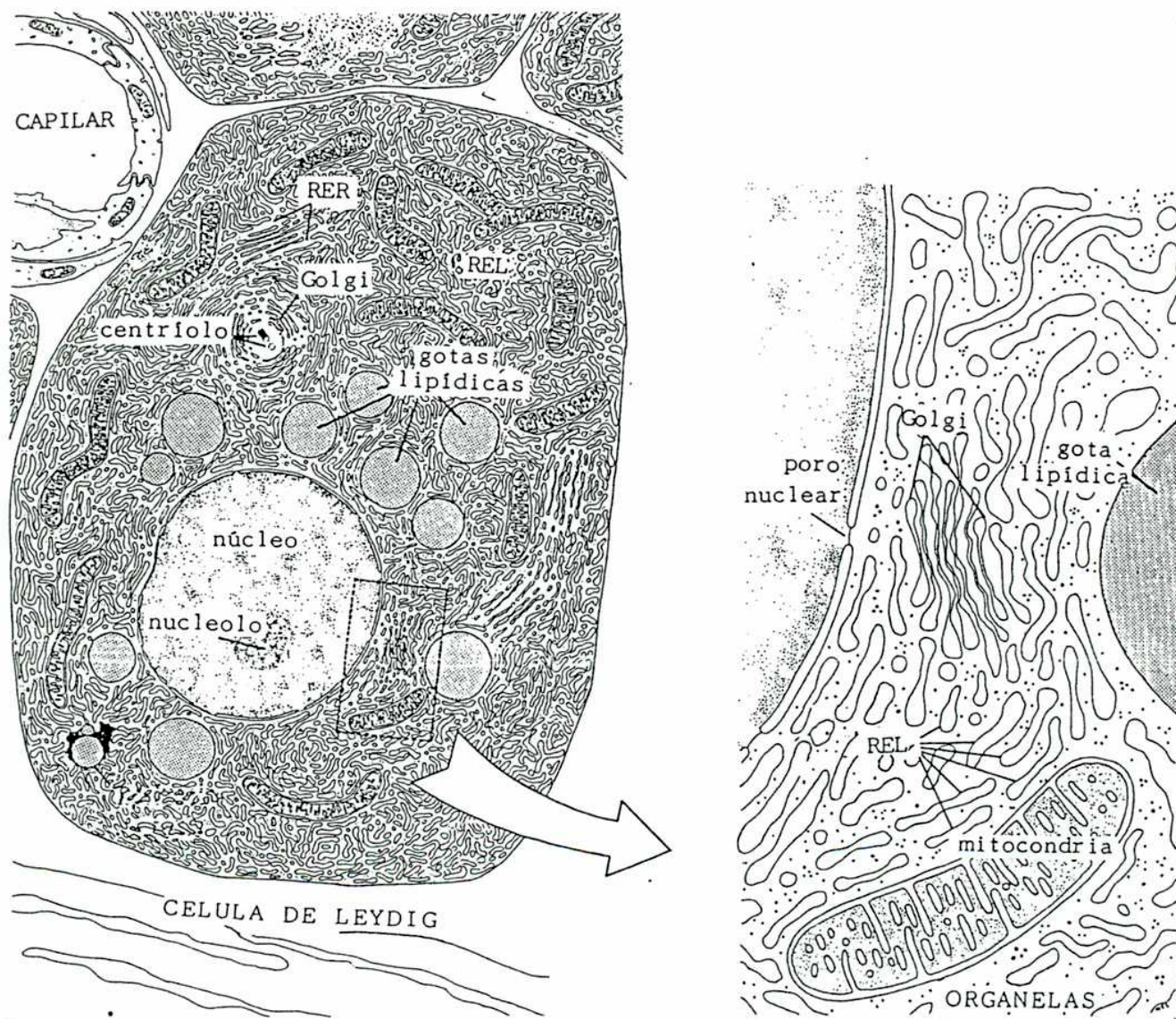


Figura 4: Esquema de la célula de Leydig

RER: retículo endoplásmico rugoso; REL: retículo endoplásmico liso.

de retículo endoplásmico liso que se interconectan con el rugoso. El complejo de Golgi está bien desarrollado y, aunque la extensión de este complejo puede ser visto en cualquier lugar del citoplasma, comunmente está ubicado cerca de un polo del núcleo. Los elementos característicos del Golgi consisten de 4-6 sacos aplanados, próximos unos de otros, con pequeñas vesículas en su periferia. Ewing y Zirkin (1983) han establecido una marcada correlación entre la secreción de testosterona y la cantidad de retículo endoplásmico liso y las membranas del Golgi, indicando el rol central que estas organelas tienen en determinar la cantidad de testosterona secretada por una única célula de Leydig. Las mitocondrias son de tamaño y número moderados, conteniendo cristales que aparecen comunmente en forma lamelar, si bien algunos son tubulares. Por otra parte, puede observarse cerca del Golgi, dos centríolos orientados perpendicularmente uno del otro. Dependiendo de las especies, las células de Leydig pueden exhibir una cantidad variada de gotas lipídicas. Es común encontrar lisosomas primarios y vacuolas digestivas. Los microtúbulos y microfilamentos se encuentran en todo el citoplasma, a menudo formando una malla subyacente a la membrana plasmática. Es interesante comentar que sólo las células de Leydig humanas contienen cristales de Reinke, fácilmente visibles al microscopio. También, estas células contienen proteínas en su interior, si bien no se ha aclarado aún su función (de Kretser y Kerr, 1988). El núcleo presenta uno o dos nucleolos prominentes (Christensen, 1975),

es grande, más o menos redondeado u oval y exhibe un borde delgado de heterocromatina periférica, que se interrumpe sólo en los poros de la envoltura nuclear.

Biosíntesis de andrógenos

En el macho, los andrógenos son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de tejidos reproductivos específicos, tales como próstata, epidídimo, vesículas seminales y pene, así como en la aparición de las características sexuales secundarias, el desarrollo del sistema músculo-esquelético, la retroinhibición del eje hipotálamo-hipofisario y la estimulación de la espermatogénesis. Además, los andrógenos estimulan una variedad de otros tejidos, tales como la piel, hematíes y riñones (Mooradian y col., 1987). Para mantener la concentración de andrógenos en niveles apropiados, la velocidad de producción de estas hormonas está balanceado con su depuración metabólica y excreción. La acción de los andrógenos en los órganos blanco depende de la cantidad de esteroides que pueden penetrar en la célula, conversión metabólica intracelular a compuestos activos, interacciones con el receptor y finalmente la acción del complejo receptor-hormona a nivel genómico.

Los andrógenos son sintetizados fundamentalmente por los testículos, en las células de Leydig. Procedimientos histoquímicos

indican que los andrógenos son también sintetizados y secretados, en cierta medida, por las células de Sertoli y en menor proporción, por las células germinales específicas dentro de los túbulos seminíferos (Turner y Bagnara, 1976; Preslock, 1980). Aunque las células de Leydig son las de mayor importancia para la generación de los andrógenos circulantes, la corteza adrenal también contribuye con la elaboración de estas hormonas. La producción de esteroides no está limitada a las glándulas endócrinas; así, una pequeña cantidad puede ser también producida en el cerebro (Hu y col., 1987). Aunque la contribución de estas distintas células es muy discreta, la producción local de esteroides puede ser fisiológicamente muy importante y las reacciones esteroidogénicas que ocurren en estos distintos tipos celulares comparten muchas características similares.

Las enzimas e intermediarios involucrados en el camino biosintético de andrógenos están esquematizados en la Figura 5. El sustrato en la síntesis de esteroides es el colesterol, que puede ser sintetizado "de novo" a partir de acetato o también puede ser incorporado a la célula por medio de las lipoproteínas plasmáticas. Por otro lado, las gotas lipídicas intracelulares que contiene ésteres de colesterol constituyen una reserva de este compuesto.

El aporte de las lipoproteínas o las reservas en las gotas lipídicas depende de las especies y de la calidad de estímulos en la producción de esteroides.

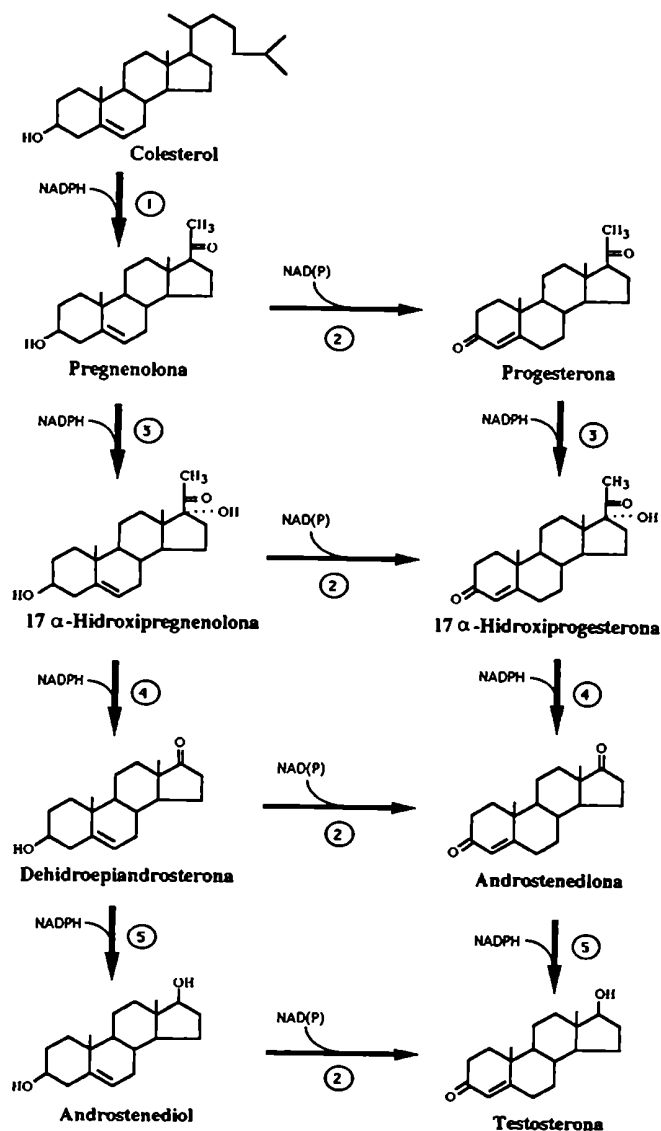


Figura 5: Biosíntesis de andrógenos testiculares.

1: complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol; 2: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/4-5 isomerasa; 3: 17α-hidroxilasa; 4: 17,20-liasa; 5: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

La reacción más importante del camino esteroideogénico es la conversión de colesterol a pregnenolona, catalizada por un complejo multienzimático, dependiente de citocromo P-450, que rompe la cadena lateral del colesterol (SCC) y se ubica en la membrana interna mitocondrial (Shikita y Hall, 1973). Subsecuentemente, la pregnenolona es convertida en una variedad de esteroides de 19 átomos de carbono, por las enzimas oxidativas del retículo endoplásmico, muchas de las cuales pertenecen al grupo de hemoproteínas denominadas citocromo P450, que hidroxilan, reducen, isomerizan y clivan los intermediarios esteroideos. Esta conversión es realizada a través de los caminos denominados $\Delta 4$ o $\Delta 5$. Esta terminología designa la posición que el enlace insaturado mantiene durante la conversión de intermediarios a testosterona. Si la pregnenolona es inicialmente convertida por el complejo 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta 4$ -5 isomerasa, que convierte los anillos A y B de la pregnenolona en una estructura $\Delta 4$ -3 ceto, predominará el camino $\Delta 4$; en cambio, si la pregnenolona es convertida por la enzima P450 - C17 (17-20 liasa) predominará el camino $\Delta 5$ (Hall, 1988). El camino preciso, utilizado para la formación de testosterona, depende de las propiedades y cantidad de las diferentes enzimas, así como de la disposición u ordenamiento en que estas enzimas están integradas dentro de la bicapa lipídica (Figura 6). Existen evidencias preliminares que sugieren la presencia de una proteína ligadora de pregnenolona en ciertos puntos determinados de la membrana microsomal (Hall, 1984),

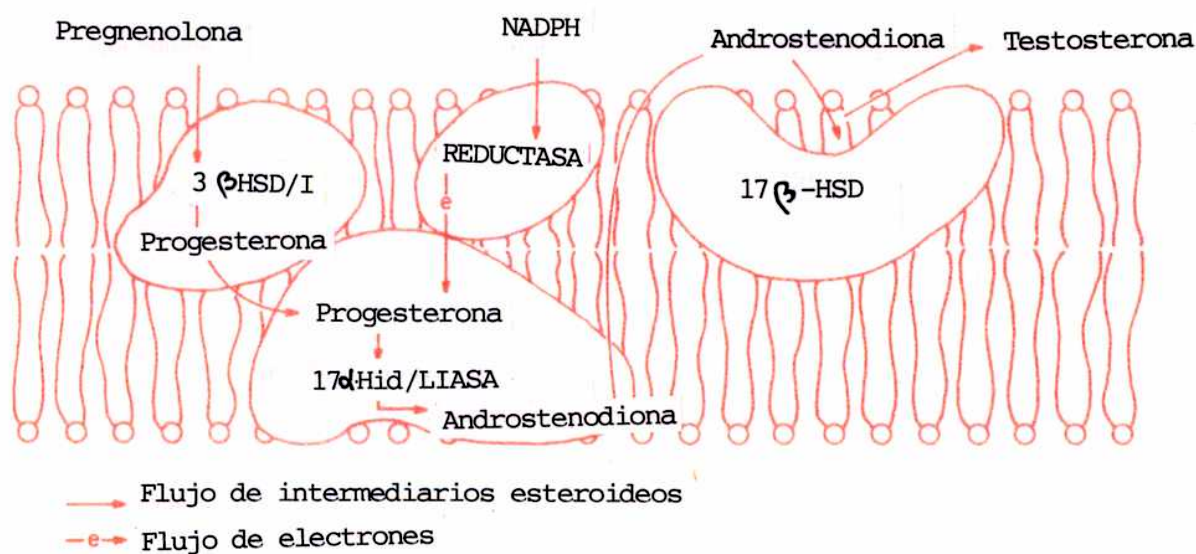


Figura 6: Metabolismo de la pregnenolona en el retículo endoplásmico.

3β-HSD/I: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/4-5 isomerasa; 17α-Hid./liasa: 17α-hidroxilasa/17,20-liasa; 17β-HSD: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

que determinaría la secuencia de reacciones involucradas en la conversión de pregnenolona a androstenediona (Baskin y Yang, 1982; Bendayan, 1984; Lambeth y col., 1984). Se ha demostrado, que el camino $\Delta 4$ es la ruta de síntesis preferida tanto en la rata como en el ratón (Beyer y Samuels, 1956; Ahmad y Gower, 1966). Contrariamente, en el testículo humano el camino $\Delta 5$ es el utilizado para la síntesis de testosterona.

La enzima microsomal 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa cataliza la interconversión de androstenediona al andrógeno más importante, testosterona. Se ha señalado que esta enzima es activada por producto (Oshima y Ochiai, 1973), reversible y posee dos sitios activos (Samuels y col., 1975).

Todas las enzimas del retículo endoplásmico funcionan como si se tratara de un complejo multienzimático constituyendo una trampa metabólica para la pregnenolona liberada por la mitocondria.

En humanos, en condiciones normales, la capacidad del sistema enzimático que metaboliza pregnenolona es insuficiente para convertir toda la pregnenolona en testosterona. Como resultado, diversos metabolitos intermedios escapan de las células de Leydig. Esto ilustra porque el paso de velocidad limitante para la producción de testosterona está localizado a nivel del retículo endoplásmico, mientras que el paso limitante de la esteroidogénesis (regulado por LH) esté a nivel de la actividad de las enzimas que escinden la cadena lateral del colesterol dentro de la mitocondria (van

Haren y col., 1989).

Regulación de la síntesis de andrógenos

La disponibilidad de colesterol en la membrana interna mitocondrial es uno de los factores que limitan la síntesis de andrógenos. El aporte de colesterol a la mitocondria requiere la presencia de una proteína transportadora (SCP2) (van Noort y col., 1988). Otro factor de importancia es la cantidad y actividad del sistema SCC - cit P450 y la capacidad de liberación de equivalentes reductores del NADPH al cit P450 vía flavoproteínas y ferroproteínas no hémicas. Sin embargo, la esteroidogénesis testicular se encuentra bajo control hipofisario, a través de la secreción de LH y FSH. La hormona más importante en el control de la célula de Leydig es LH, si bien participan además otras hormonas y factores producidos localmente (Verhoeven, 1992). Las hormonas regulan la producción de esteroides controlando las actividades metabólicas de las células, así como la proliferación y diferenciación de la población de células de Leydig (Chemes y col., 1985).

Por otro lado, FSH es el principal factor regulatorio del epitelio seminífero, que actúa en conjunto con los andrógenos elaborados en el intersticio. Como se mencionara anteriormente, la FSH ejerce, asimismo, un efecto regulatorio sobre la actividad de las

células de Leydig, mediante de la secreción de proteínas específicas (Saez y col., 1991).

La acción de LH sobre la esteroidogénesis se ejerce a través de la unión con sus receptores de membranas, cuya estructura ha sido recientemente dilucidada (Loosfelt y col., 1989; McFarland y col., 1989). La unión de LH a sus receptores induce un cambio conformacional en la proteína G, que activa a la adenilato ciclasa ocasionando un aumento en la síntesis de AMPc (Duffau y col., 1973). El AMPc resultante se une a la subunidad regulatoria de una quinasa de proteína, causando la liberación de una subunidad catalítica activa. Así, la proteína quinasa activada cataliza la fosforilación de proteínas intracelulares. Algunas de estas fosfoproteínas pueden regular de manera rápida la síntesis de proteínas a nivel ribosomal, mientras que una fosfoproteína nuclear podría mediar los efectos tróficos de LH regulando la expresión genética (Rommerts y Cooke, 1988). Otras fosfoproteínas pueden estar conectadas con el citoesqueleto e intervenir en la transferencia intracelular de colesterol.

El control trófico de la actividad esteroidogénica en la mitocondria y el retículo endoplásmico liso está ejercida principalmente por la regulación de la biosíntesis de la enzimas esteroidogénicas a través del aumento en los niveles de ARNm. Este es un proceso relativamente lento y es efectivo luego de varias horas de estimulación con LH.

Está fehacientemente comprobado que el AMPc actúa como segundo

mensajero en el mecanismo de acción de LH a nivel testicular. Sin embargo, dado que bajas concentraciones de LH estimulan la esteroidogénesis sin cambios detectables en los niveles de AMPc, se ha indicado que en estas condiciones pueden operar otros mensajeros (Hall, 1988). Se ha indicado que el ión calcio y calmodulina son esenciales para completar la actividad esteroidogénica, pero no está claro a que nivel el calcio ejerce un rol determinado (Romerts, 1990). Fosfolípidos, fosfolipasas específicas y productos del metabolismo de fosfolípidos (leucotrieno) son, también, de fundamental importancia en la traducción de señales de diversos tipos. Estos compuestos también han sido detectados en células de Leydig, pero aún debe demostrarse en que proporción son esenciales en los efectos de LH sobre la esteroidogénesis (Romerts, 1990).

Metabolismo de la testosterona

El nivel sérico de los esteroides biológicamente activos está determinado por la velocidades de síntesis y degradación. La metabolización de la testosterona puede seguir dos caminos (Figura 7). Por un lado, la testosterona puede sufrir una 5α -reducción irreversible originando principalmente DHT. Estos metabolitos 5α -reducidos desarrollan muchas de las acciones funcionales de crecimiento involucradas en la diferenciación sexual del macho y la

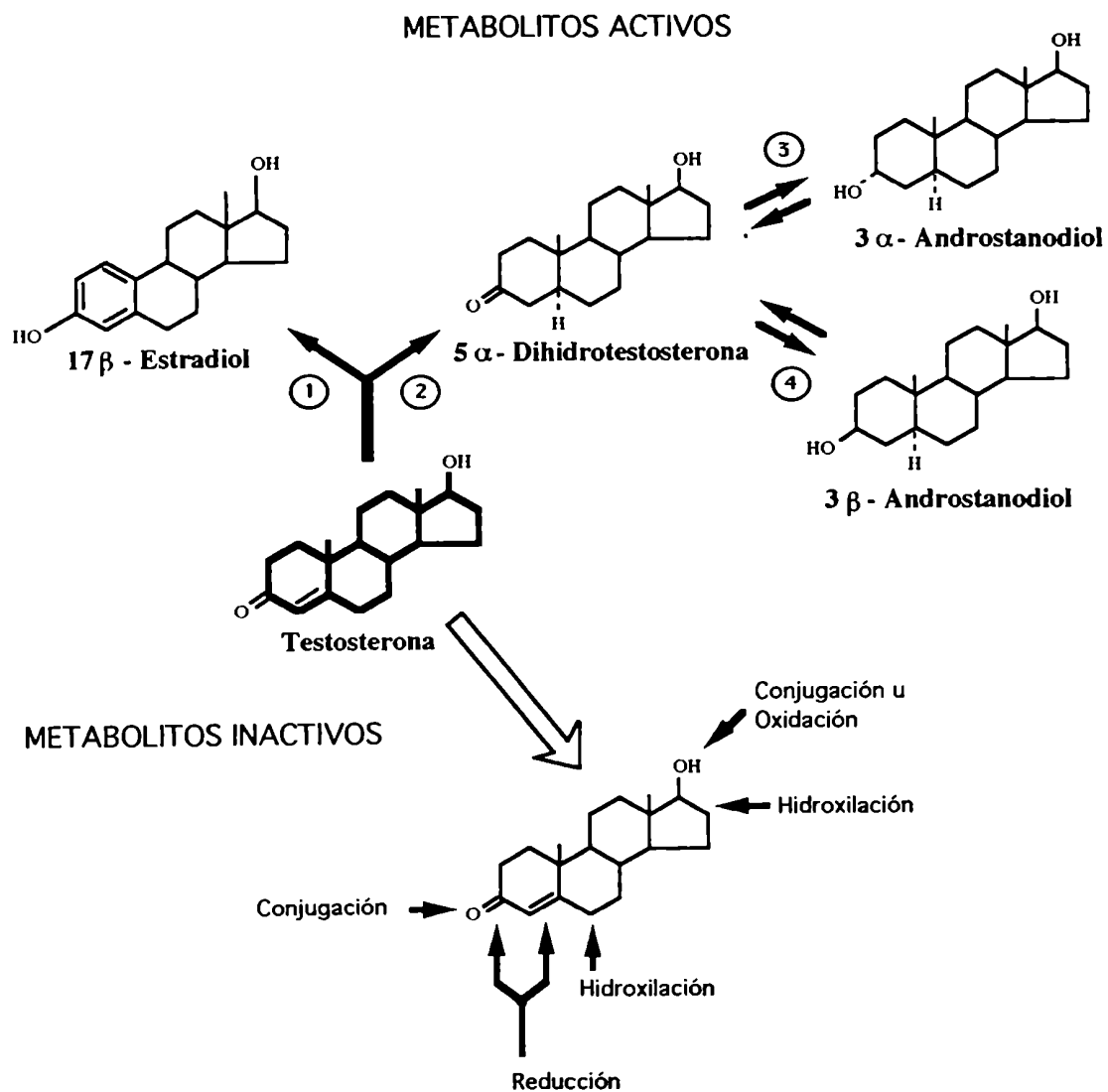


Figura 7: Metabolismo de la testosterona

1: complejo de la aromatasa; 2: 5α-reductasa; 3: 3α-hidroxiesteroide óxido reductasa; 4: 3β-hidroxiesteroide óxido reductasa.

virilización. Por otro lado, los andrógenos circulantes pueden ser aromatizados en tejidos periféricos a estrógenos. Ambos tipos de esteroides tienen actividades biológicas completamente diferentes ya que cada uno de ellos interactúan, a nivel celular, con receptores específicos (Wilson, 1975). Por lo tanto, las acciones de la testosterona en un órgano blanco pueden ser moduladas a través de la regulación de la actividad de ciertas enzimas del proceso metabólico de este andrógeno.

Desde un punto de vista fisiológico este proceso es complicado por el hecho que en algunos casos estos metabolitos ejercen acciones locales sólo en los tejidos en los cuales se originan; mientras que en otros, los compuestos 5α -reducidos y los estrógenos pueden reentrar en la circulación y actuar como hormonas circulantes. Por esta razón el estudio del metabolismo de andrógenos es esencial en la comprensión de la fisiología androgénica y la dilucidación del mecanismo de acción de los andrógenos a nivel celular y molecular.

La degradación de los andrógenos en varios tejidos está determinado por el perfil de las enzimas involucradas en el proceso de inactivación. Las enzimas que degradan los andrógenos activos son las 5α y 5β -reductasas, 17β -hidroxisteroide dehidrogenasa y 3α y 3β -hidroxiesteroide dehidrogenasas. Además, los andrógenos pueden ser hidroxilados en la posición 6, 7, 15 o 16 (Trager, 1977). La mayoría de estos metabolitos son intrínsecamente inactivos. Sin embargo, algunos esteroides, tales como el 5α -androstanodiol, puede

ser reconvertido en dihidrotestosterona y por lo tanto, estos metabolitos pueden ser considerados como potenciales andrógenos activos.

Los compuestos 5β -androgénicos constituyen un grupo especial de compuestos que estimulan la producción de hemo en médula e hígado (Besa y Bullock, 1981).

Androsterona (3α -hidroxi- 5α -androstano-17-ona) y eticolanolona (3α -hidroxi- 5β -androstano-17-ona) son los metabolitos urinarios de andrógenos más abundantes. Algunos esteroides se excretan libres, mientras que otros lo hacen conjugados con grupos sulfatos o glucurónidos en la posición 3 ó 17. La mayoría de las reacciones catabólicas tienen lugar en el hígado, pero la próstata y la piel también contribuyen significativamente al metabolismo degradativo de los andrógenos. Así, androstanodiol-17-glucurónido es el producto principal del metabolismo de DHT en ambos tejidos sin la participación del hígado (Morimoto y col., 1981; Deslypere y col., 1982; Rittmaster y col., 1988), representando un marcador del metabolismo y acción de DHT en próstata y piel.

Las enzimas metabolizantes de esteroides como un todo, constituyen una trama para la rápida conversión de los andrógenos. Es claro, que para el mantenimiento de un nivel constante de testosterona, este proceso debe estar balanceado por un aporte continuo del testículo.

5 α -Reductasa

Las enzimas que reducen el doble enlace entre los C4-C5 de una variedad de Δ^4 -3ceto-esteroides para formar isómeros 5 α y 5 β -reducidos, fueron caracterizadas originariamente por Tomkins (1957). Las enzimas 5 β -reductasas están presentes en la fracción citosólica celular, mientras que todas las 5 α -reductasas forman parte del componente insoluble de la célula, principalmente del retículo endoplásmico (Forchielli y Dorfman, 1956).

La 5 α -reductasa, que presenta un requerimiento absoluto por NADPH como cofactor (Forchielli y Dorfman, 1956; McGuire y col., 1960; Voigt y col., 1970), forma DHT a partir de testosterona. Los estudios del mecanismo de acción han revelado, utilizando la técnica de marcación isotópica, que el NADPH provee el ion hidruro para el C5, mientras que un protón del medio acuoso se une al C4 (McGuire y Tomkins, 1960). Esta reacción es estrictamente irreversible, ya que la barrera de energía para la abstracción de un ion hidruro del C5 de un compuesto 5 α -reducido es extremadamente alta.

La enzima 5 α -reductasa presenta una apreciable diferencia en su actividad, en función de la etapa de desarrollo del animal macho, lo que ha llamado la atención de muchos investigadores. En el período neonatal, el producto principal del metabolismo de la progesterona, en el testículo, es testosterona. Durante la maduración prepuberal (20-40 días de edad), las células de Leydig conti-

núan sintetizando testosterona y sin embargo, este andrógeno no se acumula debido a la elevada actividad 5α -reductasa (Coffey y col., 1971; Fisher y Steinberger, 1971; Inano y Tamaoki, 1966; Steinberger y Fisher, 1969). Consecuentemente, los metabolitos 5α -reducidos (DHT, $3\alpha/\beta$ -Diol) representan los andrógenos secretados en mayor proporción por el testículo inmaduro (Moger, 1977; Corpechot y col., 1981). Después de los 40 días de edad, la actividad 5α -reductasa declina y nuevamente la testosterona es el principal andrógeno circulante (Muroño, 1989).

Estudios sobre la ontogenia de la actividad 5α -reductasa testicular en la rata, han revelado que esta enzima es detectable el día 15, llega a un máximo entre los 30 y 40 días, y luego declina a los 40-60 días de edad hacia los niveles bajos encontrados en el adulto (Goldman y Kringle, 1974; Lacy, 1974; Richards y Neville, 1973).

El descubrimiento inicial de la actividad 5α -reductasa en el hígado de rata, indujo a pensar que esta enzima sólo participaba en el catabolismo de los esteroides, anulando la acción biológica de ciertas hormonas (Schneider, 1952). Estudios subsecuentes en órganos blanco de la acción androgénica, tal como la próstata ventral de rata, revelaron que la 5α -reductasa es capaz de ejercer un efecto anabólico, y que la DHT es un andrógeno más potente que la testosterona misma (Bruchovsky y Wilson, 1968).

Esta aparente diversidad en la función ha estimulado la bús-

queda de la presencia de isoenzimas. Normington y Russell (1992), han demostrado en ratas macho, la existencia de dos isoenzimas: tipo 1, predominante en tejidos periféricos, y tipo 2, presente en la mayoría de los tejidos reproductivos.

Esta distribución tisular de la isoenzimas sugiere que la isoenzima tipo 1 ejercería un rol catabólico en el metabolismo de las hormonas esteroideas, mientras que la isoenzima tipo 2 tendría mayor importancia en el proceso anabólico (Normington y Russell, 1992).

Los mecanismos que regulan la actividad 5α -reductasa durante las distintas etapas del desarrollo en la rata no han sido completamente aclarados. Las variaciones en la 5α -reductasa testicular a lo largo de la vida del animal parecen correlacionarse con cambios maduracionales controlados por gonadotrofinas. Se ha propuesto que la LH sería el principal factor regulatorio de esta enzima, ya que se ha demostrado en ratas hipofisectomizadas que el tratamiento con LH aumenta la actividad 5α -reductasa testicular (Moger y Armstrong, 1974; Nayfeh y col., 1975; Murono y Payne, 1979). En ratas inmaduras, FSH sería otro factor modulador de esta actividad enzimática (Nayfeh y col., 1975). Algunos estudios sugieren que la PRL, en paralelo con LH, podría también participar en la regulación de la actividad 5α -reductasa (Takeyama y col., 1986; Ueda y col., 1987). Chase y Payne (1985), tratando ratas inmaduras con bromocriptina, agonista dopaminérgico que suprime la secreción de PRL, observaron una disminución en la actividad de la enzima.

3 α / β -Hidroxiesteroide óxido reductasa

La DHT puede ser metabolizada a 3 α / β -Diol por acción de las enzimas 3 α / β -hidroxiesteroide óxido reductasa. Estas enzimas, que requieren NADPH como cofactor, utilizan como sustratos esteroides que ya han sufrido la 5 α -reducción (Wilson y Gloyna, 1970; Shimazaki y col., 1972).

La enzima 3 α -hidroxiesteroide óxido reductasa, se localiza en la fracción soluble de numerosos tejidos (Wiebe, 1978). Dentro del testículo, está presente tanto en las células de Leydig (Rivarola y Podestá, 1972; Folman col., 1973) como en los túbulos seminíferos, particularmente en las células de Sertoli (Dorrington y Fritz, 1975).

Durante el desarrollo puberal de la rata macho, entre los 20 y 40 días de edad, se encuentran niveles elevados de 3 α -Diol circulante que resultan ser 6 a 8 veces superiores a la suma de las concentraciones de testosterona y DHT (Moger, 1977). En el período de desarrollo puberal, las concentraciones de 3 α -Diol disminuyen y se mantienen bajas en los animales sexualmente maduros (Podestá y Rivarola, 1974).

Peng y col. (1979) han observado que la actividad específica de la enzima 3 α -hidroxiesteroide óxido-reductasa es alta en ratas de 10 a 22 días de edad, disminuyendo entre los 22 y 37 días y permaneciendo baja durante la adultez. Sin embargo, cuando se expresa

la actividad citosólica testicular total, se observa un aumento entre los 10 y 60 días de vida y se mantiene elevada en la edad adulta. Este perfil metabólico coincide con las recientes observaciones realizadas por Muroño (1989) en dos poblaciones de células de Leydig (banda 2 y banda 3) aisladas en gradiente de metrizamida. Debido a que el cambio en la actividad enzimática coincide con el nivel máximo de FSH en la rata inmadura (Negro-Vilar y col., 1973; Payne y col., 1977), se ha sugerido que este incremento podría deberse a la estimulación por esta gonadotropina. En este sentido, se ha descrito en cultivo de células de Sertoli la estimulación de la 3α -HOR por FSH (Welsh y Wiebe, 1978).

La presencia de tan elevadas concentraciones de 3α -Diol en la circulación periférica en la etapa de maduración sexual indujo a pensar que este esteroide podría ser de gran significancia fisiológica. Se ha sugerido (Podestá y Rivarola, 1974) que se requieren niveles elevados de 3α -Diol para la estimulación de la primera división meiótica en el proceso espermatogénico. Por otro lado, se ha demostrado que el 3α -Diol ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo o hipófisis de rata, pues la administración de este esteroide inhibe los niveles de gonadotropinas séricas (Elridge y Mahesh, 1974).

Prolactina

La PRL, hormona de origen adenohipofisario, fue descubierta por Stricker y Greuter en 1928. Desde entonces, se ha encontrado que esta hormona presenta una amplia variedad de efectos fisiológicos en distintas especies y tipos celulares presentes en la escala evolutiva. Las diversas funciones de la PRL sobre los diferentes tipos celulares fueron resumidos por Nicoll (1980) quien las ha clasificado en 6 grupos:

- . acciones relacionadas con el agua y el balance electrolítico;
- . acciones relacionadas con la reproducción
- . efectos sobre el crecimiento y desarrollo
- . efectos metabólicos
- . acciones sobre estructuras ectodérmicas e intrategumentarias
- . acciones que involucran sinergismo o antagonismo con hormonas esteroideas.

Cada una de estas acciones predomina en determinada especie. Así en los anfibios, la PRL inhibe los cambios metamórficos y es responsable en ciertos aspectos de la conducta de apareamiento. En aves, induce el crecimiento corporal, la lipogénesis y la secreción de productos nutrientes específicos. En cambio, en mamíferos, el rol predominante de la hormona está relacionado en ambos sexos con la función reproductiva.

Esta asombrosa versatilidad en las acciones de la PRL en

distintos órganos efectores, nos plantea un interrogante: es posible que una única especie molecular sea capaz de provocar respuestas tan diferentes?.

La PRL, aislada por Lewis y col. (1971), fue descrita como una molécula de estructura peptídica, forma elipsoidal casi esférica, constituida por una sola cadena de 199 aminoácidos, con dos puentes disulfuros intramoleculares más un tercero en el extremo amino terminal de la molécula. Su peso molecular es 23000 daltons, es elaborada por las células lactotróficas de la hipófisis anterior y sus homologías estructurales con la hormona de crecimiento y la somatomotrofina coriónica indican que probablemente evolucionaron a partir de una hormona ancestral común, mediante duplicación de genes (Moore y col., 1982).

Sin embargo, en los últimos años, se ha señalado que esta hormona puede presentar polimorfismo estructural. Así, se han descrito una serie de componentes moleculares o isoformas de la misma denominadas "Big-Big" o PRL gigante, "Big" o PRL grande y "Little" o PRL pequeña, de acuerdo con sus pesos moleculares aparentes (Sinha, 1992) (Figura 8). Esta heterogeneidad parece estar relacionada con eventos genéticos y postrasduccionales a nivel de las células hipofisarias, o bien a procesos metabólicos que ocurren en la periferia tales como clivaje de una molécula grande en otras más pequeñas, agregación de pequeñas moléculas a otra más grande (Rogol y Rosen, 1974; Fang y Rofetoff, 1978; Larrea y col., 1987) ó modifi-

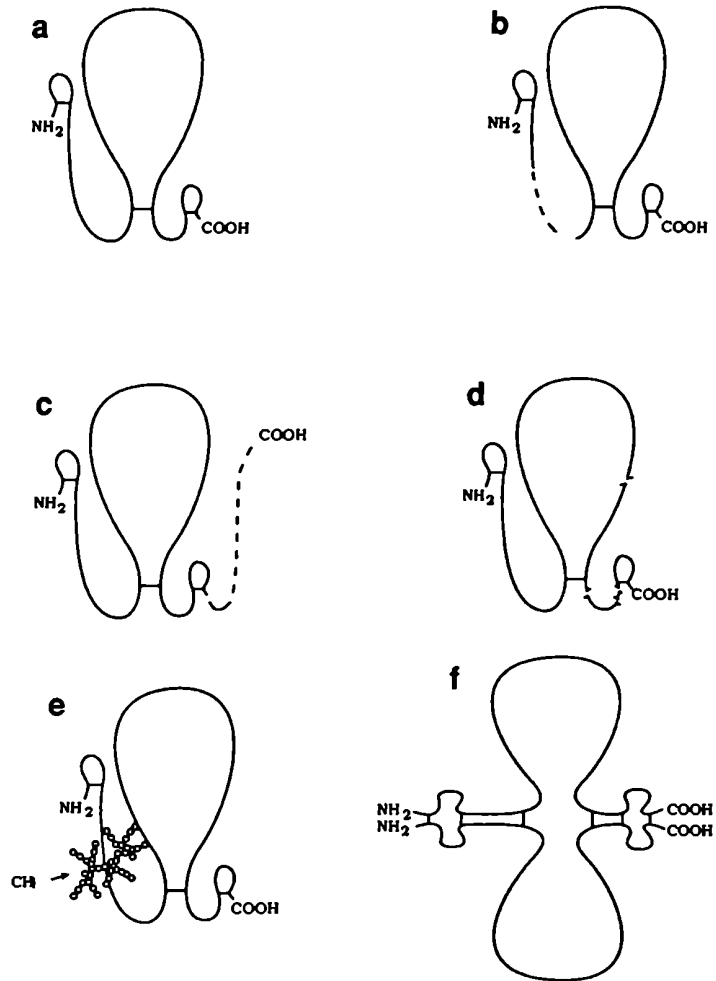


Figura 8: Isoformas de la molécula de prolactina

Diagrama esquemático que muestra algunas modificaciones que se observan en la molécula de PRL. a: isoforma principal; b: isoforma obtenida por procesamiento alternativo del ARNm, involucrando delección (---); c: isoforma obtenida por procesamiento alternativo del ARNm, involucrando sustitución (---); d: isoforma clivada; e: PRL glicosilada, (CH) resto carbohidrato; f: dímero de PRL, (-): indica uniones puente disulfuro.

caciones covalentes (glicosilación, fosforilación, deaminación) que originan una modificación en la carga neta de la molécula. La naturaleza y proporción exacta de estas formas moleculares y la importancia relativa de cada una de ellas en la respuesta fisiológica final no han sido aún totalmente aclaradas (Whittaker y col., 1981). La discrepancia entre las determinaciones de PRL por métodos de bioensayo y radioinmunológicos aumenta el grado de complejidad, ya que es probable que la hormona bioactiva e inmunoreactiva represente a distintas formas moleculares.

Mecanismo de acción de la prolactina

La interacción de la PRL con su receptor de membrana es el evento inicial que desencadena una cascada de reacciones que culminan con el efecto fisiológico final.

Un gran número de tejidos presentan receptores para PRL. La glándula mamaria es el órgano blanco característico de la acción prolactínica. Otros tejidos reproductivos tales como testículos, vesículas seminales y próstata, poseen receptores específicos. Se encuentran, además, receptores para PRL en hígado, adrenal, riñón, ciertas zonas específicas del cerebro y células del sistema inmune (Costlow, 1987). El clonado de los ADN copia de los receptores de PRL ha permitido identificar dos formas de receptor (de 300 y 600

aminoácidos respectivamente) presentes en distintas especies de animales o bien en distintos tejidos del mismo animal (Kelly y col., 1992).

Hasta el presente, la secuencia de procesos moleculares por la cual la PRL ejerce su acción, no ha sido aún totalmente aclarada. Considerando la diversidad de efectos de la PRL en varios órganos blanco y del polimorfismo estructural de la hormona, es probable que origine distintos cambios celulares mediante diferentes mecanismos de acción.

Como consecuencia de la interacción de PRL con su receptor de membrana, se liberan los mediadores intracelulares. Se han propuesto una serie de segundos mensajeros en el mecanismo de acción de la PRL entre los cuales se pueden incluir: AMPc, GMPc, ion calcio, poliaminas, prostaglandinas y péptidos de bajo peso molecular (Rillema, 1980).

Acción de prolactina sobre testículo

La variación de los niveles séricos de la PRL a lo largo de la vida del animal macho (Negro-Vilar y col., 1973), sugiere que esta hormona podría modular el mantenimiento de una función gonadal normal. Estudios realizados en ratones genéticamente deficientes en PRL (cepas Ames (df/df) y Snell (dw/dw)), los cuales presentan

hipogonadismo e infertilidad, han demostrado que esta hormona incrementa el peso testicular (Bartke y Lloyd, 1970), normaliza la producción de testosterona (Bartke y col, 1978), estimula la espermatogénesis (Bartke y Lloyd, 1970) y restablece la fertilidad (Bartke, 1966; Bartke, 1967).

En el hamster, la exposición a cortos fotoperíodos de luz origina una drástica reducción en los niveles de PRL tanto en la hipófisis como en el suero. En forma concomitante hay una atrofia testicular, disminución del número de copulaciones e infertilidad. Por otra parte, la administración de PRL restablece el peso gonadal, aumenta la producción de testosterona y espermatogénesis e induce la fertilidad (Bex y col., 1978).

La influencia de la PRL sobre la función gonadal se vio reforzada cuando se descubrieron sitios específicos de unión para esta hormona en las células de Leydig (Aragona y col, 1977; Charreau y col., 1977). La PRL es capaz de modular el número de sus propios sitios receptores. Así, se ha podido establecer (Morris y Saxena, 1980) que el número de sitios receptores aumenta con la edad del animal y dosis crecientes de PRL disminuyen el número de sitios receptores, tanto en ratas en desarrollo como adultas.

También, se ha demostrado que la PRL tiene capacidad de modular el número de sitios receptores de hormonas heterólogas como la LH. En ratas inmaduras, la PRL aumenta los sitios de unión a LH de manera dosis-dependiente; mientras que en ratas adultas, induce una

disminución de estos sitios receptores (Morris y Saxena, 1980).

Además de este efecto en modular el número de sus propios sitios receptores y los de LH, la PRL presenta otras acciones en testículo. Hafiez y col. (1972a) demostraron que la PRL es capaz de aumentar la cantidad de colesterol esterificado testicular, sustrato para la biosíntesis de andrógenos, y la actividad de ciertas enzimas esteroidogénicas como la 3β y 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Hafiez y col., 1971). En ratas hipofisectomizadas y tratadas con LH y PRL se observó que hay una inducción en la síntesis de andrógenos "in vivo", poniendo en evidencia que la PRL, a determinadas dosis, potencia el efecto de LH sobre la esteroidogénesis gonadal (Hafiez y col., 1972b). Belanger y col. (1981) demostraron que la administración de PRL a ratas intactas aumenta los niveles testiculares de 17-hidroxiprogesterona y andrógenos. Por otra parte, se ha observado que el tratamiento de ratas inmaduras con bromocriptina, agonista dopaminérgico que desciende los niveles séricos de PRL sin modificar los de LH, disminuye la producción de andrógenos testiculares "in vitro" así como la respuesta a la hCG a dosis submáximas de estímulo. Sin embargo, en condiciones de máxima estimulación con hCG, la producción de andrógenos no difiere del control (Suescun y col., 1985). Recientemente Mazzocchi y col. (1990) realizaron un minucioso estudio morfológico y morfométrico del testículo sometido a una infusión continua con PRL y observaron un nítido desarrollo del retículo endoplásmico y un

aumento en el número de peroxisomas, organela donde se localiza la enzima hidroximetilglutaril Co-A reductasa, la cual es regulatoria de la biosíntesis de colesterol. Estos resultados sugieren, en conjunto, que la PRL modula el aporte de sustrato necesario para la biosíntesis de andrógenos, mientras que la etapa posterior, correspondiente a la síntesis de testosterona, estaría regulada fundamentalmente por LH.

Es oportuno mencionar también, que se ha observado, utilizando un modelo experimental de testículo de rata perfundido con distintas dosis de PRL (Fung y col., 1989), que esta hormona interaccionaría con LH de manera bifásica dosis-dependiente, ya que a dosis pequeñas de PRL se inhibe la producción de testosterona estimulada por LH, mientras que a dosis elevadas se potencia la acción de la gonadotropina.

Efecto de la PRL sobre las vesículas seminales

Han sido demostrados sitios de unión específicos para PRL en vesículas seminales de ratas en desarrollo adultas y seniles (Negro-Vilar y col., 1977).

Por otra parte, en las hiperprolactinemias inducidas se origina un aumento en el contenido de ADN y en el peso de la glándula, con una proliferación mayor del epitelio vesicular que el del estroma

(Ayata y col., 1989).

Si bien estas glándulas dependen fundamentalmente de los andrógenos para su desarrollo y funcionalidad, Keenan y col. (1981) han determinado que la PRL acentúa las acciones proliferativas de los andrógenos. De esta manera, los andrógenos estarían involucrados en una primera etapa en la organización de la estructura glandular que comprende tanto a los componentes epiteliales como fibromusculares. En una segunda etapa, los andrógenos inducen proliferación y diferenciación de las células epiteliales funcionales.

Efecto de la prolactina en la etapa puberal

Como se describiera en párrafos anteriores, el principal andrógeno producido por la gonada es la testosterona, la cual cumple un papel central en distintos aspectos de la maduración sexual, que incluye: comportamiento, espermatogénesis así como diferenciación y mantenimiento de las glándulas sexuales accesorias. La testosterona ejerce, además, un estricto control sobre la secreción de gonadotrofinas, por un mecanismo de retroalimentación negativa. Sin embargo, durante el período infanto-juvenil, la testosterona no es el principal andrógeno circulante. Como se describiera anteriormente, debido a la diferencia en las actividades de distintas enzimas, fundamentalmente la 5α -reductasa, se originan marcados cambios

prepuberales en la producción de andrógenos testiculares (Rivarola y col., 1972; Wiebe, 1976; Preslock, 1980). Aunque los niveles de testosterona se elevan hacia el final del período juvenil, el aumento de velocidad más pronunciado ocurre alrededor de la pubertad.

Se ha demostrado que el perfil de secreción de la testosterona se correlaciona con pulsos en la secreción de LH (Ellis y Desjardin, 1982).

En términos generales, se puede considerar que la esteroidogénesis testicular es influenciada, al menos, por dos factores importantes: por un lado, el perfil secretorio de las hormonas hipotalámicas-hipofisarias y por el otro, la respuesta del testículo a estas hormonas.

En la pubertad, es claro que cambios en la secreción de hormonas hipofisarias precede a la maduración del testículo.

Durante el desarrollo sexual, cada una de las hormonas hipofisarias exhiben un determinado perfil sérico. La FSH aumenta desde los 14 días de edad y muestra un valor máximo alrededor de los 25 días, para luego descender y mantenerse en valores aproximadamente constantes. De manera opuesta, LH no presenta variaciones apreciables a lo largo del tiempo de vida del animal.

La PRL muestra, en la rata macho, un perfil sérico distinto a las anteriores gonadotrofinas, detectándose durante los primeros 20 días de vida bajos niveles de PRL, para luego aumentar gradualmente

hacia la pubertad (Dohler y Wuttke, 1974; Becú y Libertun, 1982). Concomitantemente, es posible observar un marcado aumento en la población de células involucradas en la secreción de PRL, así como un aumento en la síntesis y cantidad de hormona secretada por cada lactotrofo. Al mismo tiempo, en la rata en desarrollo, tiene lugar una maduración progresiva de los mecanismos regulatorios de la secreción de PRL a través de los factores inhibitorios y estimuladores de la misma (Becú y col., 1992).

Por intermedio de sus sitios de unión en células de Sertoli, FSH estimula la espermatogénesis, mientras que LH estimula la secreción de testosterona por acción sobre las células de Leydig. El aumento prepuberal en los niveles de FSH promueve la formación de receptores para gonadotrofinas dentro del testículo (Odell y Sewerloff, 1976; Ketelslegers y col., 1978; Huhtaniemi y col., 1982). Como resultado, el crecimiento testicular procede en paralelo con el aumento de FSH (Ojeda y Ramirez, 1972). El efecto de LH sobre la liberación de esteroides del testículo inmaduro puede ser bloqueado por hipofisectomía, pero el tratamiento de animales hipofisectomizados con FSH restablece la efectividad de LH (Odell y col., 1973). Esto es debido, probablemente, a la capacidad de FSH en aumentar los receptores testiculares para LH (Odell y col., 1973). En vista de estos hallazgos, parecería que un aumento en la producción de testosterona relacionado con la pubertad puede, teóricamente, ocurrir independientemente de los cambios en los niveles

tónicos de LH sérica (suponiendo que el aumento de FSH sérica del período juvenil ha sensibilizado a la gonada a las acciones de LH). Queda aún por establecer si pequeños cambios en la secreción pulsátil de LH juegan un rol en modular la esteroidogénesis prepuberal en el macho.

Es reconocido que FSH no es la única hormona que induce la respuesta testicular a LH. Esta habilidad está compartida en cierto grado con GH y PRL. Se ha descrito que PRL puede inducir la respuesta testicular a LH (Zipf y col., 1978; Bartke, 1980). Por otro lado, dosis desensibilizantes de LH provocan tanto la internalización de receptores de LH como los de PRL (Davies y col., 1980), sugiriendo una asociación física entre ambas entidades en la membrana plasmática.

Negro-Vilar y col. (1973) han observado que la iniciación de la fase rápida de crecimiento testicular que ocurre alrededor del día 25 de edad, podría correlacionarse con el incremento en los niveles de FSH y PRL séricas y que el posterior crecimiento de las glándulas sexuales accesorias estaría asociada con un segundo pico de PRL. Estas observaciones han llevado a plantear la hipótesis que la PRL puede estar involucrada en el desarrollo testicular y de las glándulas sexuales accesorias.

Posteriormente, se estableció que la hiperprolactinemia induce, en la rata, una pubertad precoz, mientras que la inactivación de la PRL sérica por inmunización pasiva conduce a un retraso en la

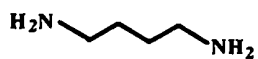
maduración sexual (Hostetter y Piacsek, 1977; De-Jong y van der Schoot, 1979; Chandrashekar y Bartke, 1988).

Poliaminas: estructura y función

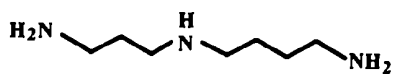
Las poliaminas son compuestos alifáticos, nitrogenados, no proteicos, que se encuentran en todas las células vivientes y fluidos biológicos (Scalabrino y Ferioli, 1982; Tabor y Tabor, 1984, 1985; Pegg, 1986, 1988). Las principales poliaminas son: putrescina, espermidina y espermina (Figura 9).

En las células de mamíferos, espermidina y espermina se encuentran usualmente en concentraciones milimolares, mientras que los niveles de putrescina están en el orden nanomolar. La distribución dentro del organismo varía ampliamente de una especie a otra y dentro de una misma especie pueden diferir marcadamente en los distintos tejidos u órganos. Los niveles de poliaminas pueden variar en una amplia gama de situaciones tales como edad o crecimiento de un tejido u órgano (Heby, 1981; Scalabrino y Ferioli, 1981; Pegg y McCaan, 1982). También se han observado altas concentraciones de poliaminas en tejidos que no están en crecimiento, pero activos en la síntesis de proteínas, como es el caso del páncreas, próstata y glándula mamaria (Oka y col., 1981; Dorn y col., 1985). Recientemente, se han demostrado considerables niveles de

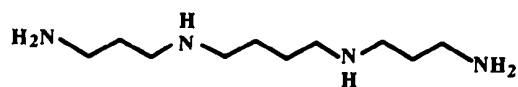
POLIAMINAS



Putresina

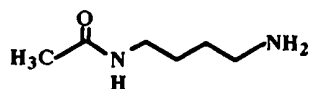


Espermidina



Espermina

METABOLITOS INTERMEDIARIOS



Acetilputresina

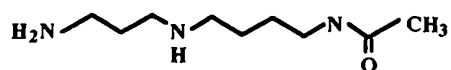
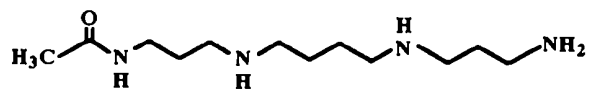
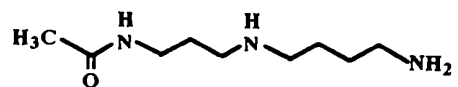
N⁸ - AcetilespermidinaN¹ - AcetilesperminaN¹ - Acetilespermidina

Figura 9: Estructura de las principales poliaminas.

poliaminas en células productoras de factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento plaquetario (PDGF) u hormonas peptídicas (GH)) (Hougaard y Larsson, 1989).

Debido a que los grupos amino primarios y secundarios de estos compuestos están positivamente cargados a pH fisiológico, las poliaminas pueden interactuar con constituyentes celulares negativamente cargados, tales como ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos (Marton y Morris, 1987; Schuber, 1989). Esta unión electrostática es de fundamental importancia en los efectos que las poliaminas tienen en una variedad de sistemas.

Desde hace mucho tiempo se sabe que la putrescina es un factor de crecimiento tanto en células eucariontes como procariontes, se acumula en los tejidos en respuesta a diversos estímulos del crecimiento, se conjuga a proteínas nucleares y es excretada por células en mitosis. La espermidina aumenta la velocidad de elongación de la cadena de ADN, ARN y proteínas y es un factor de traducción específico para la fidelidad de la síntesis proteica al aumentar la eficiencia de acilación del ARN (Heby, 1981; Blair, 1985; Scalabrino y col., 1991). En general, las poliaminas estabilizan y mantienen la asociación de las subunidades ribosomales y promueven la unión de los ribosomas al retículo endoplásmico (Raina y Jänne, 1975).

Se ha determinado, también, que las poliaminas pueden específicamente regular la estructura y función mitocondrial (Nichitta y

Williamson, 1984; Thomas y col., 1986; Marcote y col., 1989), estabilizar las membranas impidiendo su lisis, promover la fusión de membranas e inhibir algunos procesos de transporte y enzimas asociadas a membranas (Goyns, 1982; Marton y Morris, 1987; Schuber, 1989).

En lo que respecta a la diferenciación celular, se ha demostrado que las poliaminas son sustratos fisiológicos de transglutaminasas intra y extracelulares (Folk y col., 1980; Williams-Ashman y Canellakis, 1980; Lorand y Conrad, 1984). Las transeglutaminasas son enzimas responsables del entrecruzamiento de proteínas estructurales, que participan en la formación de coágulos y de la membrana plasmática durante la diferenciación terminal de los queratinocitos (Folk y col., 1980; Williams-Ashman y Canellakis, 1980; Lorand y Conrad, 1984).

Es interesante comentar, asimismo, que las poliaminas participan en la regulación del contenido celular de los nucleótidos cíclicos y pueden modular reacciones de fosforilación de proteínas a través de la activación de alguna proteína quinasa sensible y/o la modificación de la conformación del sustrato (Cochet y Chambaz, 1983; Cohen, 1985).

Biosíntesis de poliaminas

La biosíntesis de poliaminas en células eucariontes involucra

una serie de precursores tales como arginina, ornitina, metionina y S-adenosilmetionina. Ornitina se forma principalmente en el ciclo de la urea a partir de arginina por acción de la enzima arginasa. A su vez, la ornitina es, luego, convertida a putrescina en una reacción catalizada por la ornitina decarboxilasa (ODC) (Tabor y Tabor, 1976; Williams-Ashman y Canellakis, 1979; Pegg y McCann, 1982) (Figura 10).

S-adenosilmetionina cede grupos metilo en reacciones de transmetilación. En la biosíntesis de poliaminas, este compuesto es decarboxilado por la enzima S-adenosilmetionina decarboxilasa (SamDC), sirviendo así como donador de grupos propilamino en la formación de espermidina a partir de putrescina, catalizado por espermidina sintetasa y en la formación de espermina a partir de espermidina catalizado por espermina sintetasa (Figura 10) (Pegg y McCann, 1982).

Putrescina, espermidina y espermina pueden ser convertidas en varios metabolitos por reacciones enzimáticas de acetilación, oxidación y conjugación. Las reacciones de interconversión involucran dos enzimas: espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (AT), citosólica, y poliamina oxidasa, una enzima dependiente de flavina (Morgan, 1985; 1989). La primera enzima utiliza acetyl CoA para convertir espermidina o espermina en N¹-acetilespermidina o N¹-acetilespermina. Ambos compuestos pueden ser sustratos de la enzima poliamina oxidasa (Seiler, 1987; Seiler y Heby, 1988), dando esper

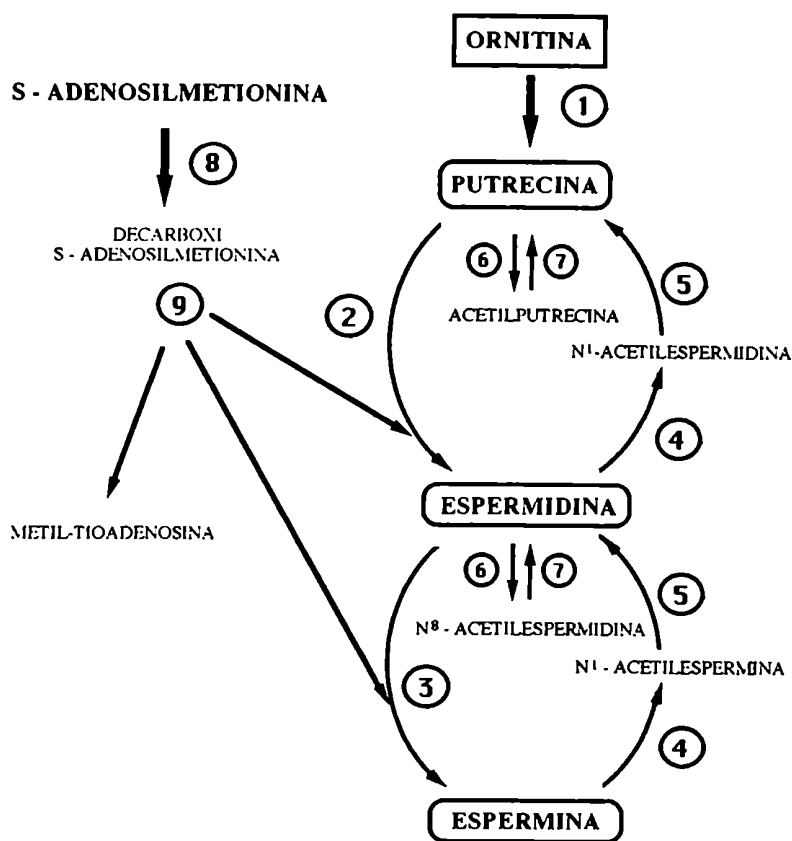


Figura 10: Biosíntesis de poliaminas.

1: ornitina decarboxilasa; 2: espermidina sintetasa; 3: espermina sintetasa; 4: poliamina acetilasa; 5: poliamina oxidasa; 6: espermidina/espermina N⁸-acetiltransferasa; 7: N⁸-acetyl espermidina /espermina desacetilasa; 8: S-adenosilmetionina decarboxilasa; 9: aminopropil transferasa.

midina o putrescina. En condiciones normales, la actividad de la poliamina oxidasa es mayor que la de AT, es por este motivo que el contenido de poliaminas acetiladas es generalmente bajo en células eucariontes. La acetilación de espermidina puede ocurrir también, en posición N⁸; sin embargo, la espermina, al ser una molécula simétrica, no puede dar este tipo de derivado acetilado. La deacilación de N⁸-acetilespermidina regenera espermidina. El sistema acetilasa/oxidasa estaría, entonces, actuando como un sistema regulatorio para reducir el contenido intracelular de espermidina y espermina cuando los niveles de estos compuestos comienzan a ser significativamente altos.

La importancia biológica de estos metabolitos y su rol en la regulación de la biosíntesis de poliaminas aún no están definidos.

Regulación de la biosíntesis de poliaminas

La biosíntesis de poliaminas está principalmente regulada a través de la modulación de las actividades de las dos decarboxilasas. En las células eucariotes, la actividad SamDC es dependiente de la presencia de putrescina (Pegg, 1974), por ello, la regulación de la actividad ODC adquiere mayor importancia. Su actividad está regulada por una variedad de hormonas con mecanismos de acción muy diferentes que actúan a nivel de sus órganos blanco afectando el rá-

pido incremento de ciertos caminos comunes tales como la inducción acoplada de ODC y el aumento en la actividad de ARN polimerasa I. Esto lleva a un aumento en los niveles de putrescina y espermidina y a una mayor biosíntesis y acumulación de ARN ribosomal. En cultivos celulares, la inducción de ODC y la acumulación de putrescina, se inician en la fase G1 del ciclo celular y aparentemente se requieren estos procesos para la progresión de las células en la fase S (síntesis de ADN) y posterior división celular (Sunkara y col., 1981). Por lo tanto, ODC es considerada un modelo de enzima inducible en respuesta a la administración de drogas y hormonas. Su actividad refleja la velocidad de síntesis macromolecular y su regulación positiva o negativa es rápidamente reflejada en una alteración de su velocidad de recambio ($t_{1/2} = 10 - 20$ minutos) (Jänne y col., 1978). La regulación de la actividad ODC ocurre a nivel transcripcional, transduccional y post-transduccional pudiendo ser inhibida tanto por aminas primarias como por análogos de sustrato y otras drogas farmacológicas (Bey y col., 1987).

La complejidad de la regulación de ODC parece estar relacionada con la importancia fisiológica de las poliaminas.

Es interesante comentar, que se han determinado ritmos circadianos en la actividad de las decarboxilasas en diferentes órganos como riñón (Nicholson y col., 1976) y adrenales (Ramirez-Gonzalez y col., 1981). Entre las glándulas endócrinas, se ha descrito un ritmo circadiano para la ODC testicular (de las Heras y Calandra,

1986).

Desde el punto de vista ontogénico, es posible observar en diferentes órganos de mamíferos, una alta actividad ODC durante el desarrollo embrionario y fetal, mientras que SamDC sólo presenta una actividad elevada en la etapa adulta (Scalabrino y col., 1991). Cambios similares se han podido observar en glándulas endócrinas, tales como la adrenal (Ekker y Sourkes, 1987) y el testículo (Shubhada y col., 1989).

Fisiología de las poliaminas en los órganos sexuales accesorios

La concentración de poliaminas aumenta concomitantemente con la de proteínas y ácidos nucleicos durante el crecimiento normal o anormal de diversos tejidos (Russell, 1973). Independientemente del inductor de crecimiento utilizado, el aumento en los niveles de poliaminas está precedido siempre por un aumento transiente en la actividad ODC (Russell, 1985). A pesar que la estimulación de ODC y la velocidad de síntesis de poliaminas parecen siempre acompañar al crecimiento y proliferación celulares, es aún incierto si estos aumentos son circunstanciales o esenciales para la hipertrofia y/o hiperplasia tisular.

La regulación por andrógenos circulantes de la síntesis de poliaminas en las glándulas sexuales accesorias masculinas, es el

ejemplo mejor documentado de la íntima relación entre el crecimiento o involución de un tejido hormono-dependiente y el metabolismo de poliaminas (Pegg y col., 1970; Williams-Ashman y col., 1975). Luego de la castración, se observa una rápida involución de la próstata ventral y de las vesículas seminales. Al mismo tiempo, se detecta una disminución en la síntesis de ácidos nucleicos y una marcada reducción en la actividad de ODC y SamDC, lo cual origina una depleción de putrescina, espermidina y espermina. Este efecto es rápidamente revertido por la administración de testosterona (Piik y col., 1977; Pegg y col., 1978; Danzin y col., 1979). La descripción experimental del mantenimiento de la integridad estructural y funcional de las vesículas seminales por andrógenos, ha llevado a considerar el peso de dichas glándulas como un índice del nivel androgénico del animal (Brandes, 1974).

La involución de las glándulas sexuales accesorias luego de la castración, conduce a una pérdida de las células epiteliales y a la anulación de sus funciones secretorias. El restablecimiento del tamaño vesicular y prostático promovido por el tratamiento de los animales castrados con andrógenos involucra una etapa transiente de replicación de las células epiteliales y del estroma (Coffey y col., 1968), hipertrofia del epitelio y restablecimiento de su capacidad secretoria. Los incrementos en las poliaminas intracelulares y actividad ODC inducidos por andrógenos en las glándulas accesorias, estarían correlacionadas en mayor medida con la restau-

...ración del tamaño de las células epiteliales y funciones secretorias que con la hiperplasia de varios elementos celulares que contribuyen al total restablecimiento del órgano.

La glándula prostática posee una alta actividad secretoria de espermidina y espermina hacia el líquido seminal, por lo tanto, resulta difícil comprobar una relación entre acumulación de poliaminas y crecimiento tisular. En este sentido, las vesículas seminales representan un mejor modelo para el estudio de la relación entre poliaminas y proliferación, ya que sus secreciones están virtualmente desprovistas de poliaminas (Rhodes y Williams-Ashman, 1964; Folk y col., 1980)

Modulación de la actividad ornitina decarboxilasa por PRL

"In vivo" numerosas hormonas o factores son potentes estimuladores de la actividad ODC. Entre ellos pueden citarse LH, FSH y AMPc (Reddy y Vिलlee, 1975), prostaglandinas (Madhubala y Reddy, 1980), catecolaminas (Madhubala y Reddy, 1981), EGF (Stastny y Cohen, 1972), factor de crecimiento transformante (TGF) (Nakhla y Tam, 1985) y arginina vasopresina (Reddy y col., 1986).

En trabajos "in vitro", se ha podido demostrar el efecto de gonadotrofinas y AMPc sobre la actividad ODC en testículo total (Osterman y col., 1983), LH sobre preparaciones de células de Leydig

purificadas (Osterman y col., 1983) y FSH sobre células de Sertoli en cultivo (Francis y col., 1981; Madhubala y col., 1987; Shubhada y Tsai, 1990).

El efecto estimulatorio de PRL sobre la actividad ODC ha sido observado en varios sistemas biológicos. En explantes de glándula mamaria, la variación en la actividad ODC es sumamente rápida y en algunos casos se ha observado un efecto bifásico (McCann y col., 1975). En este tejido, se ha detectado una acción conjunta de insulina y PRL (Oka y Perry, 1976), efecto aparentemente mediado por la activación de una proteína quinasa C (Rillema, 1985). En órganos efectores tales como hígado, linfocitos, riñón y glándula adrenal, la magnitud de la respuesta de ODC al estímulo de PRL se correlaciona con el número de sus sitios receptores (Richards, 1975).

En próstata, se ha demostrado una respuesta diferencial de los distintos lóbulos a la acción de PRL (Prins, 1989). En particular, Rui y Purvis (1987) han indicado que la PRL ejerce una activación selectiva en la actividad ODC del lóbulo lateral.

En algunos tejidos sensibles a la hormona, el efecto estimulador de PRL sobre actividad ODC es bloqueado por ciclosporina, un antibiótico que interactúa con fosfolípidos de membrana y que podría utilizarse como bloqueante específico para el receptor de PRL (Russell y col., 1984).

En el análisis de la acción de una hormona sobre un determinado tejido efector, se impone disponer de un modelo apropiado en el cual

el efecto hormonal pueda ser evaluado a través de un marcador bioquímico específico. En el caso de la PRL, la actividad ODC resulta ser un parámetro útil que se expresa tanto en las gonadas como en glándulas sexuales accesorias.

OBJETIVOS

Como se mencionara anteriormente, a diferencia de otras hormonas hipofisarias, la PRL no desarrolla una función principal única sino que exhibe una variada gama de acciones biológicas. Si bien ha podido establecerse, en distintas especies, cual es el papel de esta hormona a nivel fisiológico, el conocimiento de sus acciones a nivel celular y molecular es sorprendentemente escaso.

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios a fin de determinar los parámetros tisulares que pueden ser regulados específicamente por la PRL y los mecanismos implicados en dicha acción; no obstante, hasta el presente, no han sido completamente definidos.

Debido al amplio espectro de acciones que la PRL presenta en distintos órganos efectores, se hace imperativo abordar el estudio del efecto hormonal en dichos órganos utilizando diferentes modelos experimentales. El análisis de las observaciones en cada sistema en estudio brindará distinto tipo de información. Así, en los tratamientos a largo plazo, "in vivo", es imposible obtener información respecto del mecanismo de acción de la hormona, debido a que durante el extenso tiempo de experimentación, pueden tener lugar eventos secundarios responsables del efecto estudiado. En cambio, los estudios "in vitro" permiten analizar los efectos inmediatos que son modificados en forma directa por la hormona.

Los objetivos fundamentales de las experiencias presentadas a continuación fueron los siguientes:

A.- Estudiar el efecto de PRL sobre el metabolismo reductivo de la testosterona en el testículo, determinando la actividad específica de la enzima 5α -reductasa. Con este fin, se realizaron estudios "in vivo" en distintos modelos experimentales:

1.- Rata con homotransplante de hipófisis bajo la cápsula renal: con este modelo se logra inducir, en animales prepuberales, una hiperprolactinemia moderada, durante un período prolongado de tiempo.

2.- Inyección intratesticular de PRL: este particular modelo experimental permitió el análisis del efecto directo de la PRL independientemente de las acciones de otras hormonas.

3.- Rata con Tumor 7315a: el implante de este Tumor indujo, en animales adultos, una severa hiperprolactinemia durante tiempos prolongados.

Asimismo, se realizaron estudios "in vitro", con el propósito de evaluar, a distintos tiempos, el efecto directo de la PRL sobre el metabolismo reductivo de testosterona en preparaciones testiculares. Se desarrolló un sistema de cultivo primario para células de Leydig que posibilitó el análisis del efecto de distintas dosis de la hormona sobre la esteroidogénesis.

B.- Estudiar que parámetros están específicamente involucrados en el efecto promotor de crecimiento de la PRL en testículo glándulas sexuales accesorias. Para ello se determinó:

* En testículo:

1.- el efecto de distintas dosis de PRL sobre la incorporación de uridina radioactiva a ARN en células de Leydig en cultivo.

2.- la actividad específica de la enzima ornitina decarboxilasa y el contenido de poliaminas en testículos de ratas portadoras del Tumor 7315a.

* En vesículas seminales:

Se determinó el efecto de la PRL sobre la actividad ornitina decarboxilasa y el contenido de poliaminas en dos modelos experimentales:

1.- Ratas adultas de la cepa Buffalo portadoras del Tumor 7315a.

2.- Ratones adultos de la cepa Ames (df/df), genéticamente deficientes en PRL, con homotransplante de hipófisi bajo la cápsula renal.

MATERIALES Y METODOS

DROGAS Y REACTIVOS

Los compuestos radioactivos [1,2-³H]-testosterona (AE= 55,2 Ci/mmol), [1,2-³H]5 α -dihidrotestosterona (AE= 50,6 Ci/mmol), [1,2-³H]-5 α -androstano-3 α ,17 β -diol (AE= 25,4 Ci/mmol), [4-¹⁴C]-testosterona (AE= 50 mCi/mmol), [4-¹⁴C]-dihidrotestosterona (AE= 50 mCi/mmol), [4-¹⁴C]-androstano-3,17-diona (AE= 52 mCi/mmol), [5-³H]-uridina (AE= 29 Ci/mmol), ¹²⁵I-AMPC (AE= 2,2 Ci/mmol) y [1-¹⁴C]-L-ornitina (AE= 49 mCi/mmol) fueron adquiridos a New England Nuclear Co. (Boston, MA, USA). La L-ornitina fue purificada por evaporación y redisolución en HCl 0,1 N, seguido por una segunda evaporación y redisolución en HCl 0,01 N. Los trazadores radioactivos utilizados en el metabolismo de andrógenos fueron purificados, periódicamente, por cromatografía en placa delgada y posterior elución en alcohol absoluto.

Las placas cromatográficas de sílica gel utilizadas para el control de pureza de los esteroides radioactivos y para la separación de andrógenos (Kieselgel 60 F 254) y las placas utilizadas en la separación de poliaminas (Sílica gel 60) fueron adquiridas a Merck (Darmstadt, Alemania).

Los esteroides no radioactivos, propionato de testosterona, clorhidrato de putrescina, espermidina y espermina, L-ornitina, fosfato de piridoxal, NADPH, DTT y todos los reactivos empleados en la preparación de soluciones buffer, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA). El hidróxido de hiamina se adquirió a

Packard Instruments Co. Inc. (Downers Grove, Ill, USA). Los solventes utilizados fueron todos de calidad analítica y provistos por Merck, Mallinckrodt o Sintorgan según los casos.

La hCG (APL) utilizada en experimentos "in vitro" fue provista por los Laboratorios Ayerst (Princeton, NJ, USA). Las preparaciones de células intersticiales se obtuvieron utilizando colagenasa tipo I provista por Worthington Biochemical (Freehold, NY, USA).

ANIMALES

Preparación de ratas con homotransplante

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley, pertenecientes al criadero del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Los animales fueron mantenidos a temperatura constante de 22°C, con períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y recibieron una dieta balanceada y agua "ad libitum".

A los 30 días de vida un grupo de animales fueron homotransplantados con una hipófisis, proveniente de ratas de la misma generación (hermanas), bajo la cápsula renal. En forma paralela, a un grupo de ratas de igual edad, tomadas como control, se les realizó una operación simulada implantando bajo la cápsula renal un pequeño fragmento de músculo esquelético. Transcurridos 30 días, se les extrajo sangre de la vena yugular, bajo anestesia etérea.

Se separó el suero y se determinaron los niveles de PRL y andrógenos por RIA. Aquellos animales que presentaban, como mínimo, una hiperprolactinemia 100 % superior al valor hallado en el grupo control, se sacrificaron por decapitación a los 35 días del transplante, recolectándose sangre del tronco corporal. El suero obtenido se congeló a -20°C hasta el momento de la determinación de PRL y LH. Los testículos fueron disecados y procesados en el momento.

Preparación de ratones enanos con homotransplante

Los ratones enanos de la cepa Ames (df/df) y sus crías normales (DF/-), fueron provistos por el Bioterio perteneciente al Department of Physiology, Southern Illinois University, Carbondalle, Estados Unidos, por entrecruzamiento de portadores heterocigotas del gen df, fenotípicamente normales. Todos los animales fueron mantenidos con iluminación (14 horas luz : 10 horas oscuridad) y temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) controladas, alimentados con dieta (TekLad, Madison, WI) y agua "ad libitum".

Los ratones enanos machos adultos (90 días de vida) se dividieron en cuatro grupos y recibieron el siguiente tratamiento:

.Grupo 1: 2 hipófisis provenientes de hembras de la misma cepa, se implantaron bajo la cápsula del riñón derecho de ratones enanos.

.Grupo 2: a ratones enanos macho se les realizó una operación

simulada, implantando un fragmento de músculo esquelético bajo la cápsula del riñón derecho.

.Grupo 3: animales transplantados fueron castrados al día siguiente e inmediatamente tratados con propionato de testosterona en aceite de maíz (25 ug/ratón, 3 veces por semana,s.c.)

.Grupo 4: animales con operación simulada fueron castrados y tratados con TP como se describió para el Grupo 3.

Al cabo de 40 días, 16 horas después de la última inyección, los animales se pesaron, se obtuvo sangre por punción cardíaca bajo anestesia y se sacrificaron por dislocación cervical.

Luego de centrifugar la sangre, se obtuvo el plasma y congeló a -20°C para determinar PRL, FSH y testosterona. Las vesículas seminales fueron extirpadas, disecándose el tejido conectivo y grasa circundante y eliminada su secreción. En forma simultánea también se extirpó una porción central del hígado. Los tejidos fueron pesados y congelados a -20°C.

Preparación de ratas con implante de Tumor 7315a

Ratas macho adultas de la cepa Buffalo cedidas por el Dr. F.-Iturriza, del Centro de Estudios Endócrinos, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de La Plata, fueron endocriadas en el Instituto de Biología y Medicina Experimental y mantenidas en condiciones

controladas de ventilación , humedad, temperatura (22 °C) e iluminación (12 horas de luz : 12 horas de oscuridad). Los animales recibieron alimento y agua "ad libitum".

El Tumor 7315a secreta altos niveles de PRL, como fue previamente confirmado por inmunohistoquímica (Morano, 1987). El tejido tumoral, gentilmente provisto por el Dr. F.Iturriza, fue obtenido originariamente por Bates y col. (1966) y mantenido por sucesivas transferencias en el Instituto de Biología y Medicina Experimental, durante más de 50 generaciones de transferencia. Macroscópicamente, en el Tumor 7315a pudieron distinguirse tres zonas: una de aspecto necrótico, otra de aspecto hemorrágico y una tercera de aspecto trófico. Se ha descrito una estrecha correlación entre esta clasificación macroscópica y el estudio histológico (Morano, 1987). Para realizar el trasplante, se siguió la técnica descrita por Morano (1987). Una porción de la zona trófica del tumor se cortó en pequeños trozos y se resuspendió en un volumen igual de Medio 199 que contenía 20 ug/ml penicilina y 30 ug/ml estreptomina. A cada animal receptor se le inyectó subcutáneamente 200 μ l de dicha suspensión en la región interesápulovertebral. Todos los animales receptores de una misma suspensión tumoral pertenecieron a la misma generación de transferencia. Luego de 35 días de desarrollo del tumor, se sacrificaron las ratas por decapitación, recolectándose sangre del tronco corporal. Esta se centrifugó y el suero obtenido se congeló a -20°C para posteriores determinaciones hormonales. Se

extirparon las vesículas seminales, los testículos y una porción de hígado, correspondientes a cada animal. Se descartó la secreción de las vesículas seminales y los distintos tejidos se pesaron y congelaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

Inyección intratesticular de PRL

Se utilizaron ratas Sprague Dawley de 32-35 días de edad, las que fueron anestesiadas levemente con eter. Sistemáticamente se inyectó en el testículo derecho PRL-o en solución fisiológica, mientras que en el testículo contralateral se administraron $10\ \mu\text{l}$ de vehículo. Las dosis de PRL administradas a cada grupo de 8 animales, fueron $10\ \mu\text{l}$ de una solución $1,5 \cdot 10^{-5}$; $1,5 \cdot 10^{-6}$ y $1,5 \cdot 10^{-7}$ M que corresponden a 3000, 300 y 30 ng/testículo. Dado que a esta edad el testículo tiene un volumen aproximado de $500\ \mu\text{l}$, podemos inferir que la "concentración teórica" intratesticular alcanzada fue de 300, 30 y 3 nM. De esta forma cada animal representa su propio control, habiéndose demostrado que con este diseño se evalúa únicamente el efecto local de la hormona (Sharpe, 1984).

Se preparó, además, otro grupo control de 8 animales que fue inyectado en ambos testículos con $10\ \mu\text{l}$ de solución fisiológica. Transcurridas 17 horas, se sacrificaron los animales por decapitación, disecándose los testículos, los que fueron homogeneizados en

Buffer R (Tris 50 mM, 0,25 M sacarosa, 1,5 mM EDTA, 1mM em DTT, pH 7,4) en una dilución 1:10. Alícuotas de 0,5 ml (2,5 mg proteína) fueron utilizadas para la determinación de la actividad 5 α -reductasa.

Preparación de tejidos

a.- Homogenato de testículo

Los testículos de ratas hiperprolactinémicas o sus correspondientes controles, mantenidos entre 0-4°C, se decapsularon y colocaron en Buffer R, en una relación 1:10 (p/v) en un homogenizador Polytron. Alícuotas de 0,5 ml (2 mg proteína) se incubaron por duplicado para la determinación de la actividad 5 α reductasa.

b.- Preparación de microsomas

Los testículos provenientes de ratas controles e hiperprolactinémicas se homogeneizaron en Buffer R, como se describió anteriormente, en una relación 1:4 (p/v). El homogenato se centrifugó a 10.000 xg durante 30 minutos, se descartó el precipitado y el sobrenadante fue centrifugado a 105.000xg durante una hora. El

precipitado fue resuspendido en Buffer R en una proporción de 2 ml/gr de tejido original. Alícuotas de 0,5 ml (0,5 mg proteína) de esta fracción se utilizaron para las determinaciones enzimáticas.

c.- Obtención de túbulos seminíferos y células intersticiales

Para el aislamiento de células intersticiales y túbulos seminíferos se utilizó la técnica descrita por Mendelson y col. (1975). Ratas intactas fueron sacrificadas por decapitación diseccionándose los testículos, los que fueron colocados en tubos Falcon de plástico (hasta 6 testículos por tubo) y tratados con 0.3 mg/ml de colagenasa en Medio 199 conteniendo 0.1% de albúmina sérica bovina en una relación de 1 ml/g de testículo decapsulado. Las incubaciones se realizaron con agitación suave, durante 12 minutos a 34°C, previo gaseado de los tubos con carbógeno (95% CO₂ : 5% O₂). La reacción se detuvo por agregado de 50 ml de Medio 199 frío. Los tubos se agitaron en forma rotatoria durante 3 minutos con el propósito de dispersar mejor el tejido. Se dejó sedimentar durante 3 min. y luego se filtró el sobrenadante a través de una fina malla de nylon (Nitex 50). Los túbulos se lavaron con 2 volúmenes de Medio 199 y el filtrado se reunió con el anterior, centrifugándose a 800xg durante 5 minutos para la obtención de las células intersticiales. A continuación, se descartó el sobrenadante y las células fueron

resuspendidas en un volumen apropiado de Medio 199, determinándose, luego, la viabilidad celular. La suspensión de células intersticiales se diluyó hasta una concentración de $2 \cdot 10^6$ células/ml y luego fue sonicada.

Los túbulos seminíferos obtenidos por colagenización se homogeneizaron en Buffer R en una relación 1:10. Alícuotas de 0,5 ml (2 y 0,5 mg proteína, respectivamente) se utilizaron para la determinación de la actividad 5α -reductasa.

Cuando las preparaciones de células intersticiales se utilizaron para cultivos primarios, los testículos se disecaron en forma aséptica y los procedimientos siguientes se realizaron bajo condiciones de rigurosa esterilidad. Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical, se pinceló la región abdominal con etanol 70% y realizó una incisión en el abdomen con instrumental estéril. Luego, se separaron los testículos, los que fueron inmediatamente colocados en una cápsula de Petri conteniendo Medio de cultivo con antibióticos. Bajo flujo laminar, los testículos fueron decapsulados, lavados con Medio 199 estéril y colocados en un tubo Falcon para su colagenización. Los pasos siguientes se realizaron como se describió previamente bajo estricta asepsia.

d.- Cultivos primarios de células de Leydig

El desarrollo de los cultivos primarios de células intersticiales se basó en el método de Browning y col. (1983) con algunas modificaciones. Las células intersticiales se resuspendieron en un medio de cultivo compuesto por Medio Eagle Dulbecco Modificado y una mezcla nutriente Ham F12 en una relación 1:1, suplementado con 15 mM HEPES, 5 ug/ml insulina, 5 ug/ml transferrina, 100 UI/ml penicilina y 2,5 ug/ml anfotericina. Este Medio es, en cierta medida, selectivo, ya que los fibroblastos no crecen bajo estas condiciones de cultivo (Mather y Sato, 1979), permitiendo un enriquecimiento del mismo en células de Leydig. Se sembraron 150.000 células/cm² y se mantuvieron en una atmósfera humidificada de 5% CO₂ en aire a 34°C durante 48 horas. A las 24 horas de cultivo se realizó un cambio de Medio.

MÉTODOS

Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión de azul tripan. Una alícuota de 100 ul de la suspensión celular se diluyó con 400 ul de Medio 199 e incubó con 500 ul de azul tripan 0,4 g%, a temperatura ambiente durante 5 minutos. Al cabo de ese tiempo, se observó la preparación al microscopio óptico en cámara de Neubauer, y determinó el número de células viables (células sin teñir). En todos los casos se trabajó con una viabilidad superior al 95%.

Cuando la viabilidad celular se determinó en las células en cultivo primario se aspiró el medio y rápidamente se agregó 100 ul de la solución de azul tripan. Luego de 5 minutos, se aspiró esta solución y la monocapa celular se lavó con Buffer FS (NaCl 0,23 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; CaCl₂ 0,9 mM; MgCl₂.6H₂O 0,5 mM; pH=7,4) a temperatura ambiente. Las células se deshidrataron por sucesivos lavados con etanol 70%, etanol 80% y etanol 96%.

Determinación de la actividad 3 β hidroxiesteroide deshidrogenasa

Se determinó la actividad de la enzima 3 β hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HDH) por tinción histoquímica específica para células esteroideogénicas, según la técnica de Levy y col. (1959), con algunas modificaciones. El porcentaje de células con actividad 3 β -HDH positiva es considerado como un índice del porcentaje de células de Leydig en la preparación. Una alícuota de 1 ml de la suspensión de células intersticiales se incubó con 1 ml de NAD (8 mg/ml), 1 ml de p-nitro azul de tetrazolium (2mg/ml) y 0,1 ml de dehidroepiandrosterona disuelta en propilenglicol (1mg/ml), durante una hora en un baño a 37°C con agitación constante y en atmósfera de carbógeno. Finalizada la incubación, se evaluó microscópicamente la presencia de depósitos de azul formazan en las células con actividad 3 β -HDH positiva, lo que les confiere un color violáceo-azulado.

Esta tinción histoquímica específica se realizó también en las células en cultivo. Se aspiró el Medio de cultivo e inmediatamente se agregaron a cada celda 50 μ l de NAD (8 mg/ml), 100 μ l de p-nitro azul de tetrazolium (2mg/ml) y 10 μ l de etiocolanolona (1mg/ml) en propilenglicol. Los cultivos se mantuvieron 1 hora en la estufa gaséada a 34°C. Al finalizar el periodo de incubación, se aspiró el Medio y se hizo un rápido lavado con Buffer FS. Posteriormente se deshidrataron las células por sucesivos lavados con etanol 70%,

etanol 80% y etanol 96%. Se dejaron secar al aire, desarmó la placa y las células pegadas a la base se observaron al microscopio óptico con lente de inmersión.

Producción de andrógenos "in vitro"

a.- Testículos enteros decapsulados

Se estudió la producción de andrógenos en incubaciones de testículos enteros provenientes de animales controles e hiperprolactinémicos por homotransplante de hipófisis bajo la cápsula renal. Los animales se mataron por decapitación, los testículos se decapsularon e inmediatamente se colocaron en viales de plástico de 20 ml que contenían 3 ml de Medio 199, 0,1% albúmina bovina y MIX 0,125 mM. Un testículo fue utilizado como control, incubándose en ausencia de hCG (condiciones basales), mientras que el contralateral se incubó en presencia de diferentes concentraciones de hCG (0,3; 0,6; 1; 10 y 50 mUI hCG) en 50 μ l de medio. Los correspondientes controles se equilibraron con 50 μ l de Medio 199.

Las incubaciones se realizaron siempre por triplicado, a 34°C en un incubador Dubnoff con agitación constante de 100 ciclos/min., bajo atmósfera de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Luego de 3 horas, los viales fueron transferidos a un baño de hielo, se separó el

medio, centrifugó a 800 x g durante 10 min. y el sobrenadante congeló a -20°C hasta el momento de la determinación de andrógenos.

b.- Suspensión de células intersticiales

La suspensión de células intersticiales fue obtenida según la técnica descrita previamente. Para evaluar la producción de andrógenos, se incubaron alícuotas de 1 ml de la preparación de células de Leydig (10^6 células/ml) en tubos de Kahn, en presencia de MIX (0,125 mM). Las incubaciones se realizaron por triplicado en ausencia (basal) o presencia de diferentes concentraciones de hCG (0,3; 0,6; 1; 10 y 50 mUI hCG), a 34°C bajo carbógeno y con agitación constante. Luego de 3 horas de incubación, las suspensiones celulares fueron transferidas a un baño de hielo y posteriormente se centrifugaron a 800 x g durante 10 min. El sobrenadante se congeló a -20°C hasta la medición de andrógenos.

c.- Células intersticiales en cultivo primario

Se cultivó una suspensión de células intersticiales provenientes de ratas de 30 días de edad en condiciones estériles siguiendo la técnica descrita previamente, utilizando una cámara de 24 cel-

das. Al cabo de 45 horas de cultivo, se realizó un cambio de Medio y agregó 300 μ l Medio de cultivo fresco conteniendo 15 μ l MIX 0,125 mM; en ausencia (basal) o presencia de hCG. Las dosis de hCG utilizadas fueron: 0; 0,5; 1; 2; 5; 10; 50 y 500 mUI. En las experiencias de estimulación máxima sólo se utilizó una dosis de 200 mUI. Los cultivos se mantuvieron a 37°C durante 3 horas en atmósfera humidificada y gaseada con carbógeno. Luego, los medios fueron aspirados y guardados a -20°C hasta la determinación de andrógenos.

Efecto "in vitro" de PRL

a.- Incubación de testículos con PRL

Testículos provenientes de ratas de 30 días de edad, sacrificadas por decapitación, fueron decapsulados e incubados en Medio 199, conteniendo MIX 0,1 mM y 3 concentraciones diferentes de PRL-o. En cada experimento se realizaron 3 incubaciones (5 testículos/-incubación) para cada concentración de PRL-o (5; 50 y 500 nM), y los testículos contralaterales correspondientes se incubaron en ausencia de la hormona. Luego de 90 minutos de incubación, a 34°C, bajo carbógeno, los testículos fueron lavados en Medio 199 y colagenizados según la técnica descrita previamente. Los túbulos seminíferos y células de Leydig obtenidos se homogeneizaron en Buffer R

para la determinación de la actividad 5α -reductasa.

b.- Incubaciones de túbulos seminíferos y suspensiones de células de Leydig con PRL

Testículos provenientes de ratas de 30 días de edad se colagenizaron como se describiera previamente. Los túbulos seminíferos y las suspensiones de células de Leydig obtenidas se incubaron en Medio 199 en presencia o ausencia (control) de 50 nM PRL-o, durante 90 minutos, a 34°C, bajo carbógeno. Se removió el medio de incubación, se lavó con Buffer R y finalmente, las fracciones testiculares se homogeneizaron convenientemente para la posterior determinación de la actividad 5α -reductasa.

c.- Efecto de PRL en células de Leydig en cultivo primario

El efecto agudo de PRL se estudió en células de Leydig, provenientes de testículos de rata de 30 días de edad, las que se cultivaron como se describiera anteriormente, en un Medio químicamente definido. A las 45 horas de cultivo, se realizó un cambio de Medio y se agregó Medio fresco conteniendo MIX (0,125 mM); en ausencia (control) o presencia de 10, 100 y 1000 ng/ml PRL-o. Los cultivos

se mantuvieron a 37°C durante 3 horas en atmósfera humidificada y gaseada con carbógeno. Finalmente, los Medios fueron aspirados y conservados a -20°C hasta la determinación de andrógenos.

En los experimentos donde se estudia el efecto de PRL a tiempos prolongados sobre células de Leydig en cultivo, la hormona se agrega al Medio a las 0, 20 y 26 horas con el propósito de mantener de manera constante una concentración 10 ng/ml de la hormona durante el tiempo del experimento.

Determinación de la actividad 5 α -reductasa

Alícuotas de 0,5 ml de homogenato testicular, suspensión microsomal, homogenato de túbulos seminíferos o células intersticiales frescas, se incubaron por duplicado con 400.000 cpm de ^3H -testosterona, testosterona no radiactiva ($0,36 \cdot 10^{-6}$ M) y NADPH $4 \cdot 10^{-4}$ M a 37°C. La reacción se detuvo por el agregado de 1,5 ml de acetato de etilo a los 2, 4 y 8 minutos. A cada uno de los tubos se agregaron 3000 cpm de ^{14}C -3 α -Diol y 3000 cpm de ^{14}C -DHT para evaluar pérdidas y 20 μg de testosterona y androstenediona para ubicar las zonas correspondientes en el cromatograma. Todos los tubos se agitaron enérgicamente durante 1 minuto para facilitar la extracción en el solvente orgánico. Las fases se separaron por congelación a

-70°C. La extracción se repitió 2 veces con 1 ml de acetato de etilo cada vez. Las fases orgánicas se reunieron y llevaron a sequedad. El extracto fue redissuelto con 3 gotas de cloroformo : metanol (1:1) y se sembró en una placa de sílica gel. El cromatograma se desarrolló en cloroformo-metanol 98:2. Mediante luz ultravioleta se ubicaron en el cromatogramas las zonas correspondientes a testosterona y androstenediona. Paralelamente, en la misma placa se sembró una mezcla de 3 α -Diol, testosterona y DHT no radioactivos (500 ng). Este carril del cromatograma se roció con 10 % ácido sulfúrico en metanol y calentó 5 minutos a 100 °C, originándose una mancha violácea en la zona correspondiente a cada andrógeno. Se confrontó este carril con los otros del mismo cromatograma y por similitud de Rf se ubicó la zona de 3 α -Diol.

Cada una de las zonas se cortó y colocó en un vial conteniendo 0,5 ml de metanol. Luego se agregaron 10 ml de líquido de centelleo (tolueno 0,5% en PPO y 0,05% en POPOP) y la radioactividad se determinó en un Contador de Centelleo Líquido (Beckman LS 1801). Se realizó la corrección por pérdidas mediante la medición simultánea de ^3H y ^{14}C . Los estándares de ^{14}C y ^3H se contaron en las mismas condiciones que las muestras con el objeto que todos los viales presentaran el mismo efecto quenching.

Para cada incubado se evaluó la cantidad de productos 5 α -reducidos formados/ mg de proteína en cada tiempo de incubación. Se utilizó como expresión de actividad de la 5 α -reductasa la velocidad

inicial de formación de DHT y 3α -Diol .

Cuando se determinó la actividad 5α -reductasa en las células de Leydig luego de 48 horas de cultivo, éstas fueron cosechadas mecánicamente por medio de una espátula de goma en Buffer R y sonicadas. Alicuotas de 0,5 ml (250 μ g proteína) se incubaron durante 60 minutos a 34 °C. La reacción se detuvo por agregado de 1 ml de acetato de etilo, continuándose el procedimiento como se describió anteriormente.

Determinación de la actividad $3\alpha/\beta$ hidroxisteroide óxido-reductasa

Luego de 48 horas en cultivo, tanto en condiciones basales o ante el agregado de PRL (3 pulsos de 10 ng/ml, 500 pM), las células de Leydig se lavaron con Buffer FS y sonicaron en Buffer R. Una alícuota de 250 μ g de proteínas fue incubada durante 20 minutos con $3H$ -DHT (400.000 cpm), DHT 0,36 μ M y 0,4 mM NADPH a 34°C. La reacción se detuvo por agregado de acetato de etilo. Los procedimientos de extracción y separación de los andrógenos fueron los mismos que los detallados para la determinación de la actividad 5α -reductasa.

Determinación de hormonas proteicas

Las concentraciones séricas de hormonas proteicas se determinaron por RIA, utilizando la técnica de doble anticuerpo según se detalla en el protocolo provisto por el NIAMDD Rat Pituitary Distribution Program. Las incubaciones con el primer anticuerpo se realizaron a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, se agregó la hormona marcada y, luego de 24 horas, el segundo anticuerpo. Al cabo de 48 horas a 4°C, la hormona libre se separó por centrifugación y aspiración de los sobrenadantes y se determinó la radioactividad de los precipitados. Los resultados se expresan en ng/ml con respecto a los correspondientes standards.

Para la determinación de LH en suero de rata se utilizó el standard rLH-RP-2 del NIAMDD Rat Pituitary Distribution Program. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron menores del 10 %, y la sensibilidad de la determinación fue 2 ng/ml.

En la determinación de PRL en suero de rata se utilizó el standard rPRL-RP-3 del NIAMDD Rat Pituitary Distribution Program. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron menores del 10 % y la sensibilidad de la determinación fue de 1 ng/ml. Los niveles de PRL en suero de ratón se determinaron por un RIA homólogo específico usando PRL de ratón como preparación de refe-

rencia (AFP-6476C) y anticuerpo anti-PRL de ratón (AFP-131078) gentilmente cedido por el Dr.V.Chandrashekar. Todas determinaciones de PRL se realizaron en el mismo ensayo. El coeficiente de variación intraensayo fue de 3,8%. La sensibilidad de la determinación resultó ser de 1 ng/ml.

La determinación de FSH en suero de ratón se realizó por un RIA heterólogo utilizando una preparación de FSH de rata como referencia (r-FSH RP-2) y un anticuerpo anti-FSH de rata (rFSH-A/S-S-11). Este método ha sido descrito y validado por Chandrashekar y col. (1988), quien gentilmente cedió ambas preparaciones. El coeficiente de variación intraensayo fue de 5,3%. Todas las muestras para determinar FSH fueron incluidas en la misma determinación. La sensibilidad del método resultó ser de 2,5 ng/ml.

Determinación de andrógenos

La determinación de testosterona en el suero de rata se realizó según el método validado en el Laboratorio (Suescun y col., 19-85). Alícuotas de 200 μ l de suero se extrajeron con 2 ml de eter etílico. El extracto orgánico se evaporó a sequedad y los residuos fueron resuspendidos en 800 μ l de Buffer RIA (40mM HNa_2PO_4 , 0,15 mM NaCl, 0,1% gelatina y 0,1% azida sódica, pH 7,4), determinándose

en este extracto, la testosterona. El anticuerpo utilizado presentó una reacción cruzada con DHT, en consecuencia, los resultados deben interpretarse como la suma de testosterona + DHT. La sensibilidad del ensayo fue de 12,5 pg/tubo. Los coeficientes intra e interensayo fueron menores del 12%.

Los andrógenos (T, DHT y 3α -Diol) producidos y liberados al Medio, tanto en los cultivos primarios de células de Leydig como en las incubaciones de testículos enteros o preparaciones frescas de células, se determinaron directamente por RIA, sin extracción previa.

La determinación de 3α -Diol se realizó con un anticuerpo altamente específico (Immunotech Diagnostic, Montreal, Canadá). El límite inferior de determinación fue de 12,5 pg y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron inferiores a 12 %.

Determinación de ADN

La determinación de ADN se realizó por el método fluorométrico descrito por Labarca y Paigen (1980). Después de 48 horas de cultivo se descartó el Medio, las células fueron lavadas con Buffer FS y luego del agregado de 500 μ l/celda de EDTA 2mM, las mismas se sonicaron con 3 pulsos de 15 segundos (Sonifier cell disruptor, W 140 Heat Systems Ultrasonic, Inc.). Una alícuota apropiada de esta

preparación se diluyó a 500 μ l con EDTA 2mM y se mezcló con 1 ml del fluorógeno H 33258 (Hoechst) 0,15 ug/ml en Buffer SA (75 mM NaH₂PO₄, 3,75 M NaCl, pH=7,4). El blanco y la curva standard de ADN recibieron igual tratamiento. La lectura se realizó dentro de las 16 horas en un fluorómetro Aminco Bowman a $\lambda_{\text{Excitación}}=360$ nm y $\lambda_{\text{Emisión}}=445$ nm.

Incorporación de Uridina

La incorporación de uridina radioactiva a ARN fue determinada según el método de Blaquier y Breger (1974). Luego de 45 horas de cultivo, el Medio fue renovado y se agregó ³H-uridina (5 uCi/ml). Los cultivos se incubaron durante 3 horas a 34°C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ en aire. Las células se lavaron con Buffer FS e incubaron durante 2-3 minutos a 34 °C, con 0,3 ml de tripsina 0,05% en solución de Buffer FS sin Ca ni Mg y EDTA (0,02%). La acción de la tripsina se detuvo por agregado de 50 μ l de inhibidor de tripsina 0,3%. Las células fueron lavadas 3 veces con solución fisiológica y luego se centrifugaron a 800xg durante 5 minutos. A continuación el precipitado celular fue resuspendido en 2,5 ml de solución fisiológica y tratado con ácido tricloroacético (TCA) frío (concentración final 10%). Previamente, se reservó una alícuota de la preparación celular para la determinación de ADN.

Luego de 30 minutos a 4°C, el precipitado fue colectado por filtración en un papel Whatman GF/C y lavado 3 veces con un exceso de TCA 10%. Los filtros se secaron y colocaron en viales conteniendo solución de centelleo líquido. Se midió la radioactividad incorporada en el precipitado en un Contador de Centelleo Líquido.

Determinación de AMPc

La concentración del AMPc liberado al Medio de incubación de las células intersticiales en cultivo, se determinó según el método de Zubin y Taleisnik (1983). Una alícuota de 20 μ l de muestra o el correspondiente standard se acetilaron, para aumentar la sensibilidad del ensayo, con 5 μ l de una mezcla de anhídrido acético y trietilamina en relación 1:2. A los 5 minutos se agregaron 100 μ l de Buffer acético /acetato 0,05M, pH= 6,2, 100 μ l de anticuerpo específico (gentilmente cedido por la Dra. P.Zubin) y 100 μ l de nucleótido radioactivo. Los incubados se mantuvieron a 4°C durante 20 horas y luego de agregar 50 μ l de albúmina bovina al 2% y 2ml etanol, se centrifugó a 2000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante fue aspirado y se determinó la radioactividad en el precipitado en un Contador Beckman Gamma 4000.

La sensibilidad del ensayo fue de 20 fmoles/tubo y las variaciones intra e inter-ensayo resultó ser 5 y 11 % respectivamente.

Determinación de ornitina decarboxilasa

Se utilizó el método originalmente descrito por Pegg y col. (1970) y desarrollado en nuestro Laboratorio por de las Heras y col. (1987), con algunas modificaciones.

Los testículos o vesículas seminales se homogeneizaron en Buffer A (Tris 10 mM, EDTA 1,5 mM, sacarosa 0,25 M, MgCl₂ 1mM, β-mercaptoetanol 2 mM y azida sódica 0,2%, pH=7,4) en una relación 1 ml/g tejido y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 minutos. En frascos de 10 ml se incubó una alícuota de 100 μl de estos sobrenadantes con 100 μl de ornitina-¹⁴C (400.000 cpm) en Buffer O (Tris 80 mM, ornitina 2mM, fosfato de piridoxal 0,4 mM y DTT 9mM, pH=7), asegurando un cierre hermético con tapa de goma, durante 60 minutos a 34°C. Posteriormente, se inyectaron en cada frasco 500μl de TCA 40% con el propósito de desnaturalizar la enzima y liberar el ¹⁴CO₂ retenido en el Buffer. Para asegurarse la liberación cuantitativa de este compuesto radioactivo, se continuó la incubación durante 30 minutos a la misma temperatura. El ¹⁴CO₂ liberado se atrapó en recipientes de plástico suspendidos en el interior del frasco, con 150 μl de hidróxido de hiamina 1M en metanol. Estos recipientes se trasladaron a viales conteniendo solución centellante (0,4 % PPO y 0,004% POPOP en tolueno) y se evaluó la radioactividad emitida en un Contador de Centelleo Líquido. Los resultados se expresan en pmoles de CO₂ liberados/hora/mg proteína o pmoles/h/órgano.

Determinación de putrescina y poliaminas

La determinación del contenido de putrescina y poliaminas en testículos o vesículas seminales se realizó según el método descrito por Seiler (1983). Los tejidos se homogeneizaron en ácido perclórico 0,2 N, en una relación 1g de tejido/2 ml y se mantuvieron durante 2 horas a 0-4°C para facilitar la floculación del precipitado. Las muestras se centrifugaron a 20.000xg durante 30 minutos. Alícuotas de 100 μ l de sobrenadante se alcalinizaron con 100 μ l de Na_2CO_3 (sol.sat.) a fin de favorecer las formas no protonadas de los grupos amino, de mayor reactividad, y mezclaron con 200 μ l de cloruro de dansilo (20 mg/ml) en acetona. Paralelamente se dansiló una mezcla de standards de putrescina, espermidina y espermina, que contenía 10 nmoles de cada compuesto. La reacción de dansilación se desarrolló durante 20 horas, a temperatura ambiente, en oscuridad. Posteriormente, el exceso de cloruro de dansilo se eliminó por agregado de 50 μ l de prolina (100mg/ml) en agua, continuándose la incubación durante una hora en las mismas condiciones. Las muestras se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 45-50°C y se resuspendieron en 200 μ l de agua. Los derivados dansilados se extrajeron en 200 μ l de tolueno. Los extractos orgánicos se separaron por centrifugación a 800xg a temperatura ambiente y posterior congelamiento.

Alícuotas de 50 μ l de la fase orgánica se sembraron en placas

de sílica gel, activadas por calentamiento a 110°C durante 1 hora. Conjuntamente, se sembraron distintos volúmenes de los extractos conteniendo cantidades de poliaminas en el rango de 0,25 a 2 nmoles. El cromatograma se desarrolló en oscuridad, efectuándose dos corridas en ciclohexano-acetato de etilo (1:1, vol/vol), seguido por una tercera corrida en ciclohexano-acetato de etilo (3:2, vol.vol). Con el fin de estabilizar la fluorescencia de los derivados dansilados se vaporizaron las placas con una solución de isopropanol -trieta-nolamina (4:1, vol/vol). Las bandas correspondientes a didansilputrescina, tridansilespermidina y tetradansilespermina se identificaron por irradiación ultravioleta de longitud de onda 366 nm. Los R_f resultantes de cada compuesto fueron los siguientes: putrescina: 0,62; espermidina: 0,53; espermina: 0,45. Las bandas correspondientes a las poliaminas dansiladas se eluyeron de las placas con 1 ml de benceno-trietilamina (95:5, vol/vol) y se determinó la fluorescencia en un Espectrofluorómetro Jasco FP-770, por excitación a 350 nm y emisión a 490 nm. Los resultados se expresan en nmoles/g de tejido o nmoles/órgano.

En estas condiciones, la reproducibilidad del método resultó ser $\pm 3-5\%$ y la recuperación, luego de todo el procedimiento, es superior al 90% para una cantidad de 10 pmoles de poliamina. Este método demostró ser altamente sensible, ya que pueden detectarse 10 pmoles de compuesto en un volumen de muestra de 500 μ l.

Determinación de acetilpoliaminas

El contenido de acetilpoliaminas se determinó siguiendo la metodología descrita por de las Heras (1989) con algunas modificaciones. La preparación de las muestras de tejido y mezclas de reacción y la extracción de los derivados dansilados fueron realizados según los procedimientos descritos en poliaminas. Se sembraron alícuotas de 70 μ l de las muestras, conjuntamente con 50 μ l del blanco de reacción y 50 μ l de hexano diamina. Para la realización de la curva estandar se preparó una solución conteniendo 10 nmoles de acetil putrescina, N¹-acetil espermidina, N⁸-acetilespermidina y acetil espermina a partir de soluciones 1mM en ácido acético de las mismas y se sembraron alícuotas de 0,25; 0,5; 1 y 2 nmoles. En primer lugar, se realizaron dos desarrollos del cromatograma en acetato de etilo con el propósito de eliminar la interferencia de las poliaminas. Posteriormente, los acetilderivados fueron separados por un tercer desarrollo en cloroformo:tetracloruro de carbono:metanol (14:6:1, vol/vol). Se vaporizaron las placas con una solución de isopropanol-trietanolamina (4:1, vol/vol). Las bandas fueron identificadas con luz UV, $\lambda = 366$ nm. Los R_f resultantes para cada compuesto fueron los siguientes: acetilputrescina: 0,21; N⁸-acetilespermidina: 0,30; N¹-acetilespermidina: 0,33; acetilespermina: 0,45. Las bandas correspondientes a cada compuesto fueron eluidas con 0,5 ml de benceno:trietilamina (95:5,

vol/vol), previamente gaseada. Se determinó la fluorescencia en los sobrenadantes a λ excitación = 350 nm y λ emisión = 490 nm.

Los resultados se expresan en nmoles/gr de tejido o nmoles/órgano.

OTROS METODOS

Determinación de proteínas

Se realizó por el método de Lowry y col. (1951), utilizando albúmina sérica bovina como standard.

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se analizaron por el test de Student en el caso de 2 grupos de muestras independientes, y por análisis de varianza y test de Dunnett en el caso de más de 2 grupos (Li, 1964). En el análisis de muestras dependientes se utilizó el test "t" de Student para muestras pareadas o el test de Mann-Whitney-U (una cola) según se especifica en la leyenda de las Figuras.

RESULTADOS

I. EFEECTO DE LA PRL SOBRE EL TESTICULO**I. A.- ESTUDIOS "IN VIVO"****I. A. 1.- ESTUDIOS EN RATAS CON HOMOTRANSPLANTE DE HIPOFISIS****Valores hormonales séricos**

Con el propósito de determinar la influencia de la PRL sobre el metabolismo de andrógenos, se analizó el efecto de una hiperprolactinemia inducida en ratas prepúberes, por homotransplante de una hipófisis bajo la cápsula renal. Los animales se transplantaron a los 30 días de edad y sacrificaron 40 días más tarde. La observación directa del implante el día del sacrificio permitió detectar, en los animales que presentaban hiperprolactinemia, irrigación en la zona del mismo, sin invasión en la corteza renal. En cambio, en aquellos animales con niveles séricos de PRL cercanos al valor del grupo control, se apreciaba una escasa irrigación, así como un tamaño muy pequeño de la hipófisis transplantada. Este grupo de animales no se utilizó en los estudios que se detallan a continuación.

El grupo transplantado presentó un valor de PRL sérica de 85 ± 10 ng/ml, mientras que la media del grupo control fue 25 ± 3 ng/ml ($x \pm ES$, $n=10$, $p < 0.001$).

Los niveles de LH séricos del grupo hiperprolactinémico (H) fueron significativamente menores que los del grupo control (C) (C:

2,1±0,2 ng/ml; H: 1,1±0,1 ng/ml, n=10, p<0,01).

El homotransplante de hipófisis bajo la cápsula renal no originó modificaciones en los niveles de testosterona (C: 3,8±0,1; H: 3,5±0,1 ng/ml, n=10), ni tampoco en los niveles de 3 α -Diol circulantes (C: 1,8±0,1; H: 2,0±0,1 ng/ml, n=10).

Producción de andrógenos "in vitro" por testículo total

Se decidió investigar en testículos provenientes de ratas con homotransplante de hipófisis y de ratas con operación simulada, la producción de andrógenos "in vitro" en condiciones basales y ante el estímulo con distintas dosis de hCG, con el propósito de analizar si la capacidad esteroidogénica testicular estaba preservada a pesar de los niveles disminuídos de LH. En el Medio de incubación se determinaron por RIA los niveles de testosterona producidos.

La Figura 11 muestra las curvas dosis-respuesta obtenidas. Los niveles basales de testosterona producidos fueron ($\bar{x} \pm ES$, n=12) 46,97 \pm 1,93 ng/gr testículo/3 horas en el grupo de ratas hiperprolactinélicas y 52,8 \pm 1,82 ng/gr testículo/3 horas en el grupo de animales control. En las incubaciones realizadas en presencia de una dosis máxima de hCG (50 mUI), la producción de testosterona se elevó 9 y 8 veces respectivamente. Por otra parte, tampoco se observaron diferencias significativas entre el DE50 (dosis efectiva

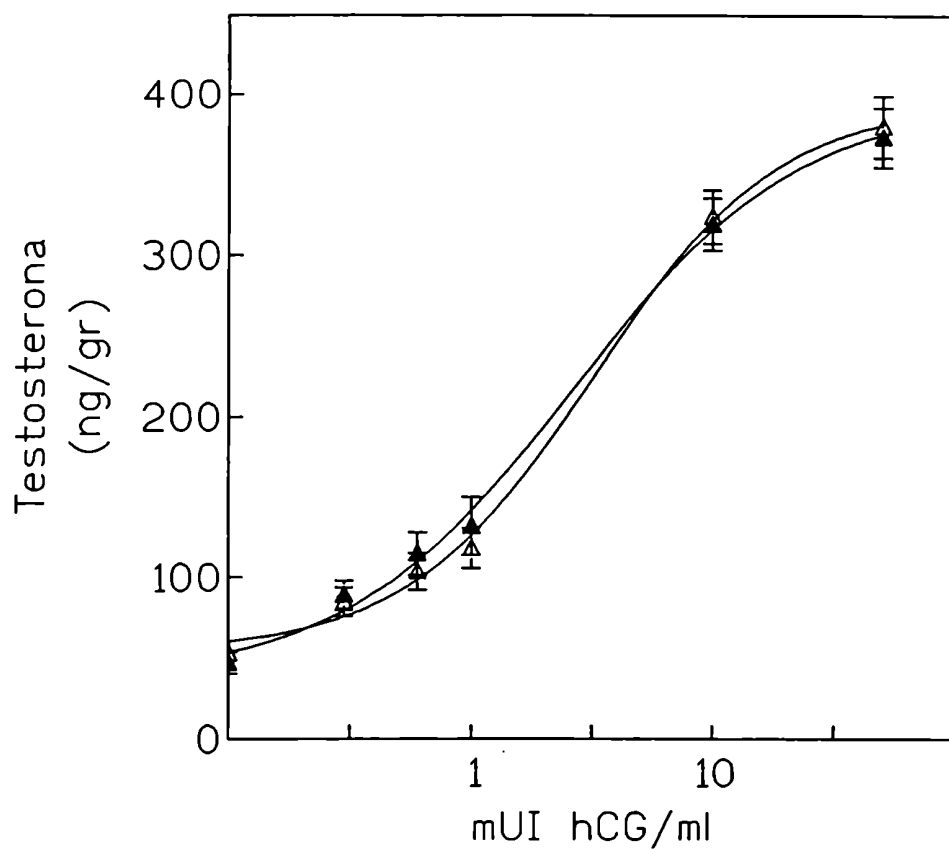


Figura 11: Producción de testosterona por testículos enteros.

Δ: testículos provenientes de animales controles.

▲: testículos provenientes de animales homotransplantados.

Cada punto representa el valor medio \pm ES de incubaciones realizadas por triplicado, de un experimento representativo.

50) de ambas curvas.

Producción de andrógenos "in vitro" por células de Leydig

Se prepararon suspensiones de células intersticiales a partir de testículos provenientes de ratas hiperprolactinémicas y de animales control. Alícuotas de ambas suspensiones conteniendo 10^6 células/ml fueron incubadas en ausencia (condiciones basales) o presencia de distintas dosis de hCG. En el Medio de incubación se determinaron los niveles de testosterona producidos.

Como muestra la Figura 12 no se detectaron diferencias significativas entre ambas curvas.

Actividad 5α -reductasa en homogenato testicular

Testículos provenientes de ratas hiperprolactinémicas (H) y animales con operación simulada (Control), se decapsularon y homogeneizaron en Buffer R. En este homogenato se determinó la actividad específica de la enzima 5α -reductasa. Como puede observarse en la Figura 13, se detectó un aumento significativo en la actividad enzimática (Control: $0,05 \pm 0,007$ vs. H: $0,103 \pm 0,010$ pmol 5α -reducidos/mg prot./min., $p < 0,02$). La hiperprolactinemia originó un

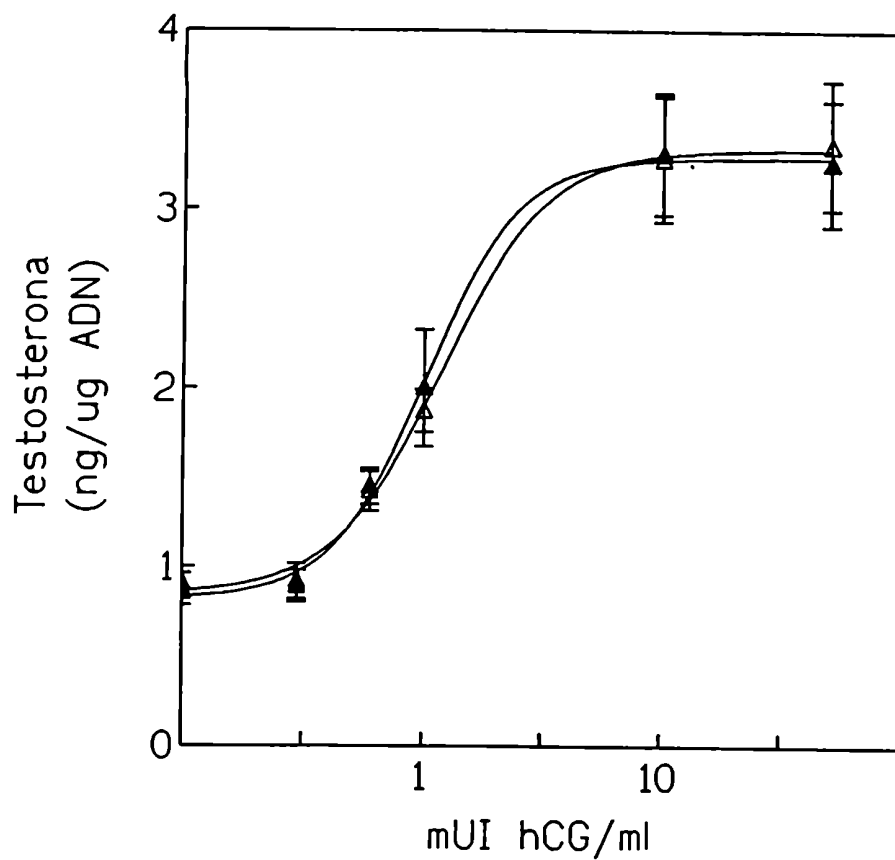


Figura 12: Producción de testosterona por suspensiones de células intersticiales.

Δ: células intersticiales de animales controles.

▲: células intersticiales de animales homotransplantados.

Cada punto representa el valor medio \pm ES de incubaciones realizadas por triplicado, de un experimento representativo.

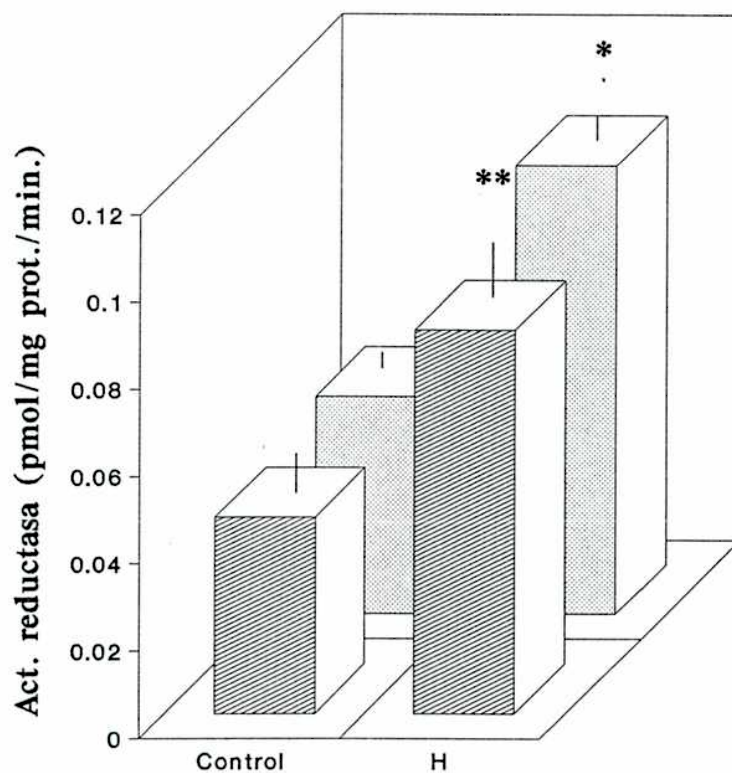


Figura 13: Efecto de la hiperprolactinemia inducida por homotransplante en la actividad 5 α -reductasa testicular.

Control: animales con operación simulada; H: animales con homotransplante.
 ▨: 3 α / β -Diol; ▤: compuestos 5 α -reducidos. Cada barra representa el valor medio \pm ES (n=3). Los asteriscos indican dato significativamente diferente del control (test de Student, *: p < 0,02; **: p < 0,05).

aumento del 106% en la velocidad inicial de formación de compuestos 5 α -reducidos/mg proteína en la unidad de tiempo. También fue posible detectar que la formación de 3 α / β -Diol aumentó significativamente (Control: 0,045 \pm 0,007 vs. H: 0,088 \pm 0,010 pmol 3 α Diol/mg prot./min., p<0,05), en un 95% de la velocidad inicial.

Actividad 5 α -reductasa en microsomas testiculares

Testículos provenientes de ratas hiperprolactinémicas y animales controles se decapsularon y homogeneizaron en Buffer R. A partir de este homogenato se obtuvieron microsomas por centrifugación diferencial. En esta fracción microsomal se determinó la actividad específica de la 5 α -reductasa, calculando la velocidad inicial de formación de compuestos 5 α -reducidos.

En la Figura 14 se muestra que el grupo hiperprolactinémico (H) presentó un aumento significativo en la actividad específica de la enzima (Control: 0,075 \pm 0,009 vs. H: 0,224 \pm 0,027 pmol 5 α -reducidos/mg prot./min., p < 0,01), reflejando un incremento correspondiente al 198% para la formación de compuestos 5 α -reducidos/mg prot./min.. La formación de 3 α / β -Diol también aumentó significativamente en el grupo de animales hiperprolactinémicos (Control: 0,055 \pm 0,002 vs. H: 0,156 \pm 0,005 pmol 3 α Diol/mg prot./min., p<0,01) en un 183%.

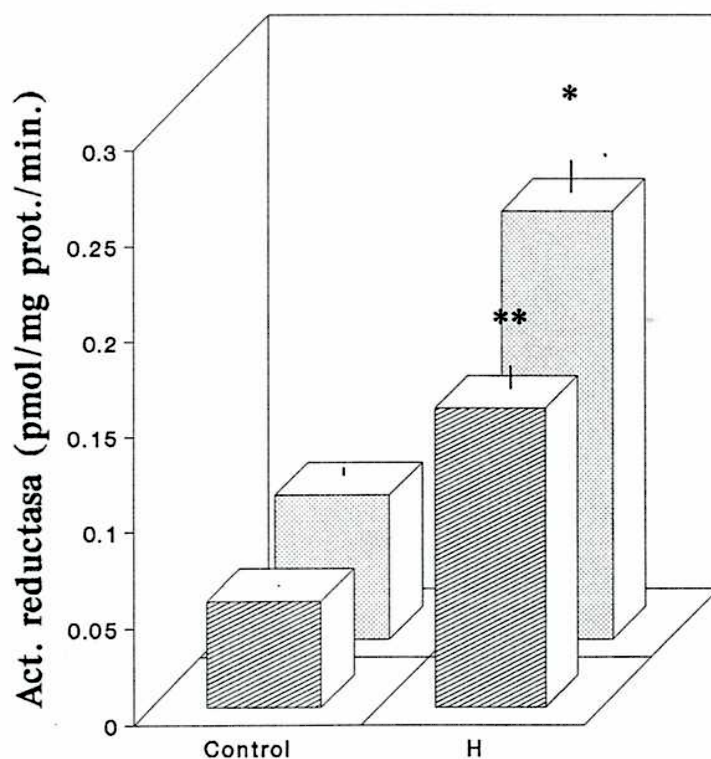


Figura 14: Efecto de la hiperprolactinemia inducida por homotransplante sobre la actividad 5 α -reductasa en microsomas testiculares.

Control: animales con operación simulada; H: animales con homotransplante.
 ▨: 3 α / β -Diol; ▩: compuestos 5 α -reducidos. Cada barra representa el valor medio \pm ES (n=3). Los asteriscos indican dato significativamente diferente del control (test de Student, *: p < 0,01; **: p < 0,001).

I. A. 2.- EFECTO LOCAL "IN VIVO" DE PRL

Inyección intratesticular de PRL y actividad 5 α -reductasa

La administración intratesticular de distintas dosis de PRL se realizó regularmente en el testículo derecho, mientras que en el contralateral se inyectó igual volumen (10 μ l) de vehículo. Al cabo de 17 horas los animales se sacrificaron, los testículos se disecaron y homogeneizaron. Alícuotas de 500 μ l fueron utilizadas para la determinación de la actividad 5 α -reductasa.

En el grupo control, que recibió vehículo en ambos testículos, no se detectaron diferencias significativas entre los mismos. Para las dosis de PRL $1,5 \cdot 10^{-5}$ y $1,5 \cdot 10^{-6}$ M no se detectaron diferencias significativas entre el testículo inyectado con la hormona y su contralateral. Sin embargo, a la dosis de PRL $1,5 \cdot 10^{-7}$ M pudo detectarse un aumento significativo en la actividad 5 α -reductasa (C: $0,082 \pm 0,05$; PRL: $1,27 \pm 0,07$ pmol/mg prot./min.; $p < 0,003$) (Figura 15).

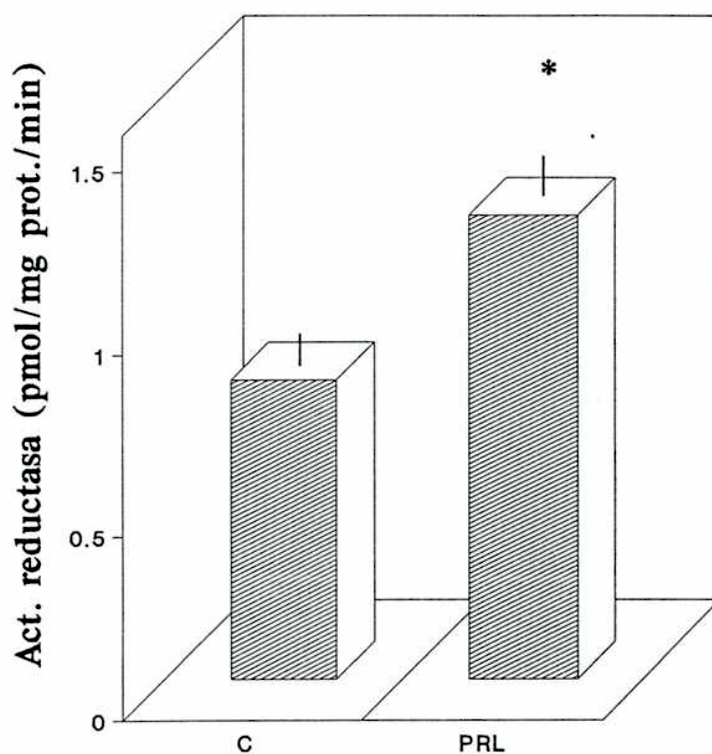


Figura 15: Efecto de la inyección intratesticular de PRL sobre la actividad 5 α -reductasa.

C: testículos inyectados con vehículo; PRL: testículos inyectados con PRL- α $1,5 \cdot 10^{-7}$ M. Cada barra representa el valor medio \pm ES (n=3). El asterisco indica dato significativamente diferente del control (test de Student apareado, *: $p < 0,003$).

I. A. 3.- ESTUDIOS EN RATAS CON TUMOR 7315a

Perfil hormonal sérico

La inoculación del Tumor 7315a en ratas de la cepa Buffalo originó un aumento significativo en los niveles séricos de PRL. Al final del experimento, la PRL plasmática resultó ser 75 veces mayor en los animales portadores del Tumor que en los animales control (Grupo Control (C): 19 ± 1 ng/ml vs Grupo Tumoral (T): 1223 ± 100 ng/ml, $p < 0,001$).

Los niveles séricos de LH luego de 35 días de inoculación, no fueron significativamente diferentes entre el grupo tumoral y el grupo control (C: 1.5 ± 0.2 ng/ml vs T: 1.1 ± 0.2 ng/ml). Sólo cuando el tumor se dejó desarrollar durante más de 40 días, se observó un descenso significativo en los niveles séricos de LH (C: 1.4 ± 0.1 ng/ml vs T: 0.7 ± 0.1 , $p < 0.001$).

El implante del tumor originó una marcada disminución en la concentración de testosterona sérica a los 35 días post-implante (C: 4.9 ± 0.4 ng/ml vs T: 2.7 ± 0.2 ng/ml, $p < 0,001$).

Efecto del implante del Tumor 7315a sobre la actividad 5 α -reductasa testicular

Se determinó la actividad específica 5 α -reductasa en homogenatos de testículos provenientes de ratas implantadas con Tumor 7315a y un grupo de animales control. No se observaron cambios significativos en esta actividad enzimática en las ratas portadoras del Tumor respecto de las ratas del grupo control (C: 0,020 \pm 0.005 vs T: 0,023 \pm 0.005 pmol compuestos 5 α -reducidos/mg prot./min.).

Efecto del implante del Tumor 7315a sobre el peso testicular

El tumor productor de PRL no ocasionó variaciones significativas en el peso testicular de las ratas portadoras del mismo respecto de los animales controles. (T: 1,13 \pm 0,13 vs C: 1,17 \pm 0,09 g/testículo).

Efecto del implante del Tumor 7315a sobre actividad ODC y niveles de poliaminas testiculares

Con el propósito de establecer una relación entre la falta de variación en el peso testicular y la brusca disminución de los

andrógenos séricos en los animales hiperprolactinémicos, se decidió determinar la actividad de la enzima ODC, ya que es un parámetro sensible y útil para evaluar el trofismo de un órgano.

La Figura 16 muestra el efecto del implante del Tumor 7315a sobre la actividad ODC testicular. Se observó un aumento significativo en la actividad específica de ODC en el grupo hiperprolactinémico respecto del grupo control (T: 102 ± 18 vs C: 72 ± 12 pmol/mg prot./min., $p < 0,01$).

Sin embargo, cuando se evaluó el contenido total de poliaminas no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (Tabla 1). De igual modo, la concentración total de poliaminas no mostró diferencias significativas (Tabla 2).

Cuando se analizó el contenido de putrescina, espermidina y espermina individualmente tampoco se halló diferencias significativas en el grupo tumoral respecto del grupo control (Tabla 3).

Asimismo, al expresar los resultados en términos de concentración (nmol/gr tejido) (Tabla 4), no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales.

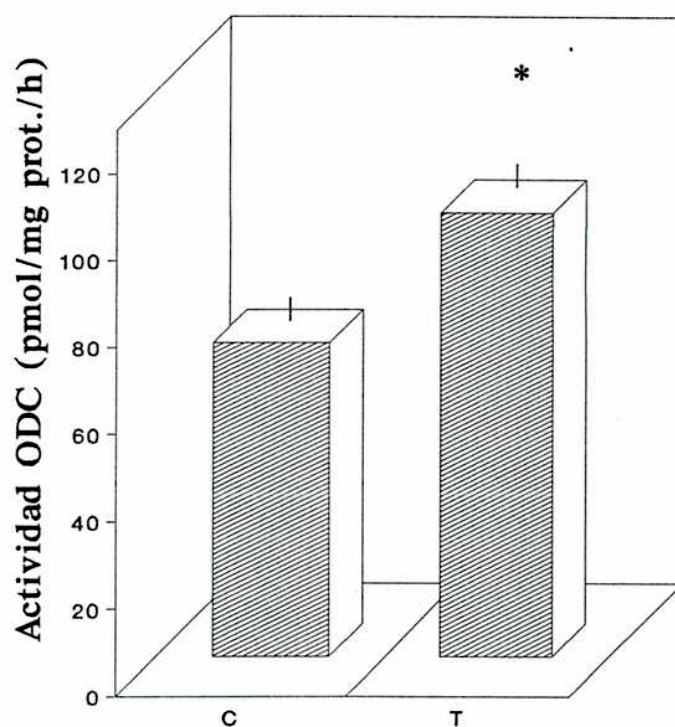


Figura 16: Efecto del implante del Tumor 7315a sobre la actividad ODC en testículos de ratas Buffalo.

C: ratas intactas; T: ratas portadoras del Tumor 7315a. Cada barra representa el valor medio \pm ES para 10 determinaciones individuales. El asterisco indica dato significativamente diferente del correspondiente control (test de Student, *: $p < 0,01$).

Poliaminas totales nmol/testículo	
Ratas Tumorales	718,9 ± 11,0
Ratas Control	695,8 ± 15,5

Tabla 1: Efecto de la PRL sobre el contenido de poliaminas totales en testículos de ratas portadoras del Tumor 7315a.

Ratas Control: ratas intactas; Ratas Tumorales: ratas portadoras del Tumor 7315a. Cada valor representa el valor medio ± ES para 10 determinaciones individuales.

	Poliaminas totales nmol/g tej.
Ratas Tumorales	637,8 ± 10,7
Ratas Control	596,1 ± 23,0

Tabla 2: Efecto de la PRL sobre la concentración de poliaminas totales en testículos de ratas portadoras del Tumor 7315a.

Ratas Control: ratas intactas; Ratas Tumorales: ratas portadoras del Tumor 7315a. Cada valor representa el valor medio ± ES para 10 determinaciones individuales.

	Putrescina nmol/test.	Espermidina nmol/test.	Espermina nmol/test.
Ratas Tumor.	103,0±6,8	193,1±12,3	507,6±33,2
Ratas Control	90,7±4,6	183,3±5,1	431,6±13,1

Tabla 3: Efecto de la PRL sobre el contenido de putrescina, espermidina y espermina en testículos de ratas portadoras del Tumor 7315a.

Ratas Control: ratas intactas; Ratas Tumor.: ratas portadoras del Tumor 7315a. Cada valor representa el valor medio ± ES para 10 determinaciones individuales.

	Putrescina nmol/gr tej.	Espermidina nmol/gr tej.	Espermina nmol/gr tej.
Ratas Tumor.	83,31±1,64	159,58±3,00	408,40±8,45
Ratas Control	76,64±2,20	155,65±2,71	369,10±7,56

Tabla 4: Efecto de la PRL sobre la concentración de putrescina, espermidina y espermina en testículos de ratas portadoras del Tumor 7315a.

Ratas Control: ratas intactas; Ratas Tumor.: ratas portadoras del Tumor 7315a. Cada valor representa el valor medio ± ES para 10 determinaciones individuales.

I. B.- ESTUDIOS "IN VITRO"**I. B. 1- Efecto "in vitro" de PRL sobre el metabolismo de andrógenos****Incubación de testículo entero con PRL**

Se realizaron una serie de estudios "in vitro" para evaluar la acción directa de la PRL sobre las gonadas. Testículos decapsulados provenientes de ratas prepúberes se incubaron con distintas dosis de PRL. Al final del período de incubación, los testículos fueron colagenizados y se determinó la actividad 5α -reductásica, tanto en la fracción de túbulos seminíferos como en la suspensión de células intersticiales. En la Figura 17 puede observarse un aumento significativo de la actividad específica de la enzima en la fracción correspondiente a los túbulos seminíferos para la concentración de PRL-o 50 nM. Sin embargo, no se detectaron cambios significativos en la actividad 5α -reductasa de la suspensión de células intersticiales (Figura 18) en las distintas concentraciones utilizadas.

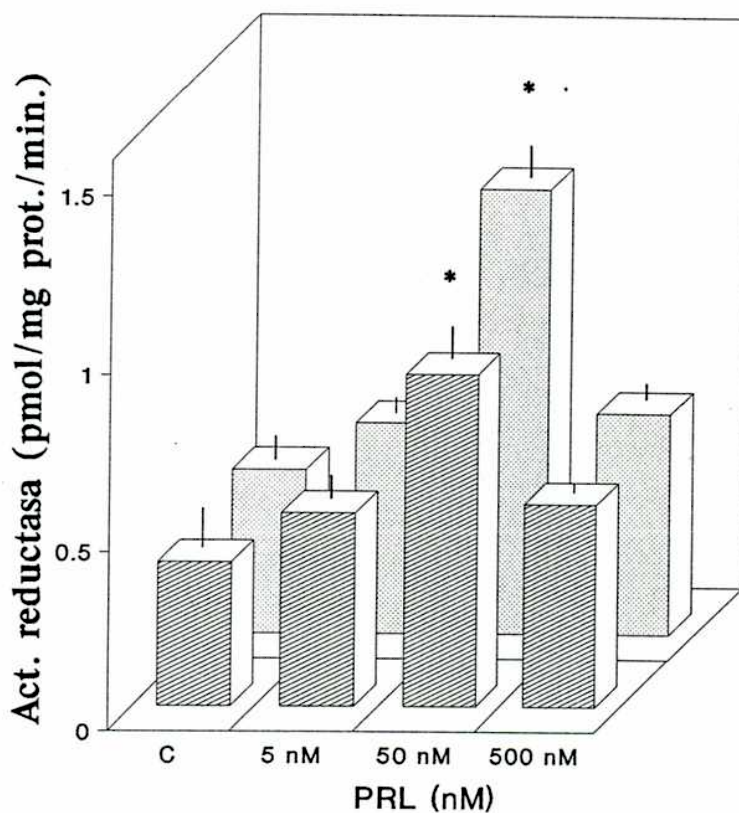


Figura 17: Efecto "in vitro" de PRL sobre testículo. Actividad 5α-reductasa en túbulos seminíferos.

▨ : 3α/β-Diol; ▤ : compuestos 5α-reducidos. Cada barra representa el valor medio ± ES (n=2) de un experimento representativo. El asterisco indica valor significativamente diferente del respectivo control (test de Dunnet, *: p < 0,05).

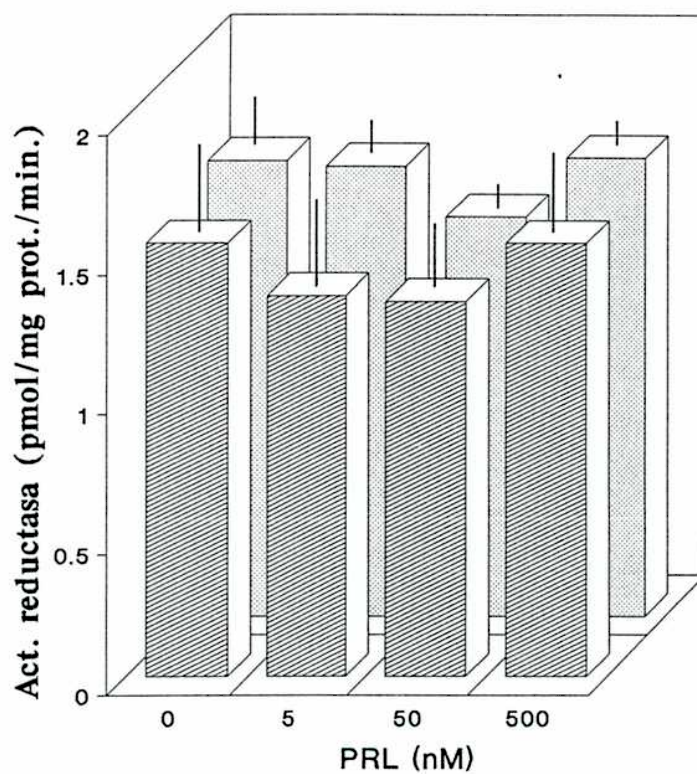


Figura 18: Efecto "in vitro" de PRL sobre testículo. Actividad 5α-reductas en células intersticiales.

▨ 3α/β-Diol; ▤ : compuestos 5α-reducidos. Cada barra representa el valor medio ± ES (n=2) de un experimento representativo.

Para verificar que la modificación en la actividad enzimática detectada era debido al efecto de la PRL, homogenatos de testículos de ratas inmaduras se incubaron con PRL-o 5 a 500 nM, durante 90 min a 34°C en una atmósfera de carbógeno y se determinó luego la actividad 5 α -reductasa. No se hallaron diferencias en la actividad específica de la enzima, respecto del control, en las concentraciones de PRL utilizadas (Figura 19).

Incubación de PRL-o con fracciones testiculares aisladas

Se estudió el efecto "in vitro" de PRL (50 nM) sobre la actividad 5 α -reductasa en túbulos seminíferos y células intersticiales previamente aisladas. Paralelamente se realizaron incubaciones control con fracciones provenientes de la misma colagenización. Luego de esta incubación, los túbulos y células se lavaron convenientemente y se homogeneizaron en Buffer R. En estos homogenatos se determinó la actividad 5 α -reductasa. Como se muestra en la Figura 20a no se detectaron diferencias significativas en la actividad enzimática en los túbulos seminíferos, así como tampoco en la preparación de células intersticiales (Figura 20b).

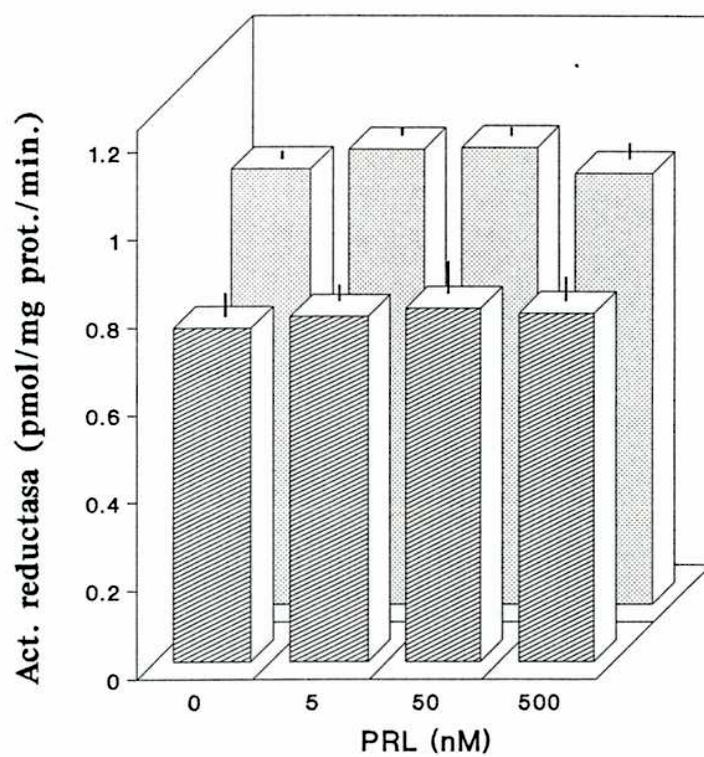


Figura 19: Efecto "in vitro" de PRL sobre actividad 5 α -reductasa en homogenato de testículo.

▨ : 3 α / β -Diol; ▤ : compuestos 5 α -reducidos. Cada barra representa el valor medio \pm ES (n=2) de un experimento representativo.

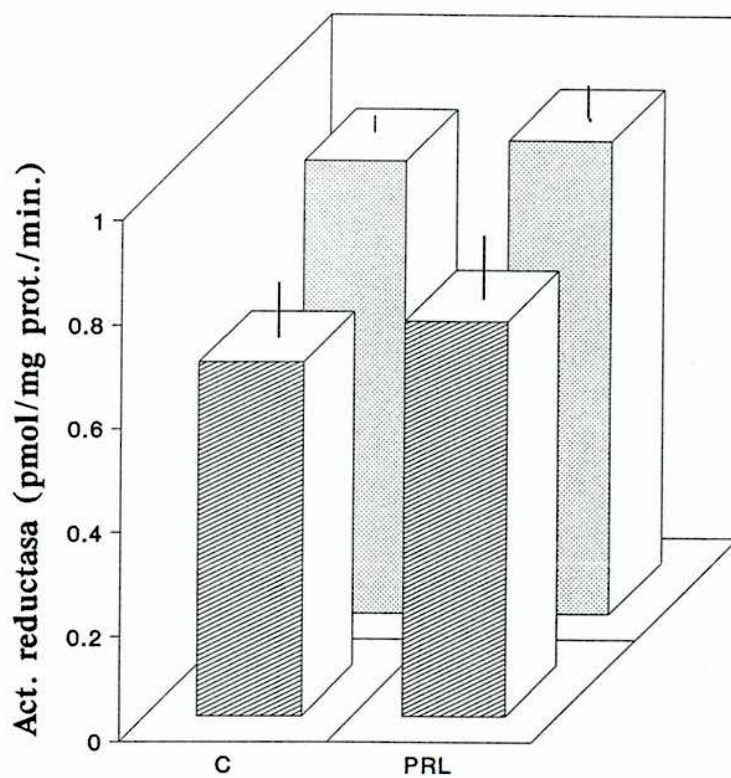


Figura 20a: Efecto "in vitro" de PRL sobre actividad 5 α -reductasa en túbulo seminíferos.

▨ : 3 α / β -Diol; ▤ : compuestos 5 α -reducidos. Cada barra representa el valor medio \pm ES (n=2) de un experimento representativo.

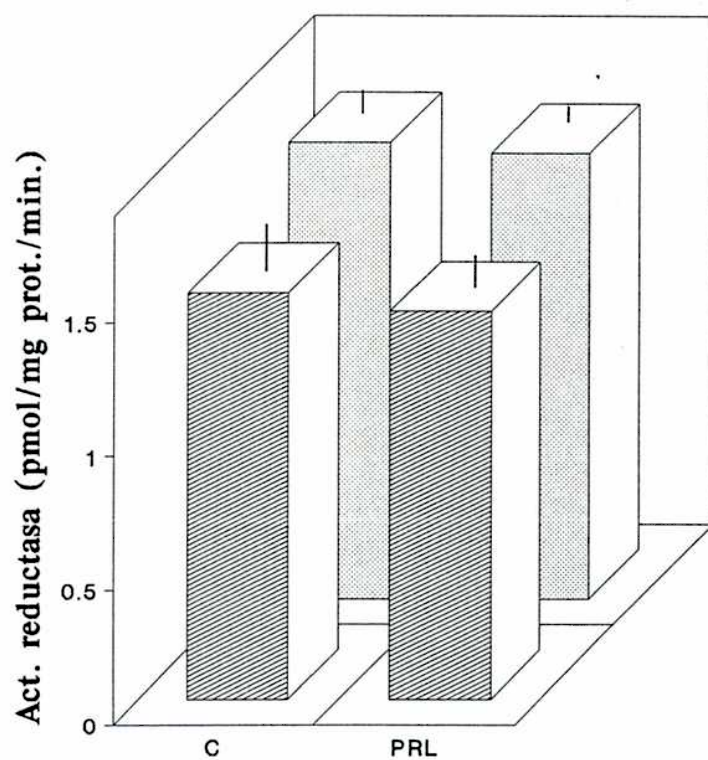


Figura 20b: Efecto "in vitro" de PRL sobre actividad 5α-reductasa en suspensiones de células intersticiales.

▨ : 3α/β-Diol; ▩ : compuestos 5α-reducidos. Cada barra representa el valor medio ± ES (n=2) de un experimento representativo.

I. B. 2.- Efecto de PRL-o en cultivos primarios de células de Leydig

Para poder analizar el efecto "in vitro" de la PRL sobre las células de Leydig durante un tiempo prolongado, fue necesario desarrollar un sistema de cultivo primario de estas células, que mantuviera su viabilidad y funcionalidad, es decir, su respuesta al estímulo con hCG.

Morfología de los cultivos

Se preparó una suspensión de células intersticiales provenientes de ratas de 30 días de vida, las cuales fueron cultivadas en un Medio químicamente definido, sin suero y con el agregado de cofactores y antibióticos, según se describió en Métodos. Las células intersticiales rápidamente se adhirieron a la superficie de cultivo y gradualmente fueron adquiriendo una apariencia fibroblástica. Las células germinales y los glóbulos rojos no se adhirieron a la placa de cultivo y fueron eliminados en los sucesivos cambios de Medio. A las 24 horas de cultivo, pudo observarse una monocapa confluyente de células fusiformes.

A las 0, 24 y 48 horas de cultivo, las células de Leydig se evaluaron por su actividad de la enzima 3 β -ol-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HDH) a través de la tinción histoquímica específica.

En la Figura 21 se muestra una Fotografía de la monocapa, donde se observan células con prolongaciones citoplasmáticas 3β -HDH positivas y es posible apreciar, claramente, la formación de gránulos de azul de formazan en su citoplasma. Paralelamente se desarrolló un blanco de reacción para la tinción, es decir sin el agregado de sustrato y no se detectó la formación de dichos depósitos.

Cuando se evaluó la viabilidad celular utilizando la tinción con azul tripan de las células en cultivo, se observó que las células teñidas, es decir las no viables, exhibían un aspecto redondeado completamente distinto del aspecto fusiforme observado en las células de Leydig. Estas células teñidas están apoyadas sobre la monocapa confluyente de células fusiformes.

La proporción de células 3β -HDH positivas en una suspensión de células intersticiales alcanzan un 20%. Cuando la tinción histoquímica característica de las células de Leydig, se realizó en las células cosechadas mediante medios mecánicos luego de 48 horas de cultivo, esta proporción aumento a un 60%.

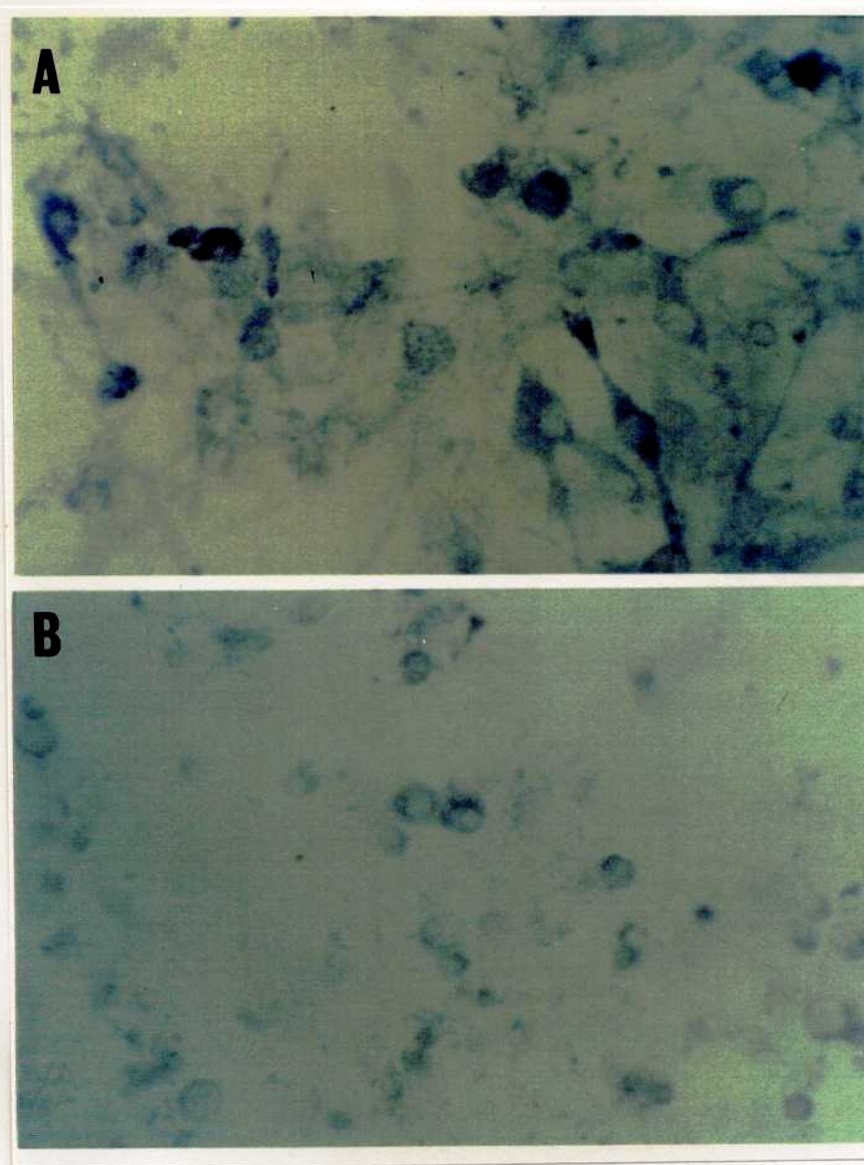


Figura 21: Microfotografía de las células de Leydig en cultivo primario.

Luego de 2 días de cultivo, las células se incubaron con NAD y azul de tetrazolium en presencia (A) o ausencia (B) de dehidroisoandrosterona para la localización de 3 β -HDH. Aumento 400 X.

Producción basal de andrógenos de las células intersticiales en cultivo

La producción basal de andrógenos por parte de las células intersticiales durante el primer y segundo día de cultivo se muestra en la la Figura 22. Los cultivos de células intersticiales produjeron cantidad mayor de 3α -Diol durante el segundo día de cultivo ($5,14\pm 0,23$ vs. $3,74\pm 0,05$ ng/ug ADN, $p<0,001$). También se observó un aumento en la producción de T+DHT ($0,40\pm 0,02$ vs $0,34\pm 0,01$ ng/ug ADN, $p<0,001$).

Respuesta esteroidogénica de las células intersticiales en cultivo

La producción de 3α -Diol luego de un estímulo máximo con hCG durante 2 horas a las 0 (pre-cultivo), 24 y 48 horas de cultivo se muestra en la Tabla 5. Así, puede observarse que la capacidad esteroidogénica y la respuesta a la hCG están preservadas.

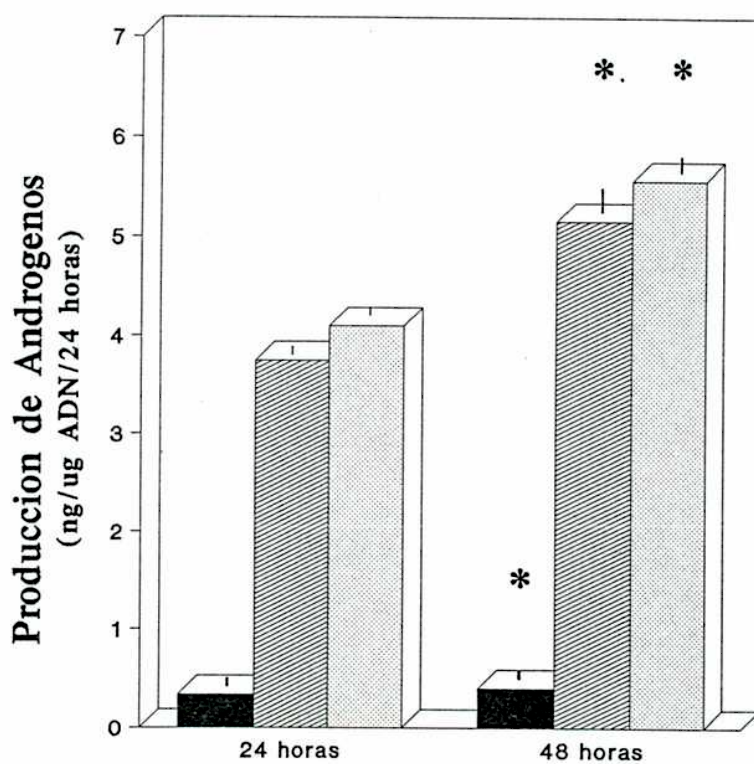


Figura 22: Producción basal de andrógenos por células intersticiales en cultivo.

■ : T+DHT; ▨ : 3α-Diol; ▩ : T+DHT+3α-Diol. Cada barra representa el valor medio ± ES (n=4). El asterisco indica diferencia significativa entre 24 vs 48 horas (test de Student, *: p < 0,001).

Días de Cultivo	Producción 3 α -Diol ng/ μ g ADN/3h		
	Basal (B)	Estimulado (E)	Relación E/B
0	1,41 \pm 0,05	5,32 \pm 0,08	3,8
1	0,45 \pm 0,04	0,95 \pm 0,03	2,1
2	0,48 \pm 0,03	0,91 \pm 0,03	1,9

Tabla 5: Respuesta esteroidogénica de las células intersticiales en cultivo.

Luego de 21 ó 45 horas de cultivo se cambió el Medio y agregó Medio fresco con MIX, con y sin hCG (200 mUI/ml), por un período de 3 horas. Se colectó el Medio y utilizó para la determinación de 3 α -Diol por RIA como se describe en Métodos. Los valores corresponden a la media \pm ES de triplicados de celdas de un experimento representativo. La relación E/B varía de 2 a 7 entre los distintos experimentos.

Curva dosis-respuesta a hCG

Se evaluó la respuesta a distintas dosis de hCG (0,5 - 500 mUI/ml) durante las 3 últimas horas de cultivo y determinó la producción de andrógenos en dicho lapso. La curva (Figura 23) muestra un $DE_{50} = 2,5$ mUI/ml.

Producción de AMPc en células intersticiales en cultivo

En los experimentos en cultivo que fueron recientemente descritos, se estudió también la producción de AMPc basal y luego del estímulo con dosis crecientes de gonadotrofinas. La Figura 24 muestra estos resultados. La curva presenta un $DE_{50} = 0,95$ mUI/ml.

Efecto agudo de la PRL sobre la producción basal de 3α -Diol.

El efecto agudo de PRL sobre las células intersticiales en cultivo se evaluó por el agregado de dosis crecientes de la hormona (10, 100 y 1000 ng/ml) en las últimas 3 horas de cultivo. Los resultados se muestran en la Figura 25. Como puede observarse la PRL no causó efecto estimulador sobre la producción de 3α -Diol, a las dosis de 10 y 100 ng/ml. Sin embargo, la adición al Medio de cultivo

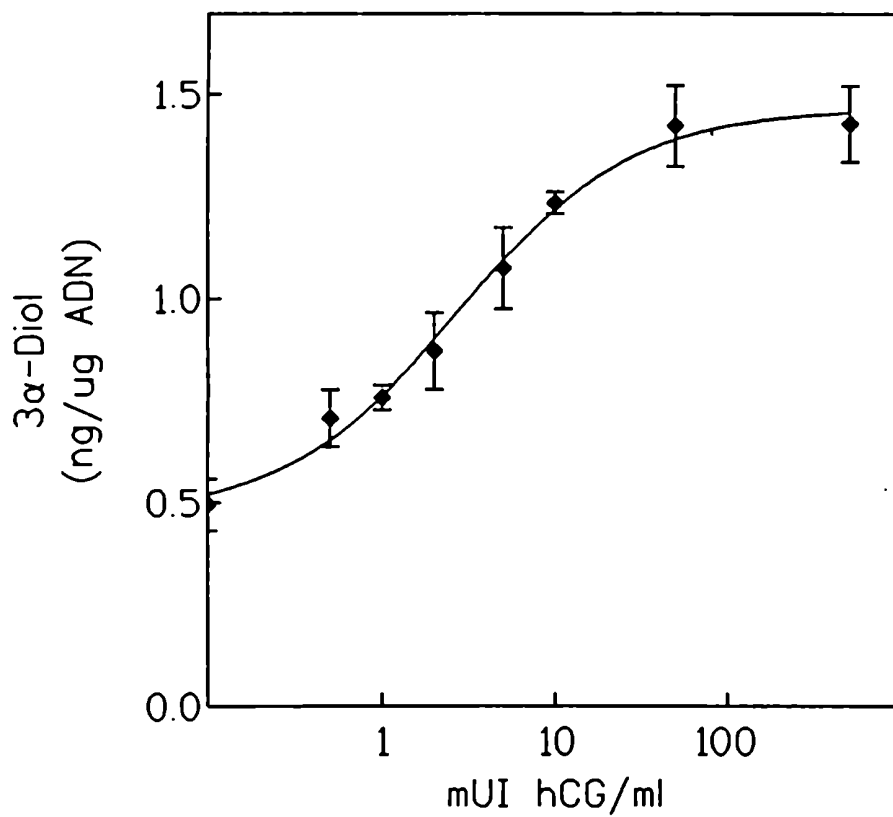


Figura 23: Producción de 3α-Diol en respuesta a dosis crecientes de hCG por células de Leydig en cultivo primario.

Cada punto representa el valor medio \pm ES (n=3) de un experimento representativo.

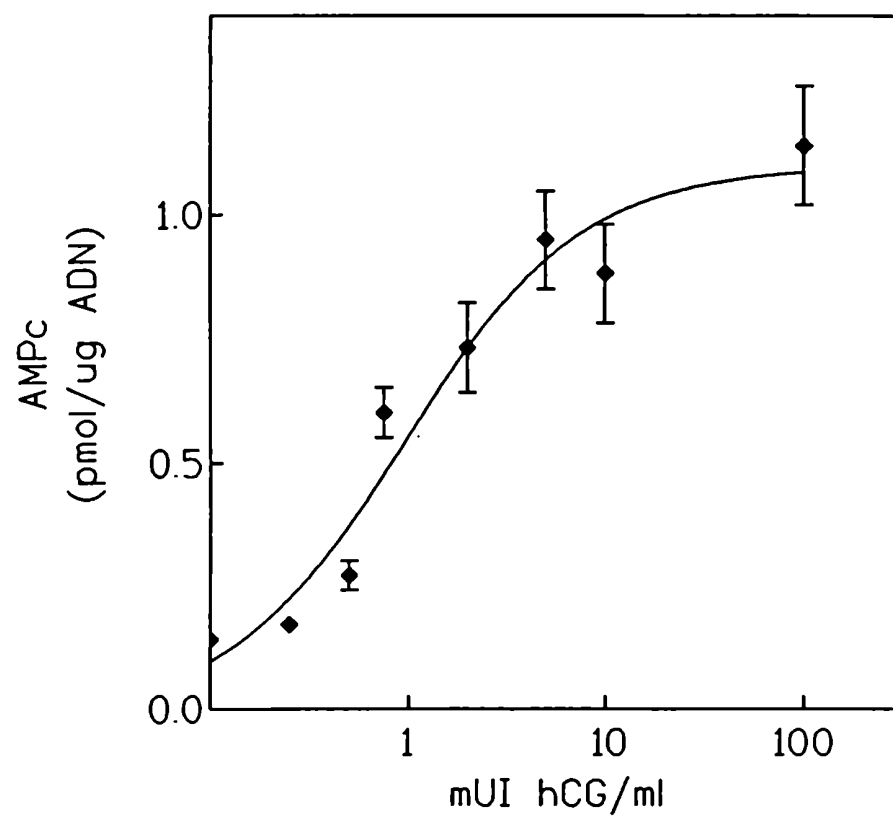


Figura 24: Producción de AMPc en respuesta a dosis crecientes de hCG por células de Leydig en cultivo primario.

Cada punto representa el valor medio \pm ES (n=3) de un experimento representativo.

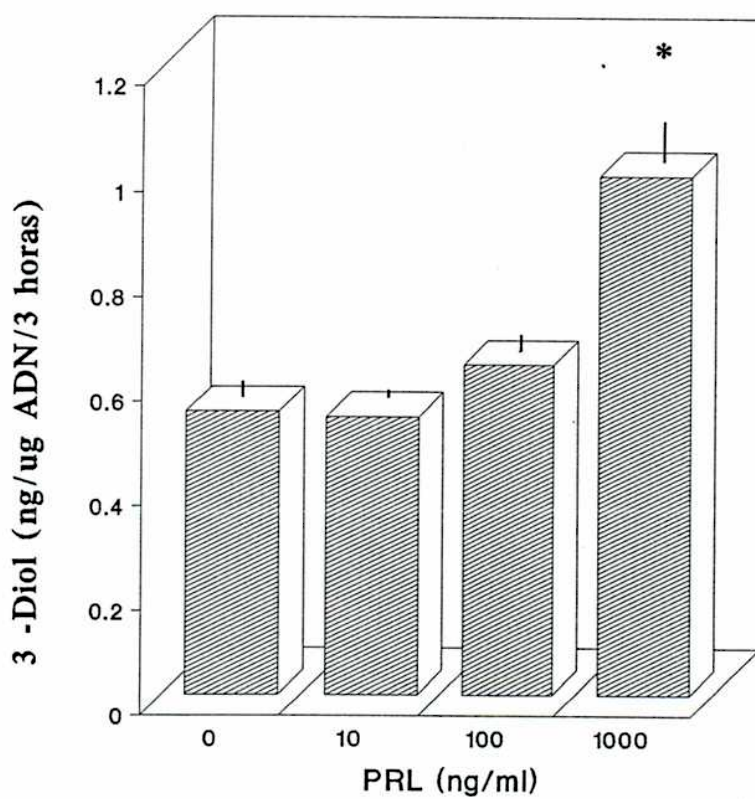


Figura 25: Efecto agudo de la PRL sobre la producción basal de 3 α -Diol por células de Leydig en cultivo.

Cada barra representa el valor medio \pm ES (n=3) de un experimento representativo. El asterisco indica dato significativamente diferente (test de Dunnett, *: p < 0,05).

de PRL a la dosis de 1000 ng/ml, estimuló significativamente la producción de este andrógeno reducido ($0,99 \pm 0,12$ vs. $0,54 \pm 0,05$ ng/ug ADN/ 3h $p < 0,001$). Esta respuesta a la PRL no fue aditiva con respecto a la obtenida con hCG (Tabla 6).

Efecto prolongado de PRL sobre la producción de 3α -Diol

Para evaluar el efecto de la PRL sobre las células en cultivo durante períodos prolongados, se decidió utilizar una concentración mínima de hormona (10 ng/ml), por cuanto esta dosis no modifica la producción basal en forma "aguda". Se realizaron 3 pulsos de PRL, a las 0, 24 y 48 horas de cultivo y se cuantificó la producción basal y ante el estímulo máximo con 200 mUI/ml hCG. y se lo comparó con un cultivo paralelo que no recibió la hormona. En este sistema se detectó una disminución significativa en la producción basal de 3α -Diol, mientras que se conserva sin diferencias la respuesta máxima a la hCG (Tabla 7).

También fue determinada la producción de T+DHT y se calculó la relación T+DHT/ 3α -Diol observándose un profundo cambio en dicha relación tanto en condiciones basales (Control: 0,09 vs PRL: 0,38) como ante el estímulo máximo con hCG (Control: 0,04 vs PRL: 0,54).

3 α -Diol ng/ μ g ADN/3 horas	
Basal	0,45 \pm 0,03
PRL (1000 ng/ml)	0,99 \pm 0,06
hCG (200 mUI/ml)	0,91 \pm 0,02
hCG (200 mUI/ml) + PRL (1000 ng/ml)	1,02 \pm 0,07

Tabla 6: Efecto agudo de la PRL sobre la producción de 3 α -Diol.

Luego de 45 horas de cultivo, se cambió el Medio y agregó Medio fresco con MIX y PRL ó hCG por un período adicional de 3 horas. El Medio fue colectado y utilizado para la determinación de 3 α -Diol por RIA como se describe en Métodos. Los valores representan la media \pm ES de cuadruplicados de celdas de un experimento representativo.

	3 α -Diol ng/ μ g ADN/3horas	
	Basal	Estimulado
Control	0,49 \pm 0,04	0,85 \pm 0,05
PRL (10 ng/ml)	0,32 \pm 0,04*	0,82 \pm 0,04

Tabla 7: Efecto prolongado de PRL sobre la producción de 3 α -Diol.

Células de Leydig fueron cultivadas con PRL (10 ng/ml) durante 45 horas. Luego se cambió el Medio y agregó Medio fresco con o sin hCG (200 mUI/ml). A las 3 horas de incubación, se colectó el Medio y utilizó para la determinación de 3 α -Diol por RIA como se describe en Métodos. Los valores representan la media \pm ES de cuadruplicados de celdas de un experimento representativo.

* (p , 0,005).

Actividad 5 α -reductasa y 3 α / β -hidroxiesteroide óxidoreductasa en células de Leydig en cultivo

En iguales condiciones de cultivo que en el experimento anterior, se determinaron las actividades específicas de 5 α -reductasa y 3 α / β -HOR en homogenatos de células cosechadas por medios mecánicos. No se observaron cambios en la actividad de la enzima 5 α -reductasa mientras que la 3 α / β -HOR mostró una actividad significativamente menor en los cultivos tratados con PRL (Control: 11,81 \pm 0,33 vs. PRL: 7,60 \pm 0,26 pmol/mg prot./min, p < 0,001) (Figura 26).

Incorporación de ^3H -uridina en células de Leydig en cultivo

En algunos tejidos se ha descrito que la PRL podría ejercer cierto efecto trófico directo. Este hecho se evidencia a través de la síntesis proteica. Por esta razón resultó de interés analizar si dosis pequeñas de PRL durante períodos prolongados, serían capaces de modificar la incorporación de uridina tritiada a ARN. Para ello, células de Leydig en cultivo primario, recibieron 3 pulsos de PRL a las 0, 21 y 26 horas de cultivo y luego se determinó la incorporación del compuesto marcado durante 2 horas.

En la Figura 27 se observa que las dosis correspondientes a 5 y 10 ng/ml inducen un aumento significativo en la incorporación de ^3H -uridina a ARN (212 y 165 % respectivamente).

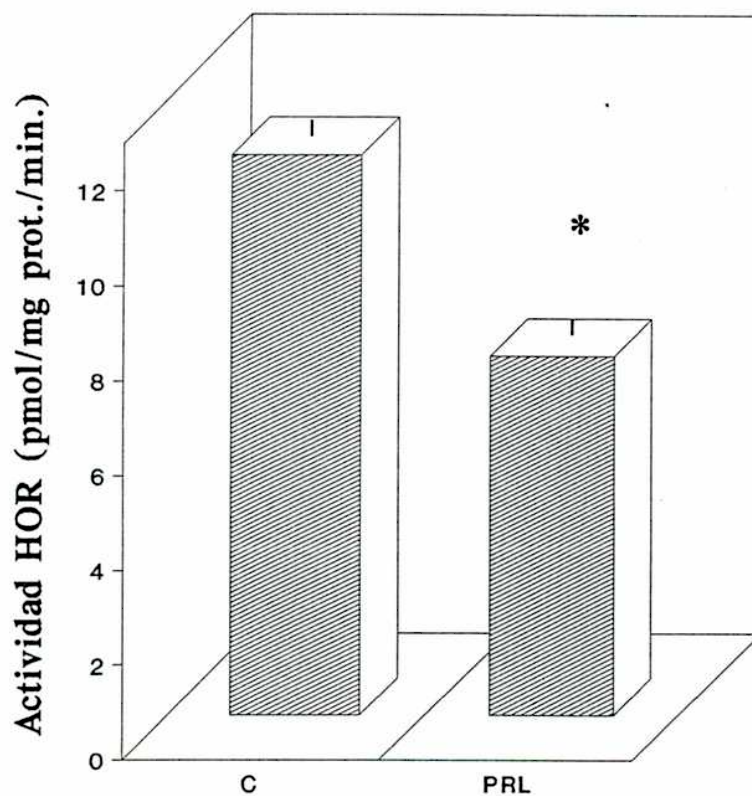


Figura 26: Efecto de la PRL sobre la actividad 3α/β-hidroxiesteroide oxidoreductasa en células de Leydig en cultivo.

C: cultivos controles; PRL: cultivos tratados con PRL. Cada barra representa el valor medio ± ES (n=3) de un experimento representativo. El asterisco indica dato significativamente diferente respecto del control (test de Student, *: $p < 0,001$).

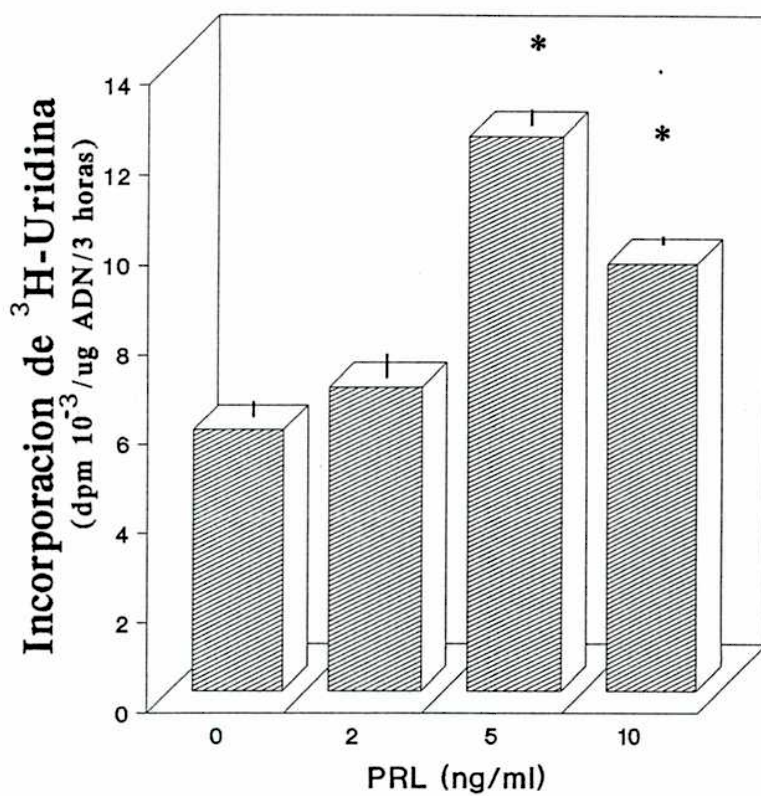


Figura 27: Efecto de la PRL sobre la incorporación de ³H-uridina a ARN.

Cada barra representa el valor medio ± ES (n=3) de un experimento representativo. El asterisco indica dato significativamente diferente (test de Dunnett, *: p < 0,05).

II.-EFECTO DE LA PRL SOBRE LAS VESICULAS SEMINALES

II. 1.- ESTUDIOS EN RATAS DE LA CEPA BUFFALO PORTADORAS DEL TUMOR 7315a

Niveles hormonales séricos

El perfil sérico de los animales implantados con Tumor 7315a y de los animales control, fue detallado anteriormente en la Sección I.A.3 (página 98).

Efecto del Tumor 7315a sobre el peso de las vesículas seminales

Como puede apreciarse en la Figura 28, luego de 35 días de implante del Tumor 7315a, no se observó modificación en el peso de las vesículas seminales con respecto al grupo control.

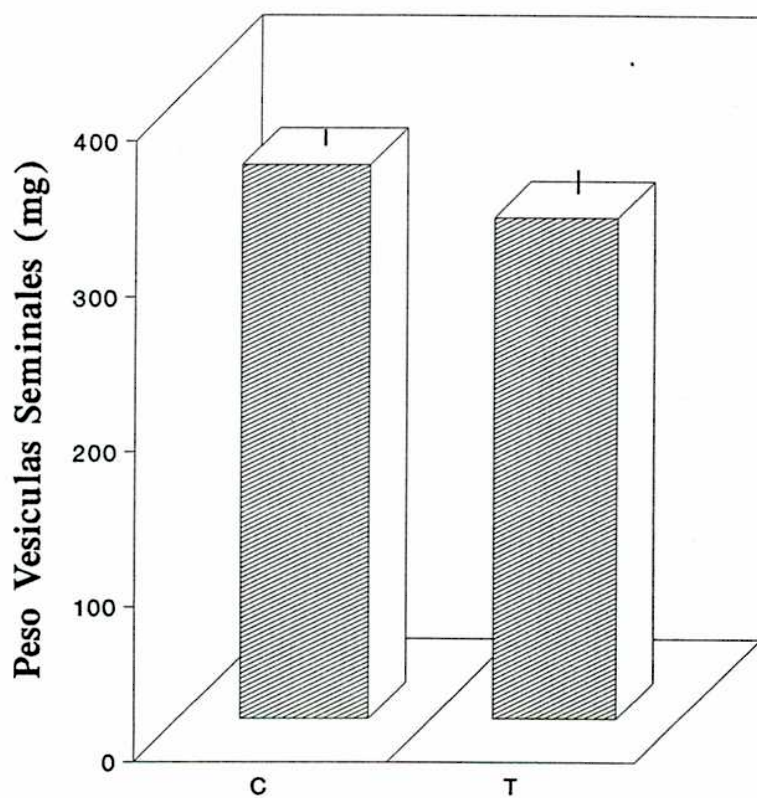


Figura 28: Efecto del implante del Tumor 7315a sobre el peso de las vesículas seminales.

C: animales intactos; T: animales implantados con el Tumor 7315a. Cada barra representa el valor medio \pm ES para 9 determinaciones individuales.

Efecto del Tumor 7315a sobre la actividad de ornitina decarboxilasa en vesículas seminales e hígado

En las vesículas seminales de las ratas portadoras del Tumor, pudo detectarse un incremento significativo en la actividad ODC. Este efecto se observó tanto al expresar la actividad enzimática en pmol/h/mg prot (Figura 29a), pmol/h/órgano (Figura 29b) ó pmol/h/mg tejido.

En hígado, la hiperprolactinemia inducida por el Tumor, originó una caída significativa en la actividad específica de la enzima ODC con respecto al grupo control (Figura 30).

Efecto del Tumor 7315a sobre los niveles de poliaminas en vesículas seminales

El contenido total de poliaminas y la concentración tisular de las mismas en las vesículas seminales de las ratas portadoras del Tumor durante 35 días y en el grupo control, se muestran en la Tabla 8. Como puede observarse, no se evidenciaron variaciones estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales.

Al analizar los niveles individuales de putrescina, espermidina y espermina, se observó que estos dos últimos compuestos son los presentes en mayor proporción en este tejido, mientras que la

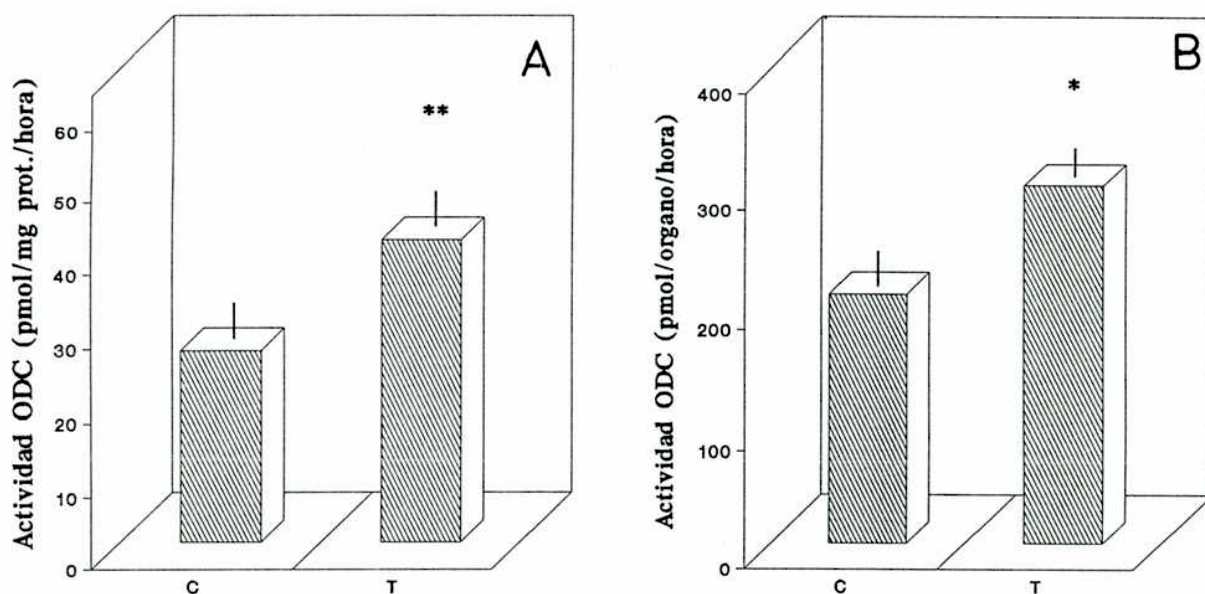


Figura 29: Efecto del Tumor 7315a sobre la actividad ornitina decarboxilasa en vesículas seminales.

Panel A: Actividad específica de ODC (pmoles de $^{14}\text{CO}_2$ /mg proteína/hora).

Panel B: Actividad total de ODC (pmoles de $^{14}\text{CO}_2$ /órgano/hora).

C: ratas intactas; T: ratas portadoras del Tumor 7315a. Cada barra representa el valor medio \pm ES para 9 determinaciones individuales. Los asteriscos indican datos significativamente diferentes del control (test de Student, *: $p < 0,025$; **: $p < 0,01$).

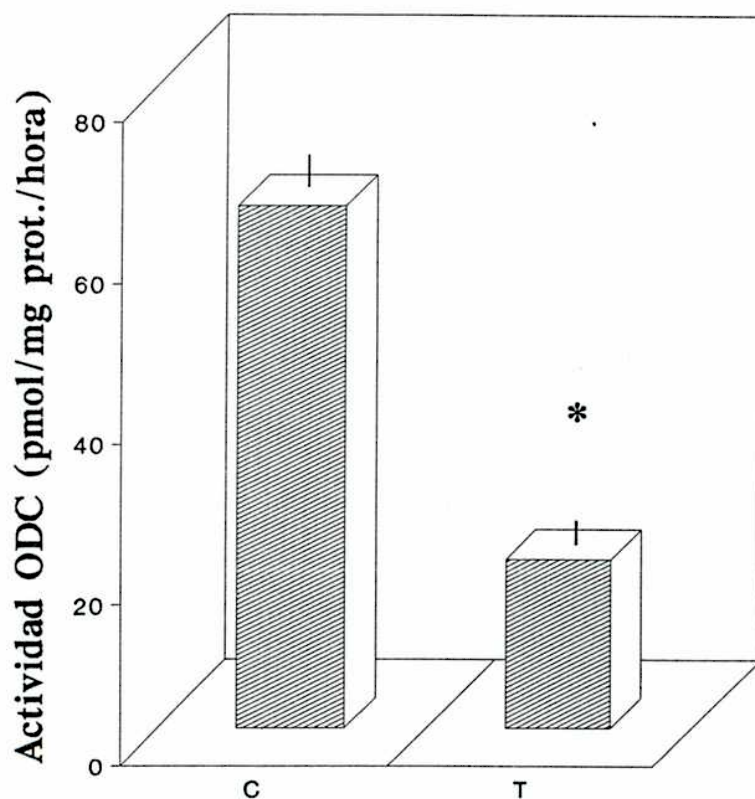


Figura 30: Efecto del implante del Tumor 7315a sobre la actividad ornitina decarboxilasa en hígado.

C: ratas intactas; T: ratas portadoras del Tumor 7315a. Cada barra representa el valor medio \pm ES para 5 determinaciones individuales. El asterisco indica dato significativamente diferente entre los grupos (test de Student, *: $p < 0,0005$).

Tratamiento	Poliaminas totales	
	nmoles/órgano	nmoles/gr tejido
Ratas Tumorales	151,8 ± 10,8	928 ± 56
Ratas Control	181,6 ± 21,6	1086 ± 1

Tabla 8: Efecto de la PRL sobre los niveles de poliaminas totales en vesículas seminales de ratas implantadas con el Tumor 7315a.

Ratas Tumorales: ratas portadoras del Tumor 7315a; Ratas Control: Ratas intactas. Cada valor representa el valor medio ± ES para 6 determinaciones individuales.

putrescina se encuentra en menor cantidad (Tabla 9). Las concentraciones tisulares de las poliaminas analizadas no presentaron diferencias significativas (Tabla 9).

El contenido de putrescina, espermidina y espermina en las vesículas seminales de los animales tumorales, no fue significativamente diferente respecto al grupo control (Tabla 10).

Tratamiento	Poliaminas (nmoles/órgano)		
	Putrescina	Espermidina	Espermina
Ratas Tumorales	14,69±2,35	67,01±5,57	70,07±4,79
Ratas Control	22,70±7,44	84,61±13,80	74,56±6,29

Tabla 9: Efecto de la PRL sobre el contenido de putrescina, espermidina y espermina en vesículas seminales de ratas portadoras del Tumor 7315a.

Ratas Tumorales: ratas portadoras del Tumor 7315a; Ratas Control: ratas intactas. Cada valor representa el valor medio ± ES para 6 determinaciones individuales.

Tratamiento	Poliaminas (nmoles/gr tejido)		
	Putrescina	Espermidina	Espermina
Ratas Tumorales	90±14	412±30	433±31
Ratas Control	139±47	503±94	443±52

Tabla 10: Efecto de la PRL sobre los niveles de putrescina, espermidina y espermina en vesículas seminales de ratas portadoras del Tumor 7315a.

Ratas Tumorales: ratas portadoras del Tumor 7315a; Ratas Control: ratas intactas. Cada valor representa el valor medio ± ES para 6 determinaciones individuales.

II. 2.- ESTUDIOS EN RATONES ENANOS DE LA CEPA AMES (df/df)

Perfil hormonal sérico

Los niveles séricos de PRL, FSH y testosterona correspondientes a los diferentes grupos experimentales pueden observarse en la Tabla 11. La hiperprolactinemia inducida por el transplante de dos hipófisis, en ratones genéticamente deficientes en PRL, produjo un incremento significativo en los niveles séricos de esta hormona respecto del grupo control, que presentó valores no detectables de esta hormona.

Los niveles de FSH mostraron un aumento significativo en los grupos hiperprolactinémicos respecto del grupo control, tanto en los animales intactos como en los castrados tratados con propionato de testosterona.

Con respecto a la testosterona sérica, pudo observarse un incremento estadísticamente significativo en el grupo de ratones intactos homotransplantados (Grupo 1), en comparación a su grupo control (Grupo 2). Los animales castrados y tratados con propionato de testosterona obviamente, no evidenciaron diferencias significativas en los niveles séricos de testosterona ya que ambos grupos de animales (Grupos 3 y 4) recibieron el mismo tratamiento androgénico. Por otra parte, el nivel de testosterona sérica alcanzado en los ratones que recibieron exógenamente esta hormona, es superior al de

Tratamiento	n	PRL (ng/ml)	FSH (ng/ml)	T (ng/ml)
Grupo 1	9	51,7 ± 6,4**	4,7 ± 0,4*	4,1 ± 1,7*
Grupo 2	9	ND	3,1 ± 0,4	1,8 ± 0,1
Grupo 3	8	59,2 ± 5,5**	7,9 ± 0,9*	5,4 ± 0,9
Grupo 4	12	ND	3,5 ± 0,2	5,3 ± 0,5

Tabla 11: Niveles de PRL, FSH y testosterona en ratones Ames (df/df).

Grupo 1: Homotransplantados; Grupo 2: Intactos; Grupo 3: Homotransplantados, castrados y tratados con propionato de testosterona; Grupo 4: castrados y tratados con propionato de testosterona. Cada valor representa el valor medio ± ES; n: número de animales por grupo. ND: no detectable. Los asteriscos indican datos significativamente diferentes de los correspondientes controles (test de Student, *: $p < 0,0025$; **: $p < 0,0005$).

los animales intactos con operación simulada. Es importante remarcar que el nivel de testosterona sérica inducido en los ratones homotransplantados es cercano al que se obtiene en los Grupos 3 y 4 tratados con propionato de testosterona.

Efecto de la PRL sobre el peso corporal

El implante de hipófisis bajo la cápsula renal no produjo modificaciones en el peso corporal, tanto en los grupos intactos como en los castrados y tratados con propionato de testosterona (Tabla 12).

Efecto de la PRL sobre el peso de vesículas seminales

En la Tabla 12 se muestran los valores absolutos de los pesos de la vesículas seminales en los 4 grupos experimentales. Los grupos hiperprolactinémicos presentaron valores estadísticamente superiores a los respectivos grupos control. Esta variación es más marcada entre los grupos intactos (Grupos 1 vs 2), donde el incremento detectado en el peso de los órganos fue del 85%, mientras que entre animales castrados y tratados con andrógenos, la presencia del implante sólo causó un aumento del 33% en el mismo (Grupos 3 y

Tratamiento	n	Peso corporal (g)	Peso VS	
			mg	P. Rel.
Grupo 1	9	24 ± 2	134 ± 9**	582 ± 62**
Grupo 2	9	20 ± 3	72 ± 6	393 ± 37
Grupo 3	8	23 ± 1	85 ± 6	339 ± 42
Grupo 4	12	24 ± 2	64 ± 4	256 ± 15

Tabla 12: Efecto de la PRL sobre el peso corporal y de vesículas seminales.

Grupo 1: homotransplantados; Grupo 2: intactos; Grupo 3: homotransplantados, castrados y tratados con propionato de testosterona; Grupo 4: castrados y tratados con propionato de testosterona. Cada valor representa el valor medio ± ES. n: número de animales/grupo. Los asteriscos indican datos significativamente diferentes de los correspondientes controles (test de Mann-Whitney-U a una cola, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$).
P.Rel.: peso de VS (mg)/100 gr peso corporal.

4).

El peso relativo de los órganos respecto al peso corporal, muestra un perfil similar de variación que los pesos absolutos. La hiperprolactinemia manifiesta su efecto trófico en las vesículas seminales induciendo un aumento en el peso relativo de las mismas, tanto en los Grupos intactos como castrados y tratados con propionato de testosterona (Tabla 12).

Efecto de la PRL sobre la actividad ODC en vesículas seminales.

Se estudió el efecto de la hiperprolactinemia inducida por el implante de hipófisis en ratones Ames (df/df) sobre la actividad ornitina decarboxilasa. La Figura 31a ilustra los resultados obtenidos. Niveles elevados de PRL causaron un incremento significativo en la actividad específica de ornitina decarboxilasa tanto en los animales intactos como en los castrados y tratados con propionato de testosterona. Este efecto en la actividad enzimática aún se mantiene si los resultados se expresan en pmol/h/órgano (Figura 31b) ó pmol/h/mg tejido.

El hígado es un órgano que posee receptores específicos para PRL y andrógenos. Es por este motivo que resultó de interés investigar el efecto de la PRL sobre dicho tejido y compararlo con el obtenido

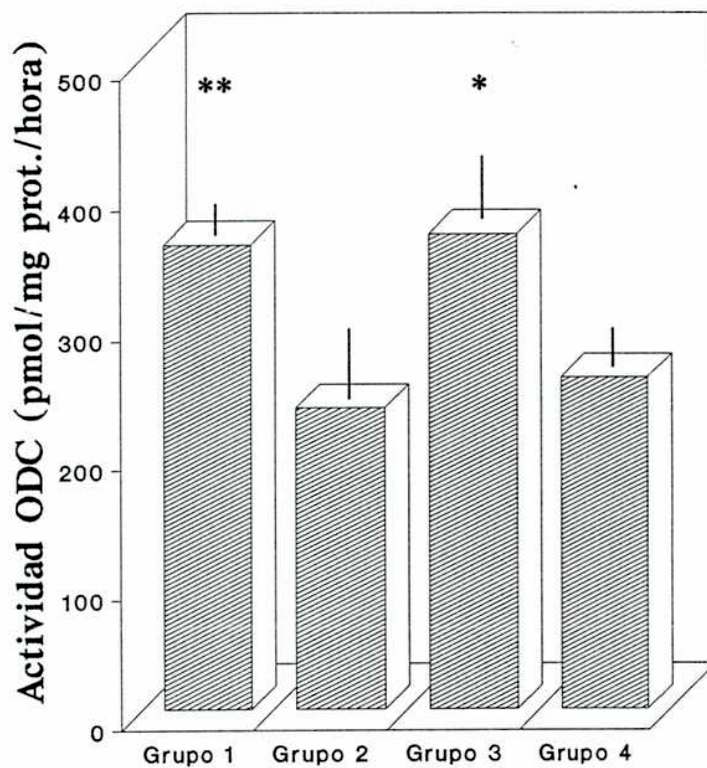


Figura 31a: Efecto de la PRL sobre la actividad ornitina decarboxilasa en vesículas seminales de ratones enanos Ames (df/df).

Actividad de ODC se expresa en pmoles de $^{14}\text{CO}_2$ /mg proteína/hora. Grupo 1: homotransplantados; Grupo 2: intactos; Grupo 3: homotransplantados, castrados y tratados con propionato de testosterona; Grupo 4: castrados y tratados con propionato de testosterona. Cada barra representa el valor medio \pm ES para 6 determinaciones individuales. Los asteriscos indican datos significativamente diferentes de los correspondientes controles (test de Student, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,025$).

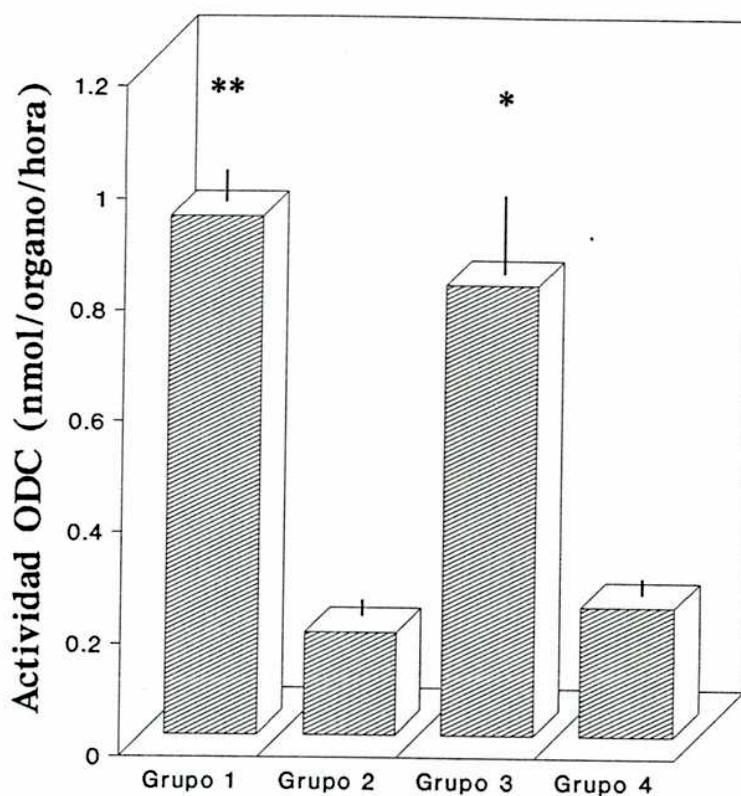


Figura 31b: Efecto de la PRL sobre la actividad ODC en vesículas seminales de ratones Ames (df/df).

La actividad de ODC se expresa en pmoles $^{14}\text{CO}_2$ /órgano/hora. Grupo 1: homotransplantados; Grupo 2: intactos; Grupo 3: homotransplantados, castrados y tratados con propionato de testosterona; Grupo 4: castrados y tratados con propionato de testosterona. Cada barra representa el valor medio \pm ES para 6 determinaciones individuales. Los asteriscos indican datos significativamente diferentes de los correspondientes controles (test de Student, *: $p < 0,0025$; **: $p < 0,0005$).

obtenido en un órgano sexual accesorio efector de ambas hormonas. La hiperprolactinemia indujo, en los ratones intactos, un ascenso significativo en la actividad específica de la ornitina decarboxilasa hepática (Grupo 1 vs Grupo 2) (Figura 32). Sin embargo, al analizar la actividad enzimática en los animales castrados y tratados con propionato de testosterona, la hiperprolactinemia no originó una diferencia significativa con respecto a su control (Grupo 3 vs Grupo 4). Iguales resultados se obtuvieron al expresar la actividad ODC en pmol/h/mg prot ó pmol/h/mg tejido.

Efecto de la PRL sobre los niveles de poliaminas en vesículas seminales

Con el propósito de estudiar si las modificaciones observadas en la actividad ornitina decarboxilasa se traducían en una variación en el contenido de poliaminas en las vesículas seminales, se determinaron los niveles de putrescina, espermidina y espermina en los distintos grupos de ratones.

Los niveles de poliaminas totales resultaron significativamente superiores en aquellos animales con implante de hipófisis respecto de sus respectivos controles. Tanto al expresar estos resultados en nmoles/órgano (Figura 33a) ó nmoles/gr de tejido (Figura 33b), las diferencias significativas persistieron.

En las Figuras 34a y b se muestran los niveles individuales de

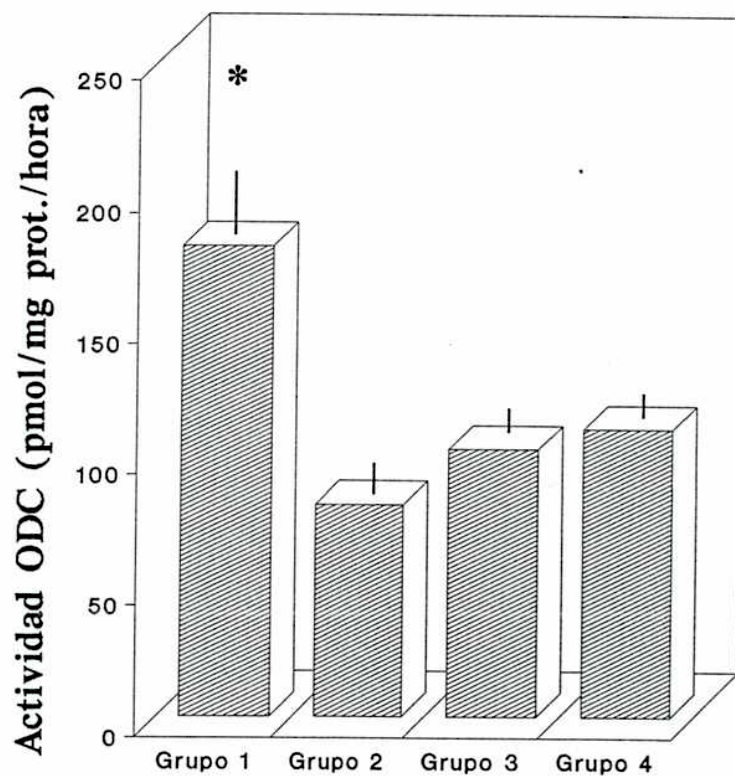


Figura 32: Efecto de la PRL sobre la actividad ornitina decarboxilasa en hígado de ratones enanos Ames (df/df).

Grupo 1: homotransplantados; Grupo 2: intactos; Grupo 3: homotransplantados, castrados y tratados con propionato de testosterona; Grupo 4: castrados y tratados con propionato de testosterona. Cada barra representa el valor medio \pm ES para 6 determinaciones individuales. El asterisco indica dato significativamente diferente del correspondiente control (test de Student, *: $p < 0,0025$).

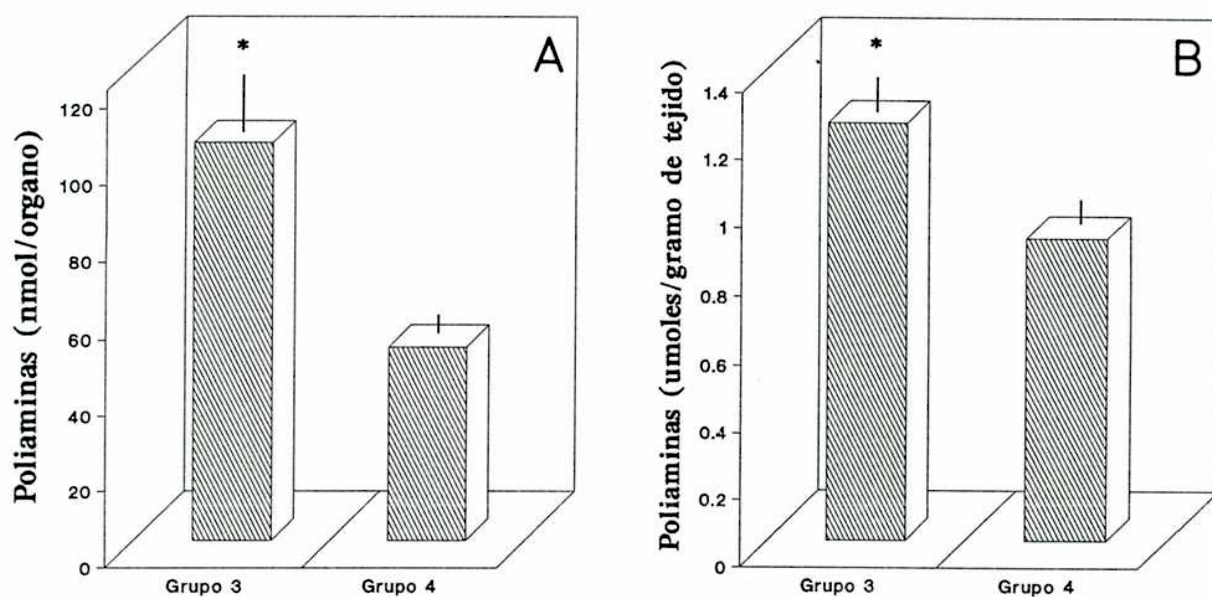


Figura 33: Efecto de la PRL sobre los niveles de poliaminas totales en vesículas seminales de ratones Ames (df/df).

Panel A: Contenido de poliaminas totales (nmoles/órgano).

Panel B: Concentración de poliaminas totales (nmoles/ gr tejido).

Grupo 3: homotransplantados, castrados y tratados con propionato de testosterona; Grupo 4: castrados y tratados con propionato de testosterona. Cada barra representa el valor medio \pm ES para 6 determinaciones individuales. Los asteriscos indican datos significativamente diferentes con respecto al control (test de Student, *: $p < 0,025$; **: $p < 0,0025$).

putrescina, espermidina y espermina. La espermidina es el polícatión presente en mayor proporción en ambos grupos de animales, seguida por putrescina y luego espermina. La hiperprolactinemia inducida por el homotransplante en los ratones Ames (df/df) causó un incremento significativo en el contenido de putrescina, espermidina y espermina, expresados en nmoles/órgano (Figura 34a). Al analizar la concentración tisular de cada poliamina, en nmoles/gr tejido, sólo la putrescina mostró un aumento significativo en las vesículas seminales de los animales homotransplantados, mientras que los niveles de espermidina y espermina no presentaron variaciones significativas (Figura 34b).

Efecto de la PRL sobre los niveles de acetilpoliaminas en vesículas seminales

Se determinaron los niveles de acetil putrescina, N¹ y N⁸ acetil espermidina y acetil espermina en vesículas seminales provenientes de ratones castrados y tratados con propionato de testosterona (Grupos 3 y 4).

La Tabla 13 muestra los niveles de acetilpoliaminas totales expresadas en nmoles/órgano y nmoles/ gr de tejido. En ambos casos, el grupo de animales transplantados presentó un nivel mayor de

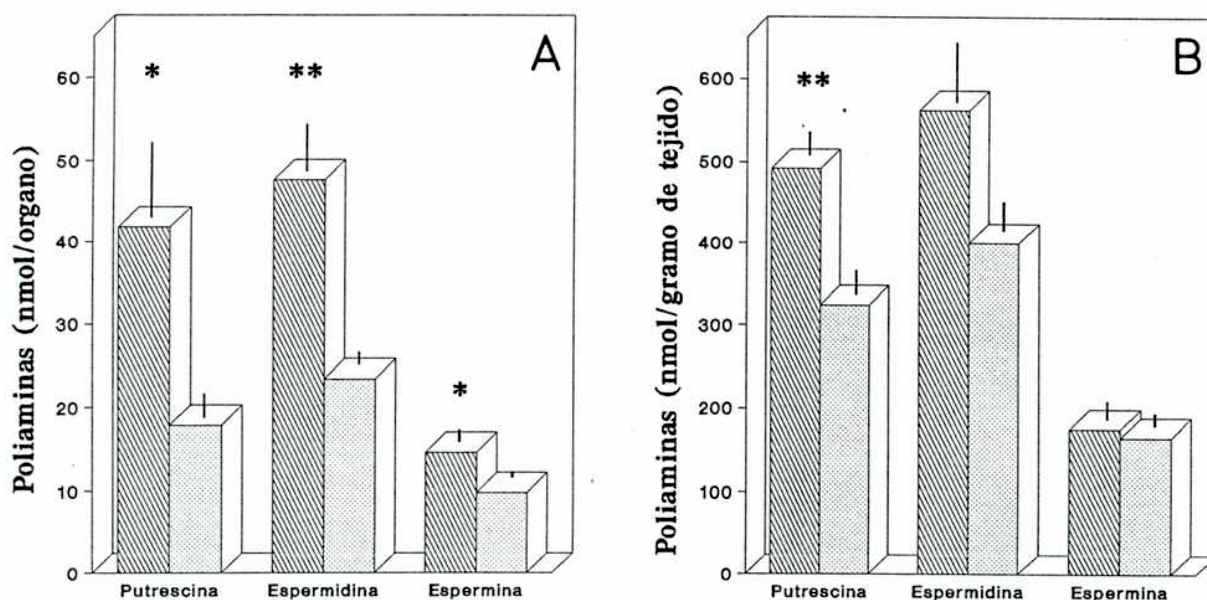


Figura 34: Efecto de la PRL sobre los niveles de putrescina, espermidina y espermina en vesículas seminales de ratones Ames (df/df).

Panel A: Contenido de putrescina, espermidina y espermina (nmoles/órgano).

Panel B: Concentración de putrescina, espermidina y espermina (nmoles/gr de tejido).

Grupo 3: homotransplantados, castrados y tratados con propionato de testosterona; Grupo 4: castrados y tratados con propionato de testosterona. Cada barra representa el valor medio \pm ES para 6 determinaciones individuales. Los asteriscos indican datos significativamente diferentes con respecto al control (test de Student, *: $p < 0,01$; **: $p < 0,0025$).

Tratamiento	Acetilpoliaminas totales	
	nmoles/órgano	nmoles/gr tejido
Grupo 3	7,10±1,35*	81,25±10,25*
Grupo 4	3,59±0,08	54,23±2,28

Tabla 13: Efecto de la PRL sobre los niveles de acetilpoliaminas totales en vesículas seminales de ratones enanos Ames (df/df).

Grupo 3: homotransplantados, castrados y tratados con propionato de testosterona; Grupo 4: castrados y tratados con propionato de testosterona. Cada valor representa el valor medio ± ES para 8 determinaciones individuales. Los asteriscos indican datos significativamente diferentes con respecto al control (test de Student, *: $p < 0,025$).

acetilpoliaminas totales con respecto a los animales del grupo control.

El análisis de cada acetilpoliamina indica que los compuestos presentes en mayor proporción son acetilputrescina y acetilespermina, seguidos por N¹ y N⁸ acetilespermidina.

Al expresar los resultados en nmoles/órgano, se pone en evidencia que la hiperprolactinemia originó un incremento significativo en el contenido de acetilputrescina, N⁸ acetilespermidina y acetilespermina, sin variaciones en los niveles N¹ acetilespermidina (Tabla 14). Si se considera la concentración (nmoles/gr de tejido) de las acetilpoliaminas, sólo se obtienen diferencias significativas en los niveles de acetilputrescina y acetil espermina, mientras que los niveles de N¹ y N⁸ acetilespermidina no mostraron variaciones significativas (Tabla 15).

Acetilpoliaminas (nmoles/órgano)				
Tratamiento	AcPu	N ⁸ -AcEsd	N ¹ -AcEsd	AcEsp
Grupo 3	2,91±0,92*	1,37±0,20**	1,20±0,33	1,63±0,08***
Grupo 4	0,87±0,16	0,81±0,05	0,67±0,17	1,23±0,03

Tabla 14: Efecto de la PRL sobre los niveles de acetilpoliaminas en vesículas seminales de ratones enanos Ames (df/df).

AcPu: acetilputrescina; N⁸-acetilespermidina; N¹-AcEsd: N¹-acetilespermidina; AcEsp: acetilespermina. Grupo 3: homotransplantados, castrados y tratados con propionato de testosterona; Grupo 4: castrados y tratados con propionato de testosterona. Cada valor representa el valor medio ± ES para 8 determinaciones individuales. Los asteriscos indican datos significativamente diferentes con respecto al control (test de Student, *: p < 0,05; **: p < 0,025; ***: p < 0,0025).

Tratamiento	Acetilpoliaminas (nmoles/gr tejido)			
	AcPu	N ⁸ -AcEsd	N ¹ -AcEsd	AcEsp
Grupo 3	28,6±6,2*	14,6±0,9	14,0±4,5	24,0±1,1**
Grupo 4	13,2±2,2	12,3±0,9	10,2±2,8	18,6±0,2

Tabla 15: Efecto de la PRL sobre el contenido de acetilpoliaminas en vesículas seminales de ratones Ames (df/df).

AcPu: acetilputrescina; N⁸-AcEsd: N⁸-acetilperimidina; N¹-AcEsd: N¹-acetilperimidina; AcEsp: acetilespermina. Grupo 3: homotransplantados, castrados y tratados con propionato de testosterona; Grupo 4: castrados y tratados con propionato de testosterona. Cada valor representa el valor medio ± ES para 8 determinaciones individuales. Los asteriscos indican datos significativamente diferentes con respecto al control (test de Student, *: p < 0,05; **: p < 0,0025).

DISCUSSION

Si bien la acción de la PRL se consideró en un principio restringida al inicio y mantenimiento de la lactancia, actualmente, se atribuye a esta hormona una variedad de efectos relacionados con el crecimiento, el metabolismo y la función reproductiva. En el macho, la capacidad de la PRL en afectar el crecimiento de las glándulas sexuales accesorias y la espermatogénesis (Bartke, 1976) fue descrita con anterioridad a la determinación cuantitativa de sus niveles periféricos o a la presencia de sus receptores específicos en tejidos efectores. Existe en la actualidad, una amplia información relacionada con los distintos efectos de la PRL. Sin embargo, si se analiza cuidadosamente la misma, resulta ser contradictoria.

Parte de los resultados presentados en este trabajo estudian el efecto de la PRL sobre el metabolismo de los andrógenos en la gonada masculina. Para ello, se utilizaron distintos modelos experimentales con el propósito de establecer en que circunstancias esta hormona hipofisaria es capaz de modificar y modular la esteroidogénesis testicular.

El homotransplante de hipófisis bajo la cápsula renal en ratas prepuberales, produjo una hiperprolactinemia moderada. Es importante destacar que el período de hiperprolactinemia abarca toda la etapa de desarrollo puberal (de los 30 a los 70 días de edad), lográndose niveles séricos de la hormona por encima de los valores normales para esa edad. La hiperprolactinemia durante este período de la vida del animal, se acompañó de una disminución en los niveles

séricos de LH. Este hecho, remarca el papel que la PRL ejercería en la fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal y coincide con los resultados de otros grupos de investigación. Así, Bartke y col. (1977), por ejemplo, observaron un marcado descenso en los niveles plasmáticos de LH en ratas y ratones adultos con una hiperprolactinemia crónica inducida por múltiples trasplantes ectópicos. Se ha demostrado que la PRL sensibiliza el eje hipotálamo-hipofisario a la regulación negativa que ejercen los esteroides gonadales (McNeilly y col., 1978, 1983) e inhibe la secreción de LH a nivel hipofisario (Winters y Loriaux, 1978).

Los niveles de testosterona sérica en los animales homotransplantados estudiados en este trabajo, presentan una ligera disminución, respecto de los animales controles, que no es significativa. La concentración periférica de 3α -Diol tampoco presenta una variación significativa entre los animales tratados y el grupo control. Estos resultados concuerdan con los presentados por otros grupos (Bartke y col., 1977; McNeilly y col., 1978 y 1983). Weaber y col. (1983) encuentran que en animales adultos tratados con sulpirida, antagonista dopaminérgico, se presenta un aumento en la testosterona sérica luego de escasos días de hiperprolactinemia. Sin embargo, si el tratamiento se prolonga más tiempo, los niveles plasmáticos de andrógenos no difieren de aquellos del grupo control. Esto indicaría que el perfil metabólico de la testosterona cambiaría con el tiempo de la hiperprolactinemia.

La respuesta "in vitro" del testículo a distintas dosis de hCG, presentadas en este trabajo, no muestran diferencias significativas entre los animales controles e hiperprolactinémicos. Asimismo, no se observaron variaciones en el valor del DE50 (dosis efectiva 50) para ambos grupos experimentales, por lo que se puede asumir, que en las condiciones experimentales descritas, la PRL no modula la sensibilidad del testículo al estímulo con hCG. Si bien el número de receptores de LH no fue evaluado, es poco probable que exista una modificación sustancial en dicho parámetro, ya que frente a un aumento o disminución del número de receptores de LH, se detectaría un corrimiento en el valor de DE50 en la respuesta del testículo al estímulo con hCG (Cigorruga y col, 1978).

Se ha descrito que en ratas inmaduras hipofisectomizadas, la LH estimula la actividad 5 α -reductasa en homogenatos de testículo entero (Moger y Armstrong, 1974; Murono y Payne, 1979) o en células intersticiales aisladas (Nayfeh y col., 1975). Por otro lado, Nayfeh y col. (1975) determinaron que la administración de FSH a ratas inmaduras hipofisectomizadas estimula dicha actividad enzimática en células intersticiales testiculares. Esto ha llevado a proponer que los cambios en la actividad 5 α -reductasa testicular, a diferentes edades en la rata, parecen corresponder a cambios maduracionales controlados por las gonadotrofinas hipofisarias.

Durante la maduración prepuberal (20-40 días de edad), las células de Leydig sintetizan testosterona, sin embargo este andró-

geno no se acumula debido a una elevada actividad 5α -reductasa que convierte la testosterona en dihidrotestosterona y $3\alpha/\beta$ -Diol (Fisher y Steinberger, 1971; Corpechot y col., 1981). En consecuencia, los metabolitos 5α -reducidos representan el principal andrógeno secretado por el testículo inmaduro (Moger, 1977; Corpechot y col., 1981). Así, la testosterona es el andrógeno periférico más importante en la rata luego de los 40 días de edad, debido a una declinación en la actividad 5α -reductasa que resulta en un menor metabolismo de la testosterona (Coffey y col., 1971).

Es evidente que los cambios maduracionales en la actividad 5α -reductasa tienen un papel fundamental en la regulación del nivel de testosterona secretada por las células de Leydig. En este contexto, Podestá y Rivarola (1974) han demostrado que se requieren niveles elevados de 3α -Diol para la estimulación de la primera división meiótica en el proceso espermatogénico.

Utilizando células de Leydig purificadas a través de gradientes de metrizamida, Murono (1989) ha demostrado que la acumulación de testosterona durante la maduración sexual está influenciada por cambios en la actividad 5α -reductasa, 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y $3\alpha/\beta$ -hidroxiesteroide oxidoreductasa.

A su vez, Chase y Payne (1985) han sugerido que, si bien la LH es la hormona principal en regular la actividad de 5α -reductasa, la PRL puede estar también involucrada en mantener una alta actividad 5α -reductasa testicular en la rata prepuberal. Al respecto, Take-

yama y col. (1986) observaron que la hiperprolactinemia aumenta marcadamente la actividad 5α -reductasa inducida por LH en animales hipofisectomizados.

En el presente trabajo, pudimos observar un aumento significativo en la actividad específica de la enzima 5α -reductasa testicular en los animales con hiperprolactinemia inducida por homotransplante de hipófisis. El aumento en la actividad 5α -reductasa es más notorio cuando la enzima se determina en preparaciones de microsomas testiculares, ya que se ha logrado en cierta medida, una purificación de la misma. Es oportuno mencionar que en trabajos previos en este Laboratorio, Barañao y col. (1981) no observaron modificaciones en la actividad 5α -reductasa de túbulos seminíferos luego de la administración de PRL (500 μ g/rata/día; 10 días). Sin embargo, la administración de un agonista dopaminérgico, tal como la bromoergocriptina, permitió detectar una disminución en la actividad enzimática.

En el presente modelo experimental "in vivo" pudo demostrarse un aumento en la actividad enzimática aún cuando los niveles de LH se encuentran disminuídos. Esto sugeriría que en las condiciones experimentales descritas, la PRL podría incrementar la actividad 5α -reductasa testicular potenciando la acción de LH y cumpliendo así una función permisiva del efecto trófico de la LH.

El incremento en la actividad de la enzima puede deberse, por lo menos, a cuatro fenómenos: activación alostérica, inducción de

la síntesis de novo, inhibición de la degradación o bien disminución en la velocidad de recambio de la enzima.

Los efectos positivos de la PRL sobre la actividad 5α -reductasa gonadal contrastan con los efectos inhibitorios descritos para esta hormona sobre la misma enzima en adrenal de rata. Se ha demostrado en esta última glándula, que la PRL inhibe el aumento de la 5α -reductasa posterior a la hipofisectomía, ovariectomía u orquidectomía (Witorsh y Kitay, 1972). Si bien existen mecanismos comunes, es probable que la regulación de la 5α -reductasa y el papel de la PRL en dicha regulación sean procesos diferentes en las gonadas y glándulas adrenales.

La inyección intratesticular de PRL-o permitió evaluar el efecto directo de esta hormona sobre el metabolismo de andrógenos gonadales. Utilizando este modelo experimental, es posible detectar y discriminar entre el efecto local de la hormona y los derivados por una acción central a nivel de la hipófisis. Por otro lado, y debido a que cada animal es su propio control, este método de evaluación tiene la ventaja adicional de minimizar la variación entre animales. Los resultados obtenidos muestran un aumento en la actividad específica de la 5α -reductasa en el grupo de animales inyectados con la dosis más baja ($1.5 \cdot 10^{-7}$ M). Debe remarcarse que, con esta dosis se logra una concentración comparable a la obtenida en la hiperprolactinemia inducida por homotransplante. Con dosis

mayores no se observan modificaciones en la actividad de la enzima.

Se ha descrito que la acción de la PRL sobre la esteroidogénesis testicular, presenta un efecto bifásico (Welsh y col, 1986; Fung y col., 1989; Dombrowicz y col., 1992). Es decir, la hormona ejercería acciones estimulatorias o inhibitorias sobre la producción de andrógenos a nivel testicular, dependiendo fundamentalmente de las dosis utilizadas o los niveles plasmáticos alcanzados. Es razonable pensar, entonces, que la PRL actuaría sobre la 5α -reductasa, de manera análoga a la descrita en la biosíntesis de esteroides.

En una etapa posterior, se planteó la posibilidad de analizar si el efecto de la PRL observado sobre la 5α -reductasa, se mantenía en presencia de una hiperprolactinemia elevada y durante un período prolongado.

El implante del Tumor 7315a, productor de PRL, a ratas adultas permitió lograr un marcado incremento en los niveles plasmáticos de PRL.

Luego de 35 días de implante del Tumor, los niveles periféricos de LH permanecieron constantes. Sin embargo, cuando la hiperprolactinemia se prolongó por más de 45 días, la concentración sérica de LH resultó ser significativamente menor que en el grupo control.

Si bien Weber y col. (1982), utilizando un modelo experimental análogo, con un tumor secretor tanto de PRL como de ACTH, muestran

una disminución en los niveles séricos de LH a los 35 días luego del implante del tumor, es importante resaltar que los niveles de PRL alcanzados son muy superiores a los observados en el presente trabajo. Similarmente, Katovich y col. (1985), utilizando ratas implantadas con el Tumor productor de PRL MtTW15, detectan una disminución en los niveles de LH a los 27 días del implante.

Por otro lado, los valores séricos de testosterona en el presente modelo experimental muestran un marcado descenso. Esta disociación entre los niveles séricos de testosterona y LH ha sido descrita por Charpenet y col. (1981), quienes observaron que durante el estrés crónico se puede inducir una brusca disminución de la concentración sérica de testosterona sin el concomitante descenso en los niveles de LH.

En consecuencia, es admisible inferir que tal disociación entre los niveles de testosterona y LH séricos, sugieren que el mecanismo responsable en la disminución de la testosterona, esté localizado principalmente a nivel testicular. Dado que la producción testicular de testosterona se debe primordialmente a la interacción entre LH y las células de Leydig, y los niveles séricos de esta hormona no se han modificado a los 35 días de desarrollo del Tumor, es posible descartar que la disminución observada en la concentración plasmática de testosterona sea una consecuencia del efecto de LH. Por lo tanto, estos resultados sugieren la posibilidad de una lesión a nivel testicular que afecte o comprometa la esteroidogénesis a

tiempos prolongados de evolución del Tumor.

El perfil sérico de testosterona observado en los animales portadores del Tumor, sugieren la posibilidad de un aumento en la actividad de las enzimas metabolizantes de andrógenos. Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo, muestran que la actividad 5 α -reductasa no presentó variaciones significativas en los animales implantados con el Tumor 7315a respecto del grupo control.

Morris y Saxena (1980) han demostrado, al administrar distintas dosis de PRL a ratas adultas, una modulación negativa en el número de receptores para LH en el testículo. Este efecto podría contribuir a la alteración en la función gonadal como consecuencia de la hiperprolactinemia, ya que toda respuesta hormonal está principalmente mediada por la unión de la hormona al receptor.

Es posible, entonces, postular que la disminución en la testosterona sérica se debería al efecto inhibitorio de la PRL sobre una o más enzimas del camino biosintético de andrógenos.

Munabi y col. (1985) utilizando ratas adultas hipofisectomizadas, han mostrado que la hiperprolactinemia inducida por homotransplante, produce una disminución en las actividades de las enzimas 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 17-hidroxilasa, 17-20 desmolasa y 17 ceto esteroide reductasa. En un modelo similar, Ueda y col. (1987) indicaron que la PRL inhibe la actividad 17-hidroxilasa y 17 β -oxido reductasa inducidas por LH.

Dado los bajos niveles de testosterona, se podría esperar una disminución en el peso testicular como consecuencia de un menor desarrollo del epitelio germinal. Sin embargo, los resultados obtenidos no indican modificación del peso gonadal. Por lo tanto, el trofismo del órgano es mantenido por otros factores estimuladores de crecimiento entre los que podría encontrarse la PRL.

Los resultados obtenidos "in vivo" en los tres modelos experimentales utilizados, tomados en su conjunto, sugieren que la PRL modula la actividad de la 5α -reductasa en función de los niveles periféricos de la hormona, si bien no se puede descartar un efecto diferencial dependiente de la edad del animal.

En consecuencia, podría deducirse, que las modificaciones en la actividad 5α -reductasa tendrían como finalidad proveer a las glándulas sexuales accesorias de compuestos 5α -reducidos, lo que le permitiría a las mismas responder adecuadamente a los requerimientos de crecimiento y secreción de cada uno de estos órganos (Okamoto y col., 1982). De todos modos no debemos olvidar que las glándulas sexuales accesorias tienen la capacidad de metabolizar testosterona, siendo la DHT el compuesto activo a nivel celular en la mayoría de los órganos andrógenos-dependientes (Wilson y Gloyna, 1970; Lundmo y col., 1985)

Para estudiar el efecto directo de PRL sobre el testículo en

forma independiente de las acciones de otra hormonas, también se utilizó un modelo "in vitro". Los resultados obtenidos a partir de incubaciones de testículos provenientes de ratas inmaduras con distintas dosis de PRL, permitieron detectar un aumento en la actividad 5α -reductasa en el compartimiento tubular. Estos resultados remarcan que la acción de PRL depende de las dosis utilizadas. Las incubaciones de PRL con suspensiones de células intersticiales no produjeron modificaciones en la actividad de esta enzima. Ya que se han descrito sitios de unión para PRL exclusivamente en el sector intersticial, surge entonces, que es necesaria la integridad gonadal para que se manifieste el efecto de esta hormona. Estos resultados reforzarían el concepto de comunicación intercelular dentro de la gonada o regulación parácrina. Al respecto, la presencia de barreras selectivas que operan a distintos niveles (endotelio vascular, células mioides, células de Sertoli) permiten la existencia de microentornos específicos, esenciales para la interacción entre los dos compartimientos testiculares que asegurarían una concentración local de factores que median esta interacción (Sharpe, 1984).

Con el propósito de estudiar la acción de PRL sobre las células de Leydig a tiempos prolongados, se debió recurrir al desarrollo de un sistema de cultivo de estas células. Este sistema tiene ciertas ventajas adicionales sobre la preparación cruda de células intersti-

ciales. Es aceptado generalmente, que las preparaciones de células frescas pueden presentar cierta alteración en los receptores de membrana debido al tratamiento enzimático durante el proceso de aislamiento (Cooke y col., 1979). Por lo tanto, puede resultar ventajoso un cierto período de recuperación durante las primeras horas de cultivo. Además, las células viables son separadas de las células no viables por una adhesión selectiva a la superficie de cultivo (Campbell, 1979; Janecki y col., 1984). La aplicación de técnicas de cultivo puede mejorar la calidad de la preparación celular, la cual puede ser analizada desde condiciones de cultivo definidas. Las células de Leydig obtenidas se identificaron desde el punto de vista morfológico, histoquímico - mediante la actividad de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- y funcional - evaluando su capacidad esteroidogénica a través de la producción basal de andrógenos y su respuesta a la estimulación con dosis máximas de hCG durante las 3 últimas horas de cultivo.

Los resultados muestran un aumento en la producción basal en función del tiempo de cultivo. Este hecho se puede relacionar con la recuperación de las células luego de la manipulación durante la colagenización, así como la adaptación de las mismas al nuevo entorno. Un fenómeno similar ha sido descrito por otros autores (Rommerts y col., 1982; Bernier y col., 1983).

La respuesta esteroidogénica de estas preparaciones a dosis crecientes de hCG a las 45 horas de cultivo, coincide con la infor-

mación proveniente de Barkey y col. (1987) empleando células de Leydig adultas.

Al realizar incubaciones con dosis crecientes de PRL durante las 3 últimas horas de cultivo, pudo observarse los efectos agudos de la hormona sobre la funcionalidad de las células de Leydig. La dosis de 1000 ng/ml (50 nM) de la hormona, produjo una estimulación en la producción de andrógenos que no fue aditiva a la respuesta inducida por hCG. La preparación de PRL-o utilizada contenía una concentración de LH menor del 0,5% de su peso. Si bien estos niveles son pequeños, la cantidad de LH contaminante junto a la PRL adicionada pueden ser suficientes para lograr un estímulo de la esteroidogénesis (1pg/ml). Por lo tanto, los resultados observados no nos permiten discernir entre la acción de PRL y la de LH. Para obviar este efecto y evaluar la acción a largo plazo de la PRL, se utilizaron dosis menores de la hormona (10 ng/ml = 0,5 nM) que no son esteroidogénicamente activas .

Cuando una dosis de PRL correspondiente a 10 ng/ml, fue mantenida durante todo el período de cultivo, se observó una disminución (35%) en la producción basal de 3α -Diol, mientras que la respuesta a la estimulación máxima con hCG resultó preservada.

Los niveles disminuídos en la producción de 3α -Diol en este sistema de cultivo después de la exposición prolongada a PRL podrían explicarse, al menos, por 3 mecanismos: 1) una actividad reducida

en las enzimas biosintetizantes de andrógenos, lleva a una disminución en la producción de andrógenos; 2) una disminución en la actividad 5α -reductasa conduce a una disminución en los niveles de sustrato para la enzima 3α -hidroxiesteroide óxido reductasa y 3) una disminución en la actividad enzimática directamente responsable de la producción de 3α -Diol.

Con respecto a la primera posibilidad no podemos confirmarla o descartarla, ya que no se han medido las enzimas involucradas en la síntesis de andrógenos. Sin embargo, si tenemos en cuenta que la producción total de andrógenos está mantenida en los cultivos tratados con PRL, podemos suponer que esta alternativa no es muy probable.

La segunda alternativa puede ser descartada ya que la medición de esta actividad enzimática en el sistema de cultivo en estudio no mostró ningún efecto relacionada con el tratamiento con PRL. De manera coincidente, Murono y Washburn (1990) no fueron capaces de demostrar un efecto directo de la PRL (500 ng/ml) sobre la actividad 5α -reductasa en un cultivo de células de Leydig purificadas mediante gradiente de Percoll.

El hecho que los presentes resultados revelasen un cambio notorio en la relación T+DHT/Diol, sugieren que la tercera posibilidad sea la explicación más probable de la disminución detectada en la producción de 3α -Diol. Esta última hipótesis, fue confirmada al encontrar una inhibición, inducida por PRL, en la actividad de la

enzima 3α -HOR en células de Leydig en cultivo.

Otro de los objetivos de este trabajo era determinar en que medida la PRL ejerce su acción proliferativa afectando ciertos parámetros celulares involucrados en la acción promotora de crecimiento. Se ha puesto en evidencia la acción trófica de la PRL sobre las glándulas sexuales accesorias tales como vesículas seminales y próstata (Negro Vilar, 1980; Syms y col, 1985), si bien no hay información precisa acerca de los mecanismos involucrados en dicha acción.

Los resultados aquí presentados muestran que en el sistema de cultivo desarrollado en este trabajo, dosis tan bajas como 5 ng/ml fueron capaces de incrementar la incorporación de uridina radioactiva a ARN, evidenciando un efecto trófico sobre dichas células. Morris y col. (1987) han identificado las proteínas liberadas al medio en cultivos primarios enriquecidos en células de Leydig luego del estímulo con PRL en dosis moderadas (100 ng/ml). Estos autores sugieren que estas proteínas pueden representar un factor parácrino y/o autócrino involucrado en el mecanismo de acción de la PRL en la función testicular de la rata.

Esta actividad promotora de crecimiento que se evidencia a través del aumento en la síntesis de ARN y proteínas (Morris y col., 1987), puede ser igualmente puesta de manifiesto mediante la deter-

minación de ODC, enzima limitante de la biosíntesis de poliaminas (Tabor y Tabor, 1984).

El aumento en la actividad ODC y en la producción de poliaminas, está asociado con el crecimiento celular, diferenciación y proliferación; mientras que la reducción en la actividad ODC y niveles de poliaminas trae como consecuencia una disminución en el crecimiento y diferenciación de las células (Russell y Durie, 1978; Russell, 1985). Esta enzima es altamente regulable y su actividad se incrementa rápidamente en respuesta a una gran variedad de estímulos que afectan el crecimiento celular, tales como hormonas, factores de crecimiento, estímulos regenerativos, promotores tumorales, etc. (Pegg, 1986). Recientemente, de las Heras y Calandra (1992) han demostrado que la determinación de ODC es un parámetro particularmente útil en el estudio del efecto trófico de PRL sobre el testículo.

Los resultados presentados muestran que la hiperprolactinemia inducida por el implante del Tumor 7315a ha sido capaz de incrementar la actividad ODC testicular. Cuando se evaluaron los niveles de poliaminas intratesticulares no se observaron modificaciones en los niveles de putrescina, espermidina y espermina; así como en el contenido de cada uno de estos poliaminas. Otros autores han descrito una falta de correlación entre ambos parámetros. Al respecto, Rorke y col. (1984) proponen que el tejido en crecimiento presenta una alta actividad biosintética de poliaminas pero, parece

autoregularse con el fin de mantener un nivel constante de poliaminas. En relación con este concepto, Davis (1990) ha sugerido que sólo la fracción difusible de estas poliaminas cargadas cambia en respuesta a un estímulo, mientras que el contenido total se mantiene constante.

Estudiando la regulación androgénica en la próstata y vesículas seminales, Fjösne y col. (1988, 1990) indicaron que el período de estimulación de la enzima ODC, es distinto del encontrado para las poliaminas. Ambos parámetros presentan diferentes cinéticas después de la estimulación hormonal. Además, se ha descrito que los niveles de poliaminas cambian gradualmente (Raina y col., 1987; Tabor y Tabor, 1976), mientras que la ODC presenta una rápida velocidad de recambio (Isomaa y col., 1983).

El crecimiento de cualquier órgano involucra un aumento concomitante en el peso y en su contenido de ADN (Coffey, 1974). Al igual que otras glándulas sexuales accesorias, las vesículas seminales son dependientes de los andrógenos para su desarrollo embrionario, crecimiento y función secretoria (Dadaune, 1985). Por esta razón, el peso de las vesículas seminales ha sido usado como un índice para evaluar el estado androgénico del animal (Brandes, 1974). En el presente estudio de hiperprolactinemia inducida por el Tumor 7315a, no se detectó una regresión tisular de vesículas seminales a pesar de los niveles reducidos de testosterona, indican-

do que otros factores pueden estar involucrados en el proceso proliferativo de las glándulas sexuales accesorias.

En conjunto con los andrógenos, la PRL también influye sobre las vesículas seminales en distintas especies, ya que se han descrito receptores para esta hormona en dicho tejido (Costlow y McGuire, 1977; Barkey y col. 1977, 1979). Se ha demostrado que la PRL ejerce un rol facilitatorio sobre la acción androgénica en ratas (Thomas y Keenan, 1976; Calandra y col., 1982).

Piik y col. (1977) observaron en vesículas seminales provenientes de ratas castradas que la actividad ODC está principalmente regulada por andrógenos. Esta regulación de la ODC por andrógenos es particularmente interesante. En tejidos efectores de andrógenos, la respuesta a los esteroides sexuales, en el macho, es de tipo hipertrófica e hiperplásica; mientras que en tejidos sensibles a andrógenos es sólo de tipo hipertrófico. (Pegg y col., 1970; Piik y col, 1977; Williams-Ashman y Lockwood, 1970; de las Heras y Calandra, 1987). Recientemente, Crozat y col. (1992) han evaluado la regulación de la vía biosintética de poliaminas por andrógenos y lograron detectar una acumulación del ARN mensajero para ODC, fundamentalmente en células epiteliales de vesículas seminales de ratas y ratones castrados e implantados con cápsulas que liberan dosis farmacológicas de testosterona.

Negro-Vilar y col. (1977) observaron que la PRL puede actuar

de manera independiente en la estimulación del crecimiento de las glándulas sexuales accesorias.

Nonomura y col. (1985) estudiando el efecto de la hiperprolactinemia inducida por homotransplante en ratones machos, señaló el efecto estimulatorio de PRL sobre vesículas seminales. En este mismo sentido, Arunakaran y col. (1988) utilizando monos adultos de la cepa Bonnet, establecen que la PRL puede regular, en cierta medida, el crecimiento y funcionalidad de las vesículas seminales en ausencia de andrógenos testiculares.

Es interesante señalar que se ha demostrado (Ayata y col., 1989) en ratones castrados, hasta 30 días post-castración, que la hiperprolactinemia inducida por homotransplantes hipofisarios, incrementa la síntesis de ADN de las células epiteliales y no así de las células del estroma de las vesículas seminales. Como consecuencia, estos autores observaron un retraso en la involución inducida por la castración, tanto en el peso del órgano como en su contenido en ADN.

Los resultados aquí presentados coinciden, en ciertos aspectos, con los descritos por Ayata y col. (1989). El incremento detectado en la actividad ODC en vesículas seminales de ratas portadoras del Tumor, es una clara evidencia del efecto trófico de la PRL sobre estas glándulas, aún a concentraciones considerablemente altas de la misma. En estos grupos se vio que los tejidos que presentan una mayor actividad enzimática, corresponden a aquellos animales cuyos

niveles de testosterona sérica se encuentran disminuídos. Estos resultados sugieren que elevados niveles de PRL son capaces de estimular la actividad ODC en vesículas seminales aún a bajas concentraciones de testosterona. Es entonces, posible inferir que habría dos efectos superpuestos. Mientras que los niveles de PRL secretados por el Tumor ejercen un efecto trófico sobre las vesículas seminales, los bajos niveles de andrógenos circulantes inducen una regresión tisular.

El hígado contiene sitios de unión específicos para PRL (Posner y col., 1974), los cuales pueden ser inducidos por homotransplantes de hipófisis (Posner y col., 1975), administración de PRL (Calvo y col., 1981), o estimulación en la liberación de esta hormona (Lüthy y col., 1985). Se ha indicado que la PRL es capaz de estimular la actividad ODC en este tejido (Hurley y col., 1980). Para poder evaluar la especificidad de órgano en la acción de la PRL se decidió, entonces, determinar y comparar la actividad ODC hepática.

Los resultados sugieren que la disminución observada en la actividad ODC hepática en el grupo de ratas hiperprolactinélicas, es probablemente debida al nivel reducido de andrógenos circulantes, ya que se demuestra que la PRL no participa en la inducción de la actividad ODC en este órgano.

Cuando se trató de analizar si existía correlación entre actividad ODC y las concentraciones de poliaminas en las vesículas

seminales de las ratas portadoras del Tumor, se observó que independientemente del aumento en la actividad ODC, los niveles de poliaminas no fueron modificados por la presencia del Tumor. Como se comentara anteriormente, existen una serie de factores cinéticos y compartimentales que tenderían a regular la concentración de poliaminas dentro de un tejido (Tabor y Tabor, 1976; Isomaa y col., 1983; Raina y col., 1987; Fjösne y col., 1988; 1990). Por otra parte, es importante tener en cuenta que estos compuestos son la resultante de un balance entre síntesis y conversión a otros metabolitos, en una secuencia de eventos bioquímicos pertenecientes un proceso finamente modulado.

Los presentes resultados indican que los elevados niveles de PRL liberados por el Tumor 7315a, inducen un aumento en la actividad ODC, evidenciando un efecto trófico directo de la PRL en las vesículas seminales.

En los ratones enanos de la cepa Ames (df/df), se ha demostrado una deficiencia completa en PRL y GH (Bartke, 1980; Slabaugh y col., 1981). Al tratar estos animales con hipófisis ectópicas, secretan PRL biológicamente activa (Everett, 1956; Adler, 1986), resultando, por lo tanto, un modelo experimental particularmente útil para ahondar en el estudio de las acciones fisiológicas de la PRL sobre gonadas y glándulas sexuales accesorias.

Los resultados obtenidos en esta Sección, revelan un aumento

en los niveles de FSH plasmáticos en los ratones enanos intactos y en los castrados y tratados con propionato de testosterona e implantados con hipófisis. Estos resultados coinciden con observaciones previas de Bartke y col. (1977) e indican que la PRL puede estimular la liberación de FSH en el ratón macho. Además, los presentes resultados sugieren que el estímulo de la liberación de FSH hipofisaria ejercido por los andrógenos es menor cuando los niveles de PRL no son detectables (animales castrados, tratados con andrógenos, sin el implante de hipófisis). Ni el aumento endógeno de testosterona, ni la administración exógena de esta hormona inhiben los niveles plasmáticos de FSH en el grupo de animales homotransplantados. La capacidad de la PRL en aumentar la actividad de los centros hipotálamicos noradrenérgicos y probablemente, afectar así la liberación de LHRH en esta especie (Bartke y col., 1984), brinda una explicación posible en relación los efectos observados.

De los resultados obtenidos en el grupo de ratones enanos intactos, se puede inferir que tal vez la PRL modifique la producción testicular de otros compuestos no relacionados con la testosterona. Por ejemplo, una secreción reducida de inhibina podría contribuir con el aumento observado en los niveles plasmáticos de FSH (Chowdhury y col., 1978; Franchimont y col., 1979).

El aumento observado en los niveles plasmáticos de testosterona en el grupo de ratones homotransplantados, se debe probablemente a un incremento en la liberación de gonadotrofinas (Bartke y col.,

1977; Klemcke y Bartke, 1981; Bartke y col., 1984) y a la capacidad del testículo de producir andrógenos (Bartke, 1976) como se ha demostrado en la rata inmadura tratada con PRL (Belanger y col., 1981; Barañao y col., 1981).

Los resultados obtenidos en este modelo experimental coinciden con los presentados por Ayata y col. (1989) comentados anteriormente.

Los niveles plasmáticos de testosterona fueron simultáneamente aumentados en ratones intactos homotransplantados y en los castrados y tratados con propionato de testosterona. Es importante observar que el peso de las vesículas seminales mostró un aumento significativo sólo en el primer grupo. El efecto del trasplante de hipófisis sobre el peso de las vesículas seminales, fue mayor en el grupo de ratones intactos que en el castrado y tratado con propionato de testosterona, a pesar de los niveles de PRL muy similares. Podría considerarse que la estimulación del crecimiento de las vesículas seminales en ratones enanos intactos puede involucrar otros metabolitos además de la testosterona. El metabolismo de este andrógeno puede ser distinto en ratones intactos y castrados y tratados con testosterona (Gallon y col., 1989; Djoseland, 1976). Es posible que ciertos factores intragonadales, tales como péptidos testiculares puedan influenciar el efecto de la testosterona sobre el crecimiento de las vesículas seminales.

El peso de estas glándulas en el modelo en estudio, se incre-

mentó moderada pero significativamente. Este aumento fue comparable con el descrito en el ratón deficiente en PRL correspondiente a la cepa C57BL, uno o dos meses después de recibir el implante de hipófisis a la edad de 30 o 90 días (Nonomura y col., 1985). Estos autores indican, además, que la displasia epitelial de las vesículas seminales en los ratones no tratados, fue normalizada por el homotransplante de hipófisis.

Tanto estas observaciones como las presentadas en este trabajo remarcan que la PRL ejerce un efecto trófico específico sobre las vesículas seminales.

El incremento observado en la actividad ODC de las vesículas seminales en el grupo de ratones enanos hiperprolactinémicos, se vio reflejado en un mayor nivel de poliaminas. El análisis individual de cada poliamina reveló que sólo la putrescina sufrió un incremento significativo. No se detectaron cambios en los niveles de espermidina y espermina. Estos resultados sugieren que el contenido de estas poliaminas se halla regulado fundamentalmente a nivel de la ODC, puesto que la putrescina fue el compuesto más influenciado por la acción de la PRL.

Aunque las enzimas biosintéticas requeridas para la síntesis de espermidina y espermina (S-adenosil-metionina decarboxilasa, espermidina sintetasa y espermina sintetasa) también pueden ser inducidas por algún estímulo promotor de crecimiento (Hannonen y

col., 1972), es lógico pensar que el aumento en los niveles de putrescina, sea suficiente para iniciar el estímulo en la síntesis de espermidina, dado que esta diamina actúa como un activador de la enzima S-adenosil-metionina decarboxilasa (Pegg y Williams-Ashman, 1968). Es decir, podría ser probable que la concentración local de este polication y no la cantidad total de enzima puedan controlar la velocidad de decarboxilación de S-adenosil-metionina "in vivo" (Höltta y Jänne, 1972). Sin embargo, se ha demostrado que en ciertas circunstancias, tales como durante la fase pre-replicativa del hígado en regeneración (Jänne, 1967) y en cultivo de células luego de un estrés hipoosmótico (Käpyaho y Jänne, 1982; Poulin y col., 1991), la conversión de putrescina en espermidina está bloqueada. Este bloqueo puede atribuirse, en parte, a la disminución en la actividad de la S-adenosil-metionina decarboxilasa (Käpyaho y Jänne, 1982; Poulin y col., 1991). Sin embargo, Käpyaho y Jänne (1982) postulan una prolongación de la vida media de la putrescina, sin llegar a proponer ningún mecanismo posible. Recientemente, Halmekytö y col. (1991), han generado un ratón transgénico que sobre-expresa el gen humano de ODC, presentando niveles muy elevados de putrescina pero concentraciones prácticamente normales de espermidina y espermina. Estos autores, desde un punto de vista totalmente especulativo, arriesgan la hipótesis que la putrescina, pueda ser secuestrada de modo de hacerla no disponible para la síntesis de poliaminas superiores. Estos conceptos coincidirían con los

expresados por Davis (1992), que sostiene la existencia de un sistema homeostático para las poliaminas, en los tejidos que no están en división, con el fin de prevenir una excesiva acumulación de las poliaminas superiores.

Ahora bien, no se conoce con exactitud el proceso por el cual se impide una alta concentración de espermidina y espermina, en aquellas condiciones en que hay un aumento en la actividad ODC y en los niveles de putrescina. Un mecanismo probable sería un aumento en los niveles de acetilpoliaminas.

El proceso de interconversión de poliaminas está mediado por reacciones de acetilación y oxidación que generan compuestos intermediarios acetilados. Estos compuestos acetilados son fácilmente degradados por la enzima poliamina oxidasa (Bolkenius y Seiler, 1981; Seiler y col., 1981). Debido a una alta actividad de poliamina oxidasa, sólo pequeñas cantidades de derivados acetilados están presentes en los tejidos, al menos en la rata. Contrariamente, se ha descrito que en el ratón, los niveles de esta enzima son bajos, encontrándose cantidades importantes de N¹-acetilespermidina y N¹-acetilespermina (Pöso y Pegg, 1982; Seiler y col., 1981). Sin embargo, aún en el ratón los derivados acetilados son degradados en pocas horas (Pöso y Pegg, 1982). Como la acetilación de las poliaminas resulta en una disminución de su carga neta, este proceso conduce a la pérdida de su actividad biológica, la cual puede ser recuperada a través de la reconversión de esos metabolitos interme-

dios a poliaminas.

Los resultados obtenidos permiten observar que tanto el contenido como la concentración de acetilpoliaminas totales aumentaron en los animales hiperprolactinémicos. El significado fisiológico de la interconversión de poliaminas aún no ha sido totalmente establecido, aunque, como se comentara anteriormente, se propone que las formas acetiladas probablemente sirvan para prevenir la acumulación de espermidina y espermina en excesivas concentraciones (Davis y col., 1992) y proveer así, una vía alternativa de reserva de estas poliaminas.

CONCLUSIONES

Los resultados descriptos permiten concluir que :

* La hiperprolactinemia moderada inducida por homotransplante de hipófisis en ratas prepúberes es capaz de aumentar la actividad específica de 5α -reductasa. Tratándose de un modelo "in vivo", es posible concluir que la PRL, más que ejercer una acción "per se", podría condicionar las respuestas del testículo a otras hormonas tróficas, es decir, que podría tratarse de un efecto permisivo de la PRL a las acciones proliferativas de LH. Sin embargo, los resultados obtenidos con el modelo de inyección intratesticular de PRL, indican que esta hormona induce un incremento en la actividad 5α -reductasa, independientemente de los niveles periféricos de LH.

* Niveles extremadamente elevados de PRL inducidos por el Tumor 7315a en rata adulta, no modifican la actividad 5α -reductasa testicular, lo que indicaría que el efecto de la PRL sobre esta enzima es dependiente de los niveles de la misma y/o de la edad del animal.

* El efecto directo de PRL, en dosis moderadas, a tiempos breves, sobre la actividad 5α -reductasa es corroborado en experimentos "in vitro", donde se pone de manifiesto que para que esta inducción pueda ser detectada es necesario la integridad gonadal, remarcando la importancia de la comunicación entre los dos compartimientos testiculares.

* El efecto de PRL, en dosis fisiológicas, sobre células de Leydig en cultivos primarios, durante tiempos prolongados, no tienen efecto sobre la 5 α -reductasa, pero inducen una inhibición en la actividad de la enzima 3 α -hidroxiesteroide óxido reductasa. Esta modulación en la actividad enzimática se traduciría en un aumento en la producción y liberación de testosterona y DHT.

* Por otro lado, la acción promotora de crecimiento de PRL se evidencia por un aumento en la incorporación de uridina radioactiva en ARN, en células de Leydig en cultivos primarios, así como un aumento en la actividad ODC testicular y de vesículas seminales en ratas adultas portadoras del Tumor 7315a.

* El estímulo trófico de PRL en vesículas seminales de ratón Ames (df/df) con homotransplante de hipófisis, se traduce no sólo en un incremento en la actividad ODC, sino también en un aumento en los niveles de poliaminas y sus derivados acetilados.

BIBLIOGRAFIA

Adler, RA. (1986). The anterior pituitary-grafted rat: a valid model of chronic hyperprolactinemia. *Endoc.Rev.*, 7: 302 - 313.

Ahmad, N; Gower, DB. (1966). The in vitro metabolism of preg-5-en-3 β -olone by rat testicular tissue. Formation of ¹⁶-steroids. *Steroids*, 7: 273 - 278.

Aragona, C; Bohnet, HG; Friesen, HG. (1977). Localization of prolactin binding in prostate and testis. The role of serum prolactin concentration on the testicular LH receptors. *Acta Endocr. (Copenh.)*, 84: 402 - 407.

Arunakaran, J; Aruldas MM; Govindarajulu, P. (1988). Interactions of androgens and prolactin in the seminal vesicles of mature Bonnet monkeys, *Macaca radiata*. I. Nucleic acids and phosphatases. *J. Androl.*, 9: 121 - 125.

Ayata, M; Yamane, T; Okamoto, S; Li, W; Terada, N; Matsumoto, K. (1989). Increase in epithelial cell growth by hyperprolactinemia induces delay of castration-induced involution of mouse seminal vesicle. *J. Steroid Biochem.*, 32: 719 - 724.

Baraño, JLS; Legnani, B; Chiauzzi, VA; Bertini, LM; Suescun, MO; Calvo, JC; Charreau, EH; Calandra, RS. (1981). Effects of PRL on androgen metabolism in androgen target tissues of immature rats. *Endocrinology*, 109: 2188 - 2195.

Barkey, RJ; Shani, J; Amit, T; Barzilai, D. (1977). Specific binding of prolactin to seminal vesicles, prostate and testicular homogenates on immature, mature and aged rats. *J. Endocr.*, 74: 163 - 173.

Barkey, RJ; Shani, J; Barzilai, D. (1979). Regulation of PRL binding sites in the seminal vesicle, prostate gland, testis and liver of intact and castrated adult rats: effect of administration of testosterone, 2-Bromo, α -ergocriptine and fluphenazine. *J. Endocrin.*, 81: 11 - 17.

Barkey, RJ; Weiss-Messer, E; Mandel, S; Gahnem, F; Amit, T. (1987). PRL and antiprolactin receptor antibody inhibit steroidogenesis by purified rat Leydig cells in culture. *Mol.Cell.Endocr.*, 52: 71 - 80.

Bartke, A. (1966). Influence of prolactin on male fertility in dwarf mice. *J.Endocr.*, 35: 419 - 420.

Bartke, A. (1967). Prolactin deficiency in genetically sterile dwarf mice. *Mem.Soc.Endoc.*, 15: 193 - 196.

Bartke, A. (1976). Pituitary-testis relationships: Role of prolactin in the regulation of testicular function. *Prog.Reprod.Biol.*, 1: 136 - 150.

Bartke, A. (1980). Role of prolactin in reproduction in male mammals. *Fed.Proc.*, 39: 2577 - 2581.

Bartke, A; Hafiez, AA; Bex, FJ; Dalterio, S. (1978). Hormonal interactions in regulation of androgen secretion. *Biol.Reprod.*, 18: 44 - 54.

Bartke, A; Lloyd, CW. (1970). Influence of prolactin and pituitary isografts on spermatogenesis in dwarf mice and hypophysectomized rats. *J.Endocr.*, 46: 321 - 329.

Bartke, A; Morgan, WW; Clayton, RN; Banerji, TK; Brodie, AM; Parke-ning, TA; Collins, TJ. (1984). Neuroendocrine studies on hyperprolactinemic male mice. *J.Endocrinol.*, 112: 215 - 220.

Bartke, A; Smith, MS; Michael, SD; Peron, FG; Dalterio S. (1977). Effects of experimentally-induced chronic hyperprolactinemia on testosterone and gonadotropin levels in male rats and mice. *Endocrinology*, 100: 182 - 186.

Baskin, LS; Yang, S. (1982). Cross-linking studies of the protein topography of rat liver microsomes. *Biochem.Biophys.Acta.*, 684: 263 - 269.

Bates, RW; Garrison, MM; Morris, HP. (1966). Comparison of two different transplantable mammatropic pituitary tumor. Hormone content and effect on host. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 123: 67 - 75.

Becú, D; Libertum, C. (1982). Comparative maturation of the regulation of prolactin and thyrotropin by serotonin and thyrotropin-releasing hormone in male and female rats. Endocrinology, 110: 1879 - 1884.

Becú-Villalobos, D; Lacau-Mengido, IM; Díaz-Torga, GS; Libertum, C. (1992). Ontogenic studies of the neural control of adenohipophyseal hormones in the rat. II. Prolactin. Cell.Mol. Neurob., 12: 1 - 19.

Belanger, A; Auclair, C; Seguin, C; Caron, S; Labrie, F. (1981). Prolactin stimulation of testicular steroid biosynthesis in the male rat. J.Androl., 2: 80 - 86.

Bendayan, M. (1984). Protein A-gold electron microscopic immunocytochemistry: Methods, applications and limitations. J.Electron. Microsc., 1: 243 - 247

Bernier, M; Gibb, W; Haour, F; Collu, R; Salz, JM; Ducharme, JR. (1983). Studies with purified immature porcine Leydig cells in primary culture. Biol.Reprod., 29: 1172 - 1178.

Besa, CE; Bullock, LP (1981). The role of the androgen receptor in erythropoiesis. Endocrinology, 109: 1983 - 1989.

Bex, F; Bartke, A; Goldman, BD; Dalterio, S. (1978). Prolactin, growth hormone, luteinizing hormone receptors and seasonal changes in testicular activity in the golden hamster. Endocrinology, 103: 2069 - 2080.

Bey, P; Danzin, C; Jung, M. (1987). Inhibition of basic amino acid decarboxylases involved in polyamine biosynthesis. En: Inhibition of Polyamine Metabolism. (McCann, PP; Pegg, AE; Sjoerdsma, A; Eds.) Academic Press, Inc., pag. 1 - 31.

Beyer, KF; Samuels, LT. (1956). Distribution of steroid-3 β -ol-dehydrogenase in cellular structures of the adrenal gland. J.Biol.-Chem., 219: 69 - 76.

Blair, DGR. (1985). Activation of mammalian RNA polymerases by polyamines. Int.J.Biochem., 17: 23 - 30.

Blaquier, J; Breger, D. (1974). The in vitro effects of androgens on RNA synthesis by cultures rat epididymal tubules. Endocr. Res. Commun., 1: 247 - 260.

Blum, V. (1975). Phylogenetic aspects of prolactin secretion and action. Acta Endocrin. Suppl., 193: 149 - 150.

Bolkenius, FN; Seiler, N. (1981). Acetyl derivatives as intermediates in polyamine catabolism. Int.J.Biochem., 13: 287 - 292.

Brandes, D. (1974). Hormonal regulation of fine structure. En: Male Accessory Sex Organs. Structure and Functions in Mammals, (Ed. Brandes, D), pag. 184 - 222. Academic Press, New York.

Browning, JY; Heindel, JJ; Grotjan, HE. (1983). Primary cultures of purified Leydig cells isolated from adult rat testis. Endocrinology, 112: 543 - 549.

Bruchovsky, N; Wilson, JD. (1968). The conversion of testosterone to 5 α -androstan-17 β -ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro. J.Biol.Chem., 243: 2012 - 2021.

Calandra, RS; Baraño, JLS; Bertini, LM; Calvo, JC; Charreau, EH; Chiauuzzi, VA; Suescun, MO; Tesone, M. (1982). Effects of prolactin on the male gonad and sex accessory organs. En: Physiopathology of Hypophysial Disturbances and Diseases of Reproduction, (Eds. A. De Nicola, J.Blaquier, R.Soto), pag. 87 - 116, Alan R. Liss, Inc., New York.

Calvo, JC; Finocchiaro, L; Lüthy, IA; Charreau, EH; Calandra, RS; Engstrom, B; Hansson, V. (1981). Specific PRL binding in the rat adrenal: its characterization and hormonal regulation: *J.Endocrinol.*, 89: 317 - 325.

Campbell, GL. (1979). An immunological approach to cell separation of the central nervous system. *Fed.Proc.Am.Soc.Exp.Biol.*, 38: 2386 - 2390.

Cigorruga, SB; Dufau, ML; Catt, KJ. (1978). Regulation of luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in gonadotropin-desensitized Leydig cells. *J.Biol.Chem.*, 253: 4297 - 4304.

Cochet, C; Chambaz, EM. (1983). Polyamine mediated protein phosphorylations: a possible target for intracellular polyamine action. *Mol.Cell.Endocr.*, 30: 247 - 266.

Coffey, JD; French, FS; Nayfeh, SN. (1971). Metabolism of progesterone by rat testicular homogenates. IV. Further studies of testosterone formation in immature testes in vitro. *Endocrinology*, 89: 856 - 872.

Coffey, DS. (1974). The effects of androgens on DNA and RNA synthesis in sex accessory tissues. En: *Male Accessory Sex Organs. Structure and Function in Mammals*, (Ed. Brandes, D), pag. 307 - 315, Academic Press, New York.

Coffey, DS; Shimazaki, J; Williams-Ashman, HG. (1968). Polymerization of deoxyribonucleotides in relation to androgen-induced prostatic growth. *Arch.Biochem.Biophys.*, 124: 184 - 189.

Cohen, P. (1985). The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity. *Eur.J.Biochem.*, 151: 439 - 448.

Cooke, BA; Janszen, FHA; van Driel, MJA; van der Molen, HJ. (1979). Evidence for the involvement of lutropin-independent RNA synthesis in Leydig cell steroidogenesis. *Mol.Cell.Endocr.*, 14: 181 - 189.

Corpéchet, C; Baulieu, EE; Robel, P. (1981). Testosterone, dihydrotestosterone and androstane diols in plasma, testes and prostates of rats during development. *Acta Endocrin.*, 96: 127 - 135.

Costlow, ME. (1987). Prolactin interaction with its receptors and the relationship to the subsequent regulation of metabolic processes. En: *Actions of Prolactin on Molecular Processes*, (Rillema, JA, Ed), CRC Press, pag. 5 - 26.

Costlow, ME; McGuire, WL. (1977). Autoradiographic localization of the binding of ^{125}I -labelled PRL to rat tissues in vitro. *J. Endocr.*, 75: 221 - 227.

Crozat, A; Palvimo, JJ; Julkunen, M; Jänne, OA. (1992). Comparison of androgen regulation of ornithine decarboxylase gene expression in rodent kidney and accessory sex organs. *Endocrinology*, 109: 1254 - 1258.

Chandrashekar, V; Bartke, A. (1988). Influence of endogenous prolactin on the luteinizing hormone stimulation of testicular steroidogenesis and the role of prolactin in adult male rats. *Steroids*, 51: 559 - 576.

Chandrashekar, V; Bartke, A; Wagner, TE. (1988). Endogenous human growth hormone (GH) modulates the effect of gonadotropin-releasing hormone on pituitary function and the gonadotropin response to the negative feedback effect of testosterone in adult male transgenic mice bearing human GH gene. *Endocrinology*, 123: 2717 - 2722.

Charpenet, G; Tache, Y; Forest, MG; Haour, F; Saez, JM; Bernier, M. (1981). Effects of chronic intermittent immobilization stress on rat testicular androgenic function. *Endocrinology*, 109: 1254 - 1258.

Charreau, EH; Attramadal, A; Torjensen, PA; Purvis, K; Calandra, RS; Hansson, V. (1977). Prolactin binding in rat testis. A specific receptors in interstitial cells. *Mol. Cell. Endocr.*, 6: 303 - 307.

Chase, DJ; Payne, AH. (1985). Prolactin involvement in regulation of testicular 5 α -reductase activity in the immature rat. Biol. Reprod., 33: 637 - 643.

Chemes, HE; Gottlieb, SE; Pasqualini, E; Domenchini, MA; Rivarola, MA; Bergada, C. (1985). Response to acute hCG stimulation and steroidogenic potential of Leydig cell fibroblastic precursors in humans. J.Androl., 6: 102 - 112.

Chowdhury M; Steinberger, A; Steinberger, E. Inhibition of the novo synthesis of FSH by the Sertoli cell factor (SCF). Endocrinology, 103: 644 - 657.

Christensen, AK. (1975). Leydig cells. En: Handbook of Physiology. (Geiger, SR, Ed.), Sección 7, Vol. V, Cap. 3.

Dadaune, JP. (1985). Functional Morphology of the seminal vesicle epithelium. Prog.Reprod.Biol.Med., 12: 18 - 35.

Danzin, C; Jung, MJ; Claverie, N; Grove, J, Sjoerdsma, A; Koch-Weser, J. (1979). Effects of α -difluoromethylornithine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, on testosterone-induced regeneration of prostate and seminal vesicle in castrated rats. Biochem.J., 180: 507 - 513.

Davies, TF; Katikinemi, M; Chan, V; Harwood, JP; Dufau, ML; Catt, KJ. (1980). Lactogenic receptor regulation in hormone-stimulated steroidogenic cells. Nature, 283: 863 - 865.

Davis, RH. (1990). Management of polyamine pools and the regulation of ornithine decarboxylase. J.Cell.Biochem., 44: 199 - 205.

Davis, RH; Morris, DR; Coffino, P. (1992). Sequestered end products and enzyme regulation : the case of ornithine decarboxylase. Microbiol Rev., 56: 280 - 290.

De-Jong, RAP; van der Schoot, P. (1979). Advancement of sexual maturation in male rats by pituitary transplants. *Biol.Reprod.*, 2: 1263 - 1271.

de Kretser, DM; Kerr, JB. (1988). The cytology of the testis. En: *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E; Neill y col., Eds). Raven Press, New York, Vol. 1, Cap. 20.

de las Heras, MA. (1989). Regulación hormonal del metabolismo de poliaminas en tejidos testicular y epididimario. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

de las Heras, MA; Calandra, RS. (1986). Circadian rhythm decarboxylase activity in rat testis. *Horm.Metabol.Res.*, 18: 792 - 793.

de las Heras, MA; Calandra, RS. (1987). Androgen-dependence of ornithine decarboxylase in the rat epididymis. *J.Reprod.Fert.*, 79: 9 - 14.

de las Heras, MA; Calandra, RS. (1992). Acute effect of prolactin on ornithine decarboxylase activity in the rat testis. *Arch. Androl.*, 29: 271 - 279

Deslypere JP; Sayed, A; Punjabi, U; Verdonck L; Vermeulen, A. (1982). Plasma 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol and urinary 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol glucuronide, parameters of peripheral androgen action: a comparative study. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 54: 386 - 391.

Djöseland, O; Hoglo, S; Abyholm, T; Haugen, HN. (1981). Androgen metabolism by rat epididymis. 8. Age dependent changes in androgen metabolizing enzymes in rat accessory sex organs. *Arch.Androl.*, 6: 229 - 238.

Dohler, KD; Wuttke, W. (1974). Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology*, 94: 1003 - 1008.

Dorn, A; Muller, M; Berstein, HG; Pajunen, A; Jarvinen, M. (1985). Rat prostate gland: a good model for demonstration of ornithine decarboxylase by immunohistochemistry. *Histochem.J.*, 17: 731 - 733.

Dorrington, JH; Fritz, IB. (1975). Cellular localization of 5 α -reductase and 3 α -hydroxy-steroid dehydrogenase in the seminiferous tubule of the rat testis. *Endocrinology*, 96: 879 - 889.

Drombrowicz, D; Sente, B; Closset, J; Hennen, G. (1992). Dose-dependent effects of human prolactin on the immature hypophysectomized rat testis. *Endocrinology*, 130: 695 - 700.

Duffau, ML; Watanabe, K; Katt, KJ. (1973). Stimulation of cyclic AMP Production by the rat testis during incubation with hCG in vitro. *Endocrinology*, 92: 6 - 11.

Dym, M; Fawcett, DW. (1970). The blood testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.*, 3: 308 - 326.

Ekker, M; Sourkes, TL. (1987). Developmental pattern of ornithine decarboxylase activity, S-adenosylmethionine decarboxylase, and polyamines of rat adrenal glands. *Biol. Neonate*, 51: 260 - 267.

Eldridge, JC; Mahesh, VB. (1974). Pituitary-gonadal axis before puberty. Evaluation of testicular steroids in the male rat. *Biol.Reprod.*, 11: 385 - 397.

Ellis, GB; Desjardin, C. (1982). Male rats secrete luteinizing hormone and testosterone episodically. *Endocrinology*, 110: 1618 - 1627.

Everett, JW. (1956). Functional corpora lutea maintained for months by autografts of rat hypophysis. *Endocrinology*, 58: 786 - 792.

Ewing, LL; Zirkin, B. (1983). Leydig cell structure and steroidogenic function. *Rec.Prog.HormRes.*, 39: 599 - 635.

Fang, VS; Refetoff, S. (1978). Heterogeneous hPRL from a giant pituitary tumor in a patient with panhypopituitarism. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 47: 780 - 787.

Fisher, M; Steinberger, E. (1971). In vitro progesterone metabolism by rat testicular tissue at different stages of development. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, 68: 285 - 292.

Fjösne, HE; Strand, H; Ostensen, MA; Sunde, A. (1988). Ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase activity in the accessory sex organs of intact, castrated and androgen-stimulated castrated rats. *The Prostate*, 12: 309 - 320.

Fjösne, HE; Ostensen, MA; Haarstad, H; Sunde, A. (1990). Androgen regulation of polyamine synthesis in seminal vesicle and in different lobes of the rat prostate. *The Prostate*, 17: 1 - 11.

Folk, JE; Park, MH; Chung, SI; Schrode, J; Lester, EP; Cooper, HL. (1980). Polyamines as physiological substrates for transglutaminases. *J.Biol.Chem.*, 255: 3695 - 3700.

Folman, Y; Ahmad, N; Sowell, JG; Eik-Nes, KB. (1973). Formation in vitro of 5 α -dihydrotestosterone and other 5 α -reduced metabolites of ³H-testosterone by the seminiferous tubules and interstitial tissue from immature and mature rat testes. *Endocrinology*, 92: 41 - 47.

Forchielli, E; Dorfman, RI. (1956). Separation of delta 4-5 α - and delta 4-5 β -hydrogenases from rat liver homogenates. *J.Biol.Chem.*, 223: 443 - 448.

Francis, GL; Triche, TJ; Brown, TJ; Brown, HC; Bercu, BB. (1981). "In vitro" gonadotrophin stimulation of bovine Sertoli cells ornithine decarboxylase activity. *J.Androl.*, 2: 312 - 320.

Franchimont, P; Verstraelen-Proyard, J; Hazee-Hagelstein, MT; Renard, Ch; Demoulin, A; Bourguignon, JP; Hustin, J. (1979). Inhibin: from concept to reality. *Vttam.Horm.*, 39: 243 - 302.

Fung, MC; Wah, GC; Odell, WD. (1989). Effects of prolactin on luteinizing hormone-stimulated testosterone secretion in isolated perfused rat testis. *J. Androl.*, 10: 37 - 42.

Gallon, Ch; Veyssiere, G; Berger, M; Jean-Foucher, Ch; de Turckheim, M; Jean, C. (1989). Age-related changes in the concentration of cytosolic androgen receptors in the epididymis, vas deferens and seminal vesicle of maturing male mice. *J. Androl.*, 10: 188 - 194.

Goldman, AS; Kringle, DA. (1974). Development defects of testicular morphology and steroidogenesis in the male rat pseudohermaphrodite and response to testosterone and dehidotestosterone. *Endocrinology*, 94: 1 - 16.

Goyns, MH. (1982). The role of polyamines in animal cell physiology. *J. Theor. Biol.*, 97: 577 - 589.

Hafiez, AA; Bartke, A; Lloyd, CW. (1972a). The role of prolactin in the regulation of the testis function: the synergistic effects of prolactin and luteinizing hormone on the incorporation of [1-¹⁴C]-acetate into testosterone and cholesterol by testes from hypophysectomized rats in vitro. *J. Endocr.*, 53: 223 - 230.

Hafiez, AA; Lloyd, CW; Bartke, A. (1972 b). The role of prolactin in the regulation of testis function: the effect of prolactin and luteinizing hormone on the plasma levels of testosterone and androstenedione in hypophysectomized rats. *J. Endocr.*, 52: 327 - 332.

Hafiez, AA; Philpott, JE; Bartke, A. (1971). The role of prolactin in the regulation of testicular function: the effect of prolactin and luteinizing hormone on 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the testes of mice and rats. *J. Endocr.*, 50: 619 - 623.

Hall, PF. (1984). Cellular Organization for steroidogenesis. *Int.-Rev. Cytol.*, 86: 53 - 95.

Hall, PF. (1988). Testicular steroid synthesis: Organization and Regulation. In: *Physiology of Reproduction* (Knobil, E.; Neil, J y col., Eds), Raven Press, New York, Vol. 2, Cap. 20.

Halmekytö, M; Alhonen, L; Wahlfors, J; Senervirta, R; Eloranta, T; Jänne, J. (1991). Characterization of a transgenic mouse line over-expressing the human ornithine decarboxylase gene. *Biochem.J.*, 278: 895 - 898.

Hannonen, P; Raina, A; Jänne, J. (1972). Polyamine synthesis in the regenerating liver: stimulation of S-adenosylmethionine decarboxylase, and spermidine and spermine synthases after partial hepatectomy. *Biochim.Biophys.Acta*, 273: 84 - 90.

Heby, O. (1981). Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation*, 14: 1 - 20.

Hölttä, E; Jänne, J. (1972). Ornithine decarboxylase activity and the accumulation of putrescine at early stages of liver regeneration. *FEBS Lett.*, 23: 117 - 121.

Hostetter, MW; Piacsek, BE. (1972). The effects of prolactin deficiency during sexual maturation in the male rat. *Biol.Reprod.*, 18: 574 - 577.

Hougaard, DM; Larsson, LI. (1989). Polyamines, molecules necessary for cell division, colocalize with peptide growth factors. *Eur.J.-Cell.Biol.*, 48: 14 - 18.

Hu, ZY; Bourreau, E; Jung-Testas, I; Robel, P; Baulieu, EE. (1987). Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 84: 8215 - 8219.

Huhtaniemi, IT; Nozu, K; Warren, DW; Dufau, ML; Catt, KJ. (1982). Acquisition of regulatory mechanisms for gonadotropin receptors and steroidogenesis in the maturing rat testis. *Endocrinology*, 111: 1711 - 1720.

Inano, H; Tamaoki, BI. (1966). Bioconversion of steroids in immature rat testis in vitro. *Endocrinology*, 79: 579 - 590.

Isomaa, VV; Pajunen, AEI; Bardin, CW; Janne, OA. (1983). Ornithine decarboxylase in mouse kidney: purification, characterization and radioimmunological determination of the enzyme protein. *J. Biol.-Chem.*, 258: 6735 - 6738.

Janecki, A; Pawlowski, A; Lukaszyk, A; Kozak, W. (1984). The modified method for isolation and culture of highly homogenous Leydig cell population from rat testes. *Folia Histochem.Cytobiol.*, 22: 179 - 186.

Jänne, J. (1967). Studies on the biosynthetic pathway of polyamines in the rat liver. *Acta Physiol.Scand.Suppl.*, 300: 1 - 71.

Jänne, J; Pösö, H; Raina, A. (1978). Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochem.Biophys.Acta*, 473: 241 - 293.

Käpyhao, K; Jänne, J. (1982). Regulation of putrescine metabolism in Ehrlich ascites carcinoma cells exposed to hypotonic medium. *Biochim.Biophys.Acta*, 714: 93 - 100.

Katovich, M.J.; Cameron, DF; Murray, F.T.; Gunsalus, GL. (1985). Alterations of testicular function induced by hyperprolactinemia in the rat. *J.Androl.*, 6: 179 - 189.

Keenan, EJ; Klase, PA; Thomas, JA. (1981). Interaction between prolactin and androgens in the accessory sex organs of male mice. *J.Endocr.*, 90: 323 - 330.

Kelly, PA; Djiane, J; Edery, M. (1992). Different forms of the prolactin receptor. Insights into the mechanism of prolactin action. *Trends Endoc. Metab.*, 3: 54 - 59.

Ketelslegers, JM; Hetzel, WD; Sherins, RJ; Catt, KJ. (1978). Developmental changes in testicular gonadotropins and plasma testosterone in the rat. *Endocrinology*, 103: 212 - 222.

Klemcke, HG; Bartke, A. (1981). Effects of chronic hyperprolactinemia in mice on plasma gonadotropin concentrations and testicular human chorionic gonadotropin binding sites. *Endocrinology*, 108: 1763 - 1768.

Labarca, C; Paigen, K. (1980). A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Analyt. Biochem.*, 102: 344 - 352.

Lacy, D. (1974). Steroid metabolism by the interstitium and seminiferous tubules of the testes in vitro. Studies on the rat during development and in the adult in the absence of the boundary tissue. En: *Male Fertility and Sterility*, (Eds. Mancini, RE; Martini, L) , pag. 1975 - 1981, Academic Press, New York.

Lambeth, JD; Green, LM; Millett, F. (1984). Adrenodoxin interaction with adrenodoxin reductase and cytochrome P-450 SCC. *J.Biol.Chem.*, 259: 10025 - 10031.

Larrea, F; Escorza, A; Granados, J; Valencia, X; Valerio, A; Cravio-to, MC; Perez palacios, G. (1987). Familial occurrence of Big-Big prolactin as the predominant immunoreactive human prolactin species in blood. *Fertil.Steril.*, 47: 956 - 963.

Levey, HA; Szego, CM. (1955). Metabolic characteristics of the guinea pig seminal vesicle. *Am.J.Physiol.*, 182: 507 - 512.

Levy, H; Deane, HW; Rubin, BL. (1959). Visualization of steroid 3 β -ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology*, 65: 932 - 943.

Lewis, VJ; Singh, RNP; Seavey, BK. (1971). Human prolactin: isolation and some properties. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 44: 1169 - 1176.

Li, CC. (1964). Introduction to experimental statistics. Mc Graw-Hill Eds. New York.

Loosfelt, H; Misrahi, M; Atger, M; Salesse, R; Thi, MTVH-L; Jolivet, A; Guiochon-Mantel, A; Sar, S; Jallal, B; Garnier, J; Milgrom, E. (1989). Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science* 245: 525 - 528.

Lorand, L; Conrad, SM. (1984). Transglutaminases. *Mol.Cell.Biochem.*, 58: 9 - 35.

Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL; Randall, RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.*, 193: 265 - 275.

Lundmo, PI; Sunde, A; Tveter, KJ. (1985). Metabolism of androgens in the seminal vesicles and the different lobes of the prostate in young mature rats. *J.Steroid.Biochem.*, 22: 513 - 519.

Lüthy, IA; Tesone, M; Oliveira-Filho, RM; Somoza, GM; Charreau, EH; Libertum, C; Calandra, RS. (1985). Effect of median eminence lesions and hormonal replacement on the prolactin receptors in the adrenal gland and Langherhans islets from ovariectomized rats. *J.Recep.Res.*, 5: 105 - 119.

Madhubala, R; Reddy, PRK. (1980). Stimulation of ornithine decarboxylase activity by prostaglandins in the isolated cells of immature rat testis. *Febs.Lett.*, 122: 197 - 198.

Madhubala, R; Reddy, PRK. (1981). Effect of catecholamines on ornithine decarboxylase activity in the testis of immature rat. *Biochem. Biophys.Res.Comm.*, 102: 1096 - 1103.

Madhubala, R; Shubhada, S; Steinberger, A; Tsai, YH. (1987). Inhibition of ornithine decarboxylase activity by follicle stimulating hormone in primary culture of rat Sertoli cells. *J.Androl.*, 8: 383 - 387.

Marcote, MJ; Gonzales-Bosch, C; Miralles, VJ; Hernandez-Yago, J; Grisolia, S. (1989). Polyamines are sufficient to drive the transport of the precursor of ornithine carbamoyltransferase into rat liver mitochondria: Possible effect on mitochondrial membranes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 158: 287 - 293.

Mariotti, A; Mawhinney, M. (1982). The hormonal maintenance and restoration of guinea pig seminal vesicle fibromuscular stroma. *J.Urol.*, 128: 852 - 857.

Marton, LJ; Morris, DR. (1987). Molecular and Cellular Functions of the Polyamines. En: *Inhibition of Polyamine Metabolism*, (McCann, PP; Pegg, AE; Sjoerdsma, A; Ed.). Academic Press, 79 - 105.

Mather, JP; Sato, GE. (1979). The use of hormone-supplemented serum-free media in primary cultures. *Expl.Cell.Res.*, 124: 215 - 221.

Mazzocchi, G; Cavallini, L; Kasprzak, A; Rebuffat, P; Nussdorfer, GG. (1990). Effects of prolactin on the morphology and function of rat Leydig cells: short-term versus long-term administration. *Cell.Tissue Res.*, 262: 41 - 46.

McCann, PP; Tardif, C; Mamont, PS; Schuber, F. (1975). Biphasic induction of ornithine decarboxylase and putrescine levels in growing HTC cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 64: 336 - 342.

McFarland, KC; Sprengel R; Phillips, HS; Koher, M; Roseblit, N; Nikolics, K; Segaloff, DL; Seeburg, PH. (1989). Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science*, 245: 494 - 499.

McGuire, JS Jr; Hollis, VW Jr; Tomkins, GM. (1960). Some characteristics of the microsomal steroid reductases (5α) of rat liver. *J.Biol.Chem.*, 235: 3112 - 3117.

McGuire, JS Jr; Tomkins, GM. (1960). The mechanism of double bond saturation in delta 4-3 ketosteroids. *Federation Proc.*, 19: 29. Res. # 24.

McNeilly, As; Sharpe, RM; Davidson, DW; Fraser, HM. (1978). Inhibition of gonadotrophin secretion by induced hyperprolactinemia in the male rat. *J.Endocr.*, 79: 59 - 68.

McNeilly, A; Sharpe, RM; Fraser, HM. (1983). Increased sensitivity to the negative feedback effects of testosterone induced by hyperprolactinemia in the adult male rat. *Endocrinology*, 112: 22 - 28.

Mendelson, C; Dufau, ML; Catt, KJ. (1975). Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3'-5' monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells. *J.Biol.Chem.*, 250: 8818 - 8823.

Moger, WH; Armstrong, DT. (1974). Steroid metabolism by the immature rat testis. *Can.J.Biochem.*, 52: 744 - 750.

Moger, WH. (1977). Serum 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol, androsterone and testosterone concentrations in the male rat. Influence of age and gonadotropin stimulation. *Endocrinology*, 100: 1027 - 1032.

Mooradian, AD; Moorley, JE; Korenman, SG. (1987). Biological actions of androgens. *Endocr.Rev.*, 8: 1 - 27.

Moore, DD; Walker, MD; Diamond, DJ; Conckling, MA; Goodman, HM. (1982). Structure, expression, and evolution of growth hormones genes. *Recent.Prog.Horm.Res.*, 38: 197 - 225.

Morano, MI. (1987). Estudios sobre la biosíntesis y secreción de ACTH y péptidos relacionados en el tumor productor de PRL-ACTH, 7315a. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Morgan, DML. (1985). Polyamine oxidases. *Biochem.Soc.Trans.*, 13: 322 - 326.

Morgan, DML. (1989). Polyamine oxidases and oxidized polyamines. En: *The Physiology of Polyamines* (Bachrach, U; Heimer, YM, Eds). Vol.1. pag. 203 - 229, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Morimoto, I; Edmiston, A; Hawks, D; Horton, R. (1981). Studies on the origin of androstanediol and androstanediol glucuronide in young and elderly men. *J.Clin.Endocrin.Metab.*, 52: 772 - 778.

Morris, PL; Cheng, CY; Bardin, CW. (1987). Identification of prolactin-responsiveness proteins in Leydig cell-enriched media. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 513: 390 - 392.

Morris, P; Saxena, BB. (1980). Dose- and age-dependent effects of prolactin on luteinizing hormone- and prolactin-binding sites in rat Leydig cell homogenates. *Endocrinology*, 107: 1639 - 1645.

Munabi, AK; Meriq, V; Gelato, MC; Koppelman, MCS, Albertson, BD; Loriaux, DL; Cassorla, F. (1985). The effects of PRL on rat testicular steroidogenesis enzyme activities. *Horm. Metabol. Res.*, 17: 47 - 48.

Murono, EP. (1989). Maturational changes in steroidogenic enzyme activities metabolizing testosterone and dihydrotestosterone in two populations of testicular interstitial cells. *Acta Endocrin. (Copenh.)*, 121: 477 - 483.

Murono, EP; Washburn, AL. (1990). Regulation of 5 α -reductase activity in cultures immature Leydig cells by human chorionic gonadotropin. *J.Steroid Biochem.*, 35: 715 - 721.

Murono, EP, Payne, AH. (1979). Testicular maturation in the rat. In vivo effect of gonadotropins on steroidogenic enzymes in the hypophysectomized immature rat. *Biol.Reprod.* 20: 911 - 917.

Nakhla, AM; Tam, JP. (1985). Transforming growth factor is a potent stimulator of testicular ornithine decarboxylase in immature mouse. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 132: 1180 - 1186.

Nayfeh, SN; Coffey, JC; Hansson, V; French, FS. (1975). Maturational changes in testicular steroidogenesis: hormonal regulation of 5 α -reductase. *J.Steroid Biochem.*, 6: 329 - 335.

Negro-Vilar, A. (1980). Prolactin and the growth of prostate and seminal vesicles. En: *Male accessory sex glands*. Spring-Mills, E. & Hafez, ESE, Eds (Elvesier, North Holland Biomedical Press, pag. 223 - 233.

Negro-Vilar, A; Krulich, I; McCann, SM. (1973) Changes in serum prolactin and gonadotropin during sexual development of the male rat. *Endocrinology*, 93: 660 - 664.

Negro-Vilar, A; Saad, WA; McCann, SM. (1977). Evidence for a role of prolactin in prostate and seminal vesicle in immature rats. *Endocrinology*, 100: 729 - 737.

Nicchitta, CV; Williamson, JR. (1984). Spermine. A regulator of mitochondrial calcium cycling. *J.Biol.Chem.*, 259: 12978 - 12983.

Nicoll, Ch S. (1980). Ontogeny and evolution of prolactin's function. *Fed.Proc.*, 39: 2563 - 2566.

Nicholson, WE; Levine. JH; Orth, DN (1976). Hormonal regulation of renal ornithine decarboxylase activity in the rat. *Endocrinology*, 98: 123 - 128.

Niemi, M; Sharpe, RM; Brown, WRA. (1986). Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell.Tiss.Res.*, 243: 337 - 344.

Nonomura, M; Hoshino, K; Harigaya, T; Hashimoto, H; Yoshida, O. (1985). Effects of hyperprolactinemia on reproduction in male mice. *J.Endocr.*, 107: 71 - 76.

Normington, K; Russell, DW. (1992). Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 α -reductase isozymes. *J.Biol.Chem.*, 267: 19548 - 19554.

Odell, WD; Swerdloff, RS. (1976). Etiologies of sexual maturation: A model system based on the sexually maturing rat. *Rec. Prog.Horm.-Res.*, 32: 245 - 288.

Odell; WD; Swerdloff, RS; Jacobs, HS; Hescox, MA. (1973). FSH induction of sensitivity to LH: One cause of sexual maturation in the male rat. *Endocrinology*, 92: 160 - 165.

Ojeda, SR; Ramirez, VD. (1972). Plasma levels of LH and FSH in maturing rats: response to hemigonadectomy. *Endocrinology*, 90: 466 - 472.

Oka, P; Perry, JW. (1976). Studies on regulatory factors of ornithine decarboxylase activity during development of mouse mammary epithelium in vitro. *J.Biol.Chem.*, 251: 1738 - 1744.

Oka, T; Perry, JW; Takemoto, T; Sakai, T; Terada, N; Inoue, H. (1981). The multiple regulatory roles of polyamines in the hormonal induction of mammary gland development. En: *Advances Polyamine Research*, (Caldarera, CM; Zappia, V and Bachrach, U; Ed.) Raven Press, New York, Vol. 3, pag. 309 - 320.

Okamoto S; Takatsuka, D; Tateishi, K; Ogasawara, Y; Yamane, T. (1982). Proliferative pattern of seminal vesicle cells and the production of testosterone and 5 α -androgens from birth to adulthood in mice. *Endocrinology*, 111: 1230 - 1234.

Oshima, H; Ochiai, K. (1973) On testicular 17 β -hydroxy-steroid oxidoreductasa: Product activation of testosterone formation from androstenedione in vitro. *Biochim.Biophys.Acta*, 306: 227 - 236.

Osterman, J; Murono, EP; Lin, T; Nankin, HR. (1983). Regulation of testicular ornithine decarboxylase in vitro. *J.Androl.*, 4: 175 - 182.

Payne, AH; Kelch, RP; Murono, EP; Kerlan, JT. (1977). Hypothalamic, pituitary and testicular function during sexual maturation in the male rat. *J.Endocr.*, 72: 17 - 26.

Pegg, AE. (1974). Purification of rat liver S-adenosyl-L-methionine decarboxylase. *Biochem.J.*, 141: 581 - 583.

Pegg, AE. (1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.*, 234: 249 - 262.

Pegg, AE. (1988). Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res.*, 48: 759 - 774.

Pegg, AE; Conover, C; Wrona, A. (1978). Effects of aliphatic diamines on rat liver ornithine decarboxylase activity. *Biochem.J.*, 170: 651 - 660.

Pegg, AE; Lockwood, DH; Williams-Ashman, HG. (1970). Concentrations of putrescine and polyamines and their enzymic synthesis during androgen-induced prostatic growth. *Biochem. J.*, 117: 17 - 31.

Pegg, AE; McCaan, PP. (1982). Polyamine metabolism and function. *Am.J.Physiol.*, 243: C212 - C221.

Pegg, AE; Williams-Ashman, HG. (1968). Stimulation of the decarboxylation of S-adenosylmethionine by putrescine in mammalian tissues. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 30: 76 - 82.

Peng, WW; Wisner, JR Jr; Warren, DW. (1979). Testicular 3 α -hydroxysteroid oxidoreductase in the developing male rat. *Steroids*, 34: 101 - 110.

Piik, K; Rajamaki, P; Guha, SK; Janne, J. (1977). Regulation of L-ornithine decarboxylase and S-adenosyl-L-methionine decarboxylase in rat prostate and seminal vesicle. *Biochem.J.*, 168: 379 - 385.

Podestá, EJ; Rivarola, MA. (1974). Concentrations of androgens in whole testis, seminiferous tubules and interstitial tissue of rats at different stages of development. *Endocrinology*, 95: 455 - 461.

Posner, BI; Kelly, PA; Friesen, HG. (1974). Induction of lactogenic receptor in rat liver: influence of estrogens and the pituitary. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 71: 2407 - 2410.

Posner, BI; Kelly, PA; Friesen, HG. (1975). Prolactin receptors in rat liver: possible induction by PRL. *Science*, 188: 317 - 325.

Pösö, H; Pegg, AE. (1982). Effect of carbon tetrachloride on polyamine metabolism in rodent liver. *Arch.Biochem.Biophys.*, 217: 730 - 737.

Poulin, R; Wechter, RS; Pegg, AE. (1991). An early enlargement of the putrescine pool is required for growth in L1210 mouse leukemia cells under hypoosmotic stress. *J.Biol.Chem.*, 266: 6142 - 6151.

Preslock, JP. (1980). Steroidogenesis in the mammalian testis. *Endocr.Rev.*, 1: 132 - 139.

Prins, G. (1989). Differential regulation of androgen receptors in the separate rat prostate lobes: androgen independent expression in the lateral lobe. *J.St.Biochem.*, 33: 319 - 326.

Raina, A; Eloranta, T; Pajula, R; Mantyjarvi, R; Tuomi, K. (1987). En: *Polyamines in Biomedical Research*, (Ed. J.M.Gaujas), pag. 35 - 49, John Wiley, New York.

Raina, A; Jänne, J. (1975). Physiology of the natural polyamines putrescine, spermidine and spermine. *Med.Biol.*, 53: 121 - 147.

Ramirez-Gonzalez, D; Tyszewicz, EW; Almazan, G; Sourkes, TL. (1981). Effect of cold, restraint, reserpine, and splanchnicotomy on the ornithine decarboxylase activity of rat adrenal medulla and cortex. *Exp.Neurol.*, 73: 632 - 641.

Reddy, BV; Madhubala, R; Reddy, PRK. (1986). Stimulation of ornithine decarboxylase activity by arginine vasopressin. *Biochem.Int.*, 13: 109 - 114.

Reddy, PRK; Vिलlee, CA. (1975). Stimulation of ornithine decarboxylase activity by gonadotropic hormones and cyclic AMP in testis of immature rats. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 65: 1350 - 1354.

Rhodes, JB; Williams-Ashman, HG. (1964). Observations on polyamines in male accessory glands of reproduction. *Med. Exp.*, 10: 281 - 265.

Richards, JF. (1975). Ornithine decarboxylase activity in tissues of prolactin-treated rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 63: 292 - 296.

Richards, G; Neville, AM. (1973). Conversion of 4-¹⁴C/5 α -pregnane-3,20-dione to 5 α -C₁₉-steroids in the prepubertal rat testis. *J.Endocr.*, 59: 185 - 186.

Rillema, JA. (1980). Mechanism of prolactin action. *Feder.Proc.*, 39: 2593 - 2598.

Rillema, JA. (1985). Prolactin stimulation of ornithine decarboxylase activity in the mammary gland may involve an activation of protein kinase C. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 178: 490 - 494.

Ritchie, AWS; Hargreave, TB; James, K; Chisholm, GD. (1984). Intraepithelial lymphocytes in the normal epididymis. A mechanism for tolerance to sperm auto-antigens. *Br.J.Urol.*, 56: 79 - 83.

Rittmaster, RS; Leopold, CA; Thompson, DL. (1988). Preferential metabolism of dihydrotestosterone to androstanediol 17-glucuronide in rat prostate. *Endocrinology*, 123: 2788 - 2792.

Rivarola, MA; Podestá, EJ. (1972). Metabolism of testosterone-¹⁴C by seminiferous tubules of mature rats: Formation of 5 α -androstan-3 α , 17 β -diol-¹⁴C. *Endocrinology*, 90: 618 - 623.

Rivarola, MA; Podestá, EJ; Chemes, HE. (1972). In vitro testosterone-¹⁴C metabolism by rat seminiferous tubules at different stages of development: Formation of 5 α -Androstanediol at meiosis. *Endocrinology*, 91: 537 - 542.

Rogol, AD; Rosen, SW. (1974). Prolactin of apparent large molecular size: the major immunoreactive prolactin component in plasma of a patient with a pituitary tumor. *J.Clin.Endocr.Metab.*, 38: 714 - 717.

Rommerts, FFG; van Roemburg, MJA; Lindh, LM; Hegge, JAJ; van der Molen, HJ. (1982). The effects of short-term and perfusion on LH-dependent steroidogenesis in isolated rat Leydig cells. *J.Reprod.-Fert.* 65: 289 - 297.

Rommerts, FFG. (1990). Testosterone: An overview of biosynthesis, transport, metabolism and action. En: *Testosterone: Action, Deficiency and Substitution.* (Nieschlag, E; Behre, HM, Eds), Springer Verlag, Berlin, pag. 1 - 22.

Rommerts, FFG; Cooke, BA. (1988). The mechanisms of action of luteinizing hormone. II. Transducing systems and biological effects. En: *Hormones and Their Actions. Part II,* pag 163 - 180. (Ed. Cooke, BA; van der Molen, HJ), Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam.

Rorke, EA; Kendra, KL; Katzenellenbogen, BS. (1984). Relationships among uterine growth, ornithine decarboxylase activity and polyamine levels: studies with estradiol and antiestrogens. *Mol.Cell.Endocrin.*, 38: 31 - 38.

Rui, H; Purvis K. (1987). Prolactin selectively stimulates ornithine decarboxylase in the lateral lobe of the rat prostate. *Mol.Cell.Endocr.*, 50: 89 - 97.

Russell, DH. (1973). Polyamines in growth - Normal and neoplastic. En: *Polyamines in normal and neoplastic growth.* Raven Press, New York, 1 - 13.

Russell, DH. (1985). Ornithine decarboxylase: a key enzyme in normal and neoplastic growth. *Drug Met. Rev.*, 16: 1 - 88.

Russell, DH; Durie, BGM. (1978). Mechanism of induction of ornithine decarboxylase. En: *Polyamines as Biochemical Markers of Normal and Malignant Growth.* Prog.Cancer Res.(Russell DH; Durie, GM, Eds.) Raven Press, New York; 8: 59 - 187.

Russell, DH; Larson, DF; Cardon, SB; Copeland JG. (1984). Cyclosporine inhibits prolactin induction of ornithine decarboxylase in rat tissues. *Mol.Cell.Endocr.*, 35: 159 - 166.

Saez, JM; Avallet, O; Lejeune, H; Chatelain, PG. (1991). Cell-cell communication in the testis. *Horm.Res.* 36: 104 - 115.

Samuels, LT; Bussman, L; Matsumoto, K; Huseby, RA. (1975). Organization of androgen biosynthesis in the testis. *J.Steroid. Biochem.*, 6: 291 - 296.

Scalabrino, G; Ferioli, ME. (1981). Polyamines in mammalian tumors. Part I. *Adv.Cancer Res.*, 35: 151 - 268.

Scalabrino, G; Ferioli, ME. (1982). Polyamines in mammalian tumors. Part II. *Adv.Cancer Res.*, 36: 1 - 102.

Scalabrino, G; Lorenzini, EC; Ferioli, ME. (1991). Polyamines and mammalian hormones. Part I: Biosynthesis, interconversion and hormone effects. *Mol.Cell.Endocr.*, 77: 1 - 55.

Schneider, JJ. (1952). Conversion of desoxycorticosterone to four allopregnane metabolites by rat liver in vitro. *J.Biol.Chem.*, 199: 235 - 244.

Schuber, F. (1989). Influence of polyamines on membrane function. *Biochem.J.*, 260: 1 - 10.

Seiler, N. (1983). Thin-layer chromatography and thin-layer electrophoresis of polyamines and their derivatives. *Methods Enzimol.*, 94: 3 - 9.

Seiler, N. (1987). Functions of polyamine acetylation. *Can.J.Physiol.Pharmacol.*, 65; 2024 - 2035.

Seiler, N; Bolkenius, FN; Rennert, OM. (1981). Interconversion catabolism and elimination of the polyamines. *Med. Biol.*, 59: 334 - 346.

Seiler, N; Daune, G; Bolkenius, FN; Knodgen, B. (1989). Ornithine aminotransferase activity, tissue ornithine concentrations and polyamine metabolism. *Int.J.Biochem.*, 21: 425 - 432.

Seiler, N; Heby, O. (1988). Regulation of cellular polyamines in mammals. *Acta Biochem.Biophys.Hung.*, 23: 1 - 36.

Setchell, BP; Brooks, DE. (1988). Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. En: *The Physiology of Reproduction*, (Ed. Knobil, E; Neill, J y col.), Raven Press, New York, 753 - 836.

Sharpe, RM. (1984). Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol. Reprod.*, 30: 29 - 49.

Shikita, M; Hall, PF. (1973). Cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria. An enzyme for the side-chain cleavage of cholesterol. I. Purification and properties. *J.Biol.Chem.*, 248: 5598 - 5604.

Shimazaki, J; Kato, N; Nagai, H; Yamanaka, H; Shida, K. (1972) 3α -Reduction of 5α -dihydrotestosterone by rat ventral prostate. *Endocrinol.Japon.*, 19: 97 - 106.

Shubhada, S; Daver, R; Tsai, YH. (1989). The changing profiles of L-ornithine decarboxylase and S-adenosyl-L-methionine decarboxylase activities in testicular cell types During sexual maturation of male rats. *J.Androl.*, 10: 152 - 158.

Shubhada, S; Tsai, TH. (1990). Differential effects of FSH on the activities of S-adenosyl-L-methionine decarboxylase and ornithine decarboxylase in rat Sertoli cells. *J.Androl.*, 11: 414 - 421.

Sinha, YN. (1992). Prolactin variants. *Trends Endoc.Metab.*, 3: 100 - 106.

Slabaugh, ML; Lieberman, ME; Rutledge, JJ; Gorski, J. (1981). Growth hormone and prolactin synthesis in normal and homozygous Snell and Ames dwarf mice. *Endocrinology*, 109: 1040 - 1046.

Sowell, JG; Folman, Y; Eik-Nes, KB. (1974) Androgen metabolism in rat testicular tissue. *Endocrinology*, 94: 346 - 354.

Stastny, M; Cohen, S. (1972). The stimulation of ornithine decarboxylase in testes of the neonatal mouse. *Biochem.Biophys.Acta*, 261: 177 - 180.

Steiberger, E; Fisher, M. (1969). Differentiation of steroid biosynthetic pathways in developing testes. *Biol. Reprod. (Suppl.)* 1: 119 - 133.

Stricker, P; Greuter, R. (1928). Action du lobe anterieur de l'hypophyse sur la mont'ee laiteuse. *C.R.Soc.Biol.*, 99: 1978 - 1983.

Suescun, MO; Gonzalez, SI; Chiauzzi, VA; Calandra, RS. (1985). Effects of induced hypoprolactinemia on testicular function during gonadal maturation in the rat. *J.Androl.*, 6: 77 - 82.

Sunkara, PS; Ramakrishna, S; Nishioka, K; Rao, PN. (1981). The relationship between levels and rates of synthesis of polyamines during mammalian cell cycle. *Life Sci.*, 28: 1497 - 1506.

Syms, AJ; Harper, ME; Griffiths, K. (1985). The effect of PRL on human BPH epithelial cell proliferation. *The prostate*, 6: 145 - 153.

Tabor, CW; Tabor, H. (1976). 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. *Annu.Rev.Biochem.*, 45: 285 - 306.

Tabor, CW; Tabor, H. (1984). Polyamines. *Ann.Rev.Biochem.*, 53: 749 - 790.

Tabor, CW; Tabor, H. (1985). Polyamines in microorganism. Microbiol.Rev., 49: 81 - 99.

Takeyama, M; Nagareda, T; Takatsuka, D; Namiki M; Koizumi, K; Aono, T; Matsumoto, K. (1986). Stimulatory effect of prolactin on luteinizing hormone-induced testicular 5α -reductase activity in hypophysectomized adult rats. Endocrinology, 118: 2268 - 2275.

Thomas, AP; Diggle, TA; Denton, RM. (1986). Sensitivity of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase to magnesium ions. Similar effects of spermine and insulin. Biochem.J., 238: 83 - 91.

Thomas, JA; Keenan, EJ. (1976) Prolactin influences upon androgen action in male accessory sex organs. Adv.Sex.Horm. Res. 2: 425 - 470.

Tomkins, GM. (1957). The enzymatic reduction of delta 4-3-ketosteroids. J.Biol.Chem., 225: 13 - 24.

Trager, L. (1977). Steroid-Hormone Biosynthesis., Stoffwechsel, Wirkung. Springer verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pag. 164 - 197.

Turner, CD; Bagnara, JT. (1976). General Endocrinology. JWB Saunders, Philadelphia.

Ueda, T; Takeyama, M; Namiki, M; Okuyama, A; Aono, T; Matsumoto, K. (1987). Effects of hyperprolactinemia on FSH- or LH-induced activities of 17β -hydroxylase in hypophysectomized rat testes. Endocrinol. Japon., 34: 577 - 585.

van Haren, L; Cailleau, J; Rommerts, FFG. (1989). Measurement of steroidogenesis in rodent Leydig cells: a comparison between pregnenolone and testosterone production. Mol.Cell.Endocr., 65: 157 - 164.

van Noort, M; Rommerts, FFG; van Amerongen, A; Wirtz, KWA. (1988). Intracellular redistribution of SCP2 in Leydig cells after hormonal stimulation may contribute to increased pregnenolone production. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 154: 60 - 65.

Verhoeven, G. (1992). Local control system within the testis. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 6: 313 - 333.

Voigt, W; Fernandez, EP; Hsia, SL. (1970). Transformation of testosterone into 17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one by microsomal preparations of human skin. *J.Biol.Chem.*, 245: 5594 - 5599.

Waeber, C; Reymond, O; Reymond, M; Lemarchand-Beraud, T. (1983). Effects of hyper- and hypoprolactinemia on gonadotropin secretion, rat testicular luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors and testosterone production by isolated Leydig cells. *Biol. Reprod.*, 28: 167 - 177.

Weber, RFA; Ooms, MP; Vreeburg, JTM. (1982). Effects of a prolactin- and adrenocorticotropin-secreting Tumor on gonadotropin levels and accessory sex organ weights in adult male rats: a possible role of the adrenals. *Endocrinology*, 111: 412 - 417.

Welsh, MJ; Wiebe, JP. (1978). Sertoli cell capacity to metabolize C19 steroids. Variations with age and the effect of FSH. *Endocrinology*, 103: 838 - 843.

Welsh, TH; Kasson, BG; Hsueh, AJW. (1986). Direct biphasic modulation of gonadotropin-stimulated testicular androgen biosynthesis by prolactin. *Biol. Reprod.*, 34: 796 - 804.

Whittaker, P; Wilcox, T; Lind, T. (1981). Maintained fertility in a patient with hyperprolactinemia due to Big-Big prolactin. *J.Clin.-Endocr.Metab.*, 53: 863 - 866.

Wiebe, JP. (1976). Steroidogenesis in rat Leydig cells: Changes in activity of 5-ane and 5-ene 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases during sexual maturation. *Endocrinology*, 98: 505 - 513.

Wiebe, JP. (1978). Steroidogenesis in rat Leydig cells: changes in activity of 5-ane and 5-ene 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases during sexual maturation. *Endocrinology*, 102: 775 - 784.

Williams-Ashman, HG; Canellakis, Z. (1979). Polyamines in mammalian biology and medicine. *Perspect.Biol.Med.*, 22: 44 - 51.

Williams-Ashman, HG; Canellakis, Z. (1980). Transglutaminase-mediated covalent attachment of polyamines to proteins: mechanism and potential physiological significance. *Physiol.Chem.Phys.*, 12: 457 - 472.

Williams-Ashman, HG; Lockwood, DH. (1970). Role of polyamines in reproductive physiology and sex hormone action. *Ann.N.Y. Acad.Sci.*, 171: 882 - 894.

Williams-Ashman, HG; Tadolini, B; Wilson, J; Corti, A. (1975). Polynucleotide polymerizations and prostate proliferation. *Vitam.-Horm.*, 33: 39 - 59.

Wilson, JD. (1975). Metabolism of testicular androgens. En *Handbook of Physiology*, (Geiger, SR, Ed), Sección 7, Vol. 5, Cap. 25.

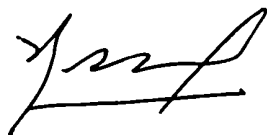
Wilson, JD; Gloyna, RE. (1970). The intranuclear metabolism of testosterone in the accessory organs of reproduction. *Rec.Prog.-Horm.Res.*, 26: 309 - 336.

Winters, SJ; Loriaux, DL. (1978). Suppression of plasma luteinizing hormone by prolactin in the male rat. *Endocrinology*, 102: 864 - 868.

Witorsh, RJ; Kitay, JI. (1972). Pituitary hormones affecting adrenal 5 α -reductase activity: ACTH, growth hormone and prolactin. *Endocrinology*, 91: 764 - 769.

Zipf, WB; Payne, AH; Kelch, RP. (1978). Prolactin, growth hormone and luteinizing hormone in the maintenance of testicular luteinizing hormone receptors. *Endocrinology*, 103: 595 - 600.

Zubin, P; Taleisnik, S. (1983). Hypothalamic cyclic-AMP throughout the 4-day estrous cycle of the female rat. *Brain Res.*, 271: 273 - 277.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'P. Zubin', written in a cursive style with a horizontal line underneath.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'S. Taleisnik', written in a cursive style with a horizontal line underneath.