

Universidad Nacional de la Plata
Facultad de Ciencias Exactas



REGULACION DE LAS CONCENTRACIONES
INTRATISULARES Y LA PRODUCCION
DE ANDROGENOS EN TESTICULO
HUMANO Y DE RATA.

TESIS

MARIA OLGA SUESCUN

Director: Dr. Ricardo Saul Calandra.
Asesor Científico: Dr. Helvio Galdeano.

1986

*Tesis
815*

COPIA

Inv. N°

6-7-99

Inv. N°

56.352

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Bioquímicas ha sido realizado en el Instituto de Biología y Medicina Experimental, Obligado 2490, Capital Federal.

A mis padres.

A mi esposo.

A mis hijos:

Gimena, Matías y Agustina.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Calandra quien dirigió esta investigación, por haber compartido verdaderamente mis esfuerzos y haberme brindado sus vastos conocimientos, que junto al constante apoyo y estímulo permitieron la realización de este trabajo de Tesis.

Al Dr. Helvio Galdeano por su colaboración como Asesor Científico.

Al Dr. Héctor Chemes por los estudios histológicos, a la Lic. Violeta Chiauzzi por las determinaciones de hormonas proteicas y al Dr. Carlos Scorticatti por su cooperación en la obtención de las muestras utilizadas.

A mis compañeros de Laboratorio, Lic. Silvia González, Lic. Marcelo de las Heras, Dra. Isabel Lüthy, Dra. Mónica Ritta y Lic. Beatriz Campos por su colaboración en algunas de las experiencias que componen esta Tesis y valiosa discusión de resultados. A la Sra. Diana Bas por su excelente apoyo técnico. A todos ellos y a las Lic. Déborah Tasat y Laura Altschuler por el clima de cooperación y amistad en que este trabajo fué realizado.

Al Dr. Marco Rivarola, Dra. Stella Campo y a todos los integrantes del Servicio de Endocrinología del Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutierrez" por haberme permitido la realización en ese lugar de las tareas correspondientes a los dos primeros años de este estudio, brindándome siempre su experiencia y desinteresada colaboración.

En forma muy especial a la Dra. Selva Cigorruga por sus valiosos consejos en la realización de esta tarea, quien siempre estuvo incondicionalmente dispuesta a ayudarme tanto en el aspecto laboral como humano.

Al Dr. Virgilio Foglia y a cada uno de los integrantes del Instituto de Biología y Medicina Experimental por haberme facilitado la cooperación necesaria para la realización de este estudio y por la cordialidad del trato diario.

A mi esposo y a todos aquellos quienes con su paciencia y colaboración hicieron posible que este trabajo de Tesis pudiera finalmente concretarse.

I N D I C E

INTRODUCCION

| | |
|---|----|
| APARATO GENITAL MASCULINO..... | 1 |
| Desarrollo y diferenciación..... | 1 |
| EL TESTICULO..... | 5 |
| Barrera hematotesticular..... | 6 |
| La célula de Leydig..... | 6 |
| Biosíntesis y metabolismo de esteroides..... | 8 |
| REGULACION HORMONAL DE LA FUNCION TESTICULAR..... | 14 |
| Eje hipotálamo-hipófiso-gonadal..... | 14 |
| Efectos hormonales sobre las células intersticiales..... | 17 |
| Efectos hormonales sobre los túbulos seminíferos..... | 23 |
| TRANSPORTE DE ESTEROIDES SEXUALES EN LA CIRCULACION..... | 28 |
| MECANISMO DE ACCION DE ANDROGENOS..... | 31 |
| PAPEL DEL CINC EN LA FUNCION REPRODUCTIVA..... | 33 |
| INFLUENCIA DE LA PRL EN LA FUNCION GONADAL MASCULINA..... | 37 |

OBJETIVOS..... 44

PRIMERA PARTE

MATERIALES Y METODOS I

MATERIALES..... 45

Reactivos utilizados..... 45

Pacientes y tratamientos..... 47

METODOS..... 50

Obtención del tejido..... 50

Procesamiento del tejido..... 50

Dosaje de andrógenos testiculares y epididimarios..... 52

- Extracción y particiones con diferentes solventes..... 52

- Cromatografía en microcolumnas de celita..... 53

- Radioinmunoensayo (RIE)..... 55

Determinación de Zn por absorción atómica..... 60

- Preparación de muestras y soluciones estandars..... 60

Control histológico del tejido..... 61

Determinaciones hormonales en el suero de los pacientes. 62

- Medición de PRL y LH séricas..... 62

- Medición de andrógenos séricos..... 63

Otros métodos..... 64

Análisis estadístico de los resultados..... 64

RESULTADOS I

| | |
|---|-----|
| NIVELES DE ANDROGENOS Y CINC EN TEJIDO TESTICULAR Y EPIDIDIMARIOS HUMANOS..... | 65 |
| Controles metodológicos..... | 65 |
| - Validación del método..... | 65 |
| - Variación inter e intraensayo..... | 70 |
| - Evaluación de pérdidas durante la extracción y purificación de esteroides..... | 70 |
| - Transporte y homogeneización de los tejidos..... | 71 |
| - Concentración de testosterona y DHT en testículo..... | 73 |
| Concentraciones de testosterona y DHT en epidídimo..... | 78 |
| Concentraciones de andrógenos en diferentes segmentos epididimarios..... | 79 |
| Concentraciones de cinc en testículo y epidídimo..... | 83 |
| Correlación entre andrógenos testiculares y cinc..... | 84 |
| Concentraciones de 3 α -Diol en testículo y epidídimo..... | 86 |
| EFECTO DE LA HIPOPROLACTINEMIA SOBRE EL EJE HIPOFISO-GONADAL..... | |
| Niveles de LH y PRL en suero..... | 94 |
| Niveles de testosterona, Δ_4 -Adiona y 3 α -Diolen suero.. | 94 |
| Concentraciones intratesticulares de testosterona, DHT y 3 α -Diol en suero..... | 99 |
| Concentraciones de testosterona, DHT y 3 α -Diol en el epidídimo..... | 100 |

| | |
|--|-----|
| Concentraciones de cinc en testículo y epidídimo..... | 100 |
| Morfología del testículo durante la hipoprolactinemia... | 107 |

| | |
|------------------|-----|
| DISCUSION I..... | 112 |
|------------------|-----|

SEGUNDA PARTE

MATERIALES Y METODOS II

| | |
|---|-----|
| MATERIALES..... | 129 |
| Reactivos utilizados..... | 129 |
| Animales y tratamientos..... | 130 |
| - Animales..... | 130 |
| - Inducción de hipoprolactinemia..... | 130 |
| - Inyección intratesticular de bromocriptina..... | 131 |
| METODOS..... | 132 |
| Dosaje de hormonas en suero..... | 132 |
| - Determinación de PRL y LH séricas..... | 132 |
| - Determinación de testosterona y 3 α -Diol séricos..... | 134 |
| Dosaje de andrógenos en tejido testicular y epididimario... | 134 |
| Producción de andrógenos y AMPc "in vitro". Efecto de la hipoprolactinemia..... | 135 |
| - Testículos enteros decapsulados..... | 135 |
| - Células de Leydig dispersas..... | 136 |
| Medición de andrógenos en los medios de incubación..... | 139 |

| | |
|--|-----|
| Determinación de AMPcíclico..... | 139 |
| - Aislamiento de quinasa de proteínas de la adrenal bovina..... | 139 |
| - Ensayo..... | 140 |
| Producción de andrógenos "in vitro"..... | 141 |
| - Efecto directo de la bromocriptina..... | 141 |
| - Efecto directo de la PRL..... | 142 |
| Análisis estadístico de los resultados..... | 143 |

RESULTADOS II

| | |
|---|-----|
| EFFECTO DE LA HIPOPROLACTINEMIA INDUCIDA SOBRE LA FUNCION TESTICULAR DE LA RATA..... | 144 |
| Peso corporal, testicular y epididimario..... | 145 |
| Niveles de LH y PRL en suero..... | 145 |
| Niveles de testosterona y 3 α -Diol en suero..... | 148 |
| Concentraciones intratesticulares de testosterona, DHT y 3 α -Diol..... | 148 |
| Producción de andrógenos "in vitro" por testículo total. | 153 |
| AMP cíclico liberado al medio de incubación..... | 162 |
| Producción de andrógenos "in vitro" por células de Leydig aisladas..... | 164 |
| POSIBLES EFECTOS DIRECTOS DE BROMOCRIPTINA Y PROLACTINA. | 168 |

| | |
|------------------------------------|-----|
| Efecto local de bromocriptina..... | 169 |
| Efecto local de la PRL..... | 173 |
| | |
| DISCUSION II..... | 182 |
| | |
| CONCLUSIONES..... | 194 |
| | |
| BIBLIOGRAFIA..... | 199 |

ABREVIATURAS.

| | |
|--------------------|---|
| ABP | proteína ligadora de andrógenos. |
| ADN | ácido desoxirribonucleico. |
| AMPc | 3'-5'-adenosina monofosfato cíclico. |
| Δ_4 -Adiona | Δ_4 -Androstenodiona, 4-androsteno-3,17 diona. |
| ARN | ácido ribonucléico. |
| ATP | Adenosina-trifosfato. |
| Br | bromocriptina 2-Br- α -ergocriptina. |
| BSA | albúmina sérica bovina. |
| C | control. |
| Ci | curie. |
| CoA | coenzima A. |
| col | colesterol. |
| CP | carcinoma de próstata. |
| cpm | cuentas por minuto. |
| dpm | desintegraciones por minuto. |
| DHT | dihidrotestosterona; 5 α -androstano 17 β ol-3-ona. |
| 3 α -Diol | 5 α -androstrandiol; 5 α -androstano 3 α , 17 β -diol. |

| | |
|-----------------------|--|
| 3 β -Diol DS | 5 α -androstano-3 β , 17 β -diol. desviación estandar. |
| EDTA | ácido etilendiamino tetraacético. |
| ED ₅₀ | dosis efectiva 50. |
| ES | error estandar. |
| FSH | hormona estimulante de los folículos. |
| GABA | ácido gamaaminobutírico. |
| GLAE | globulina ligadora de andrógenos y estrógenos. |
| ³ H | tritio. |
| hCG | gonadotrofina coriónica humana. |
| 3 β -HSD | 3 β hidroxiesteroide deshidrogenasa. |
| H-E | hematoxilina-eosina. |
| H MG-CoA | hidroximetil-CoA reductasa. |
| H | hormona. |
| HR | hormona-receptor. |
| hs | horas. |
| i.p. | intraperitoneal. |
| K _a | constante de asociación. |

| | |
|------|--|
| LAN | lanosterol. |
| LH | hormona luteinizante. |
| LHRH | factor liberador de gonadotrofinas. |
| LP | lipoproteínas. |
| M | molar. |
| min | minutos. |
| Mix | metil-isobutil-xantina. |
| mUI | miliunidad internacional. |
| NAD | nicotinamida-adenina-dinucleótido. |
| ng | nanogramos. |
| p | pendiente. |
| PIF | factor inhibidor de la secreción de PRL. |
| PLT | proteína ligadora de testosterona. |
| PREG | pregnenolona. |
| PRF | factor liberador de la secreción de PRL. |
| PTC | proteína transportadora de colesterol. |
| PTP | proteína transportadora de pregnenolona. |
| pg | picogramos. |
| PRL | prolactina. |
| PRLo | prolactina ovina. |
| PRLr | prolactina de rata. |
| p/v | peso en volúmen. |

| | |
|----------|---|
| r | coeficiente de correlación. |
| RIE | radioinmunoensayo. |
| rpm | revoluciones por minuto. |
| SHBG | globulina humana ligadora de esteroides sexuales. |
| T | testosterona; 4-androsten 17 β -ol-3-ona. |
| TEBG | globulina ligadora de testosterona y estrógenos. |
| tfm | síndrome de feminización testicular. |
| TRH | hormona liberadora de tirotrófina. |
| Tris | tri (hidroxi-metil)-amino-metano. |
| μ Ci | microcurie. |
| μ g | microgramo. |
| UI | unidades internacionales. |
| v/v | volumen en volumen. |
| VIP | péptido intestinal vasoactivo. |

INTRODUCCION

APARATO GENITAL MASCULINO.

En los mamíferos el aparato genital masculino está constituido por: a) Los testículos, ubicados en el escroto y recubiertos por una cápsula de tejido conectivo la cual se denomina albugínea. Sus funciones primordiales son secretar hormonas esteroideas que intervienen en la regulación de la espermatogénesis y en el control de los caracteres secundarios y producir espermatozoides que aseguren una provisión de gametas masculinas en calidad y cantidad adecuadas; b) un sistema eferente, que nace en la rete testis y desemboca en el epidídimo, órgano adosado a la cara externa lateral del testículo y que morfológicamente se puede dividir en tres segmentos principales: cabeza, cuerpo y cola. Este sistema eferente está involucrado en el transporte, maduración y almacenamiento de los espermatozoides; c) las glándulas accesorias: vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales o de Cowper, cuyas secreciones (ácido cítrico, fosfatasa ácida y alcalina, fructosa, prostaglandinas, mucopolisacáridos, cinc y algunas enzimas) contribuyen a la composición del semen.

DESARROLLO Y DIFERENCIACION.

La diferenciación de la gonada tiene lugar principalmente en el período fetal. Los factores que regulan el desarrollo del testículo se basan según estudios recientes en la presen-

cia del antígeno de membrana H-Y que es en los mamíferos de sexo masculino, un componente habitual de la superficie celular. El primer hecho importante que conduce a la mencionada diferenciación, es la formación de agregados de células germinales y de Sertoli. A través de los antígenos H-Y, ubicados en las células de Sertoli, se desencadenan los cambios iniciales que finalmente conducirán a la diferenciación testicular (Ciccarese y Ohno, 1978).

Una vez establecida la diferenciación, aparecen en el testículo las células de Leydig que separan los agregados de células germinales -Sertoli. Los factores que regulan la transformación de las células del mesénquima en células de Leydig permanecen aún desconocidos.

El testículo fetal elabora dos tipos de sustancias: una de naturaleza no esteroidea que conduce a la involución del ductus de Müller y la otra, identificada como un andrógeno, que es la responsable del desarrollo del tracto reproductivo masculino. La primera sustancia es una glicoproteína secretada por los túbulos seminíferos, específicamente por las células de Sertoli, ya que la destrucción de las células germinales no anula su efecto inhibitorio (Blanchard y Josso, 1974). La regulación de este factor inhibitorio es todavía incierta, aunque la FSH pareciera inhibir su síntesis.

El otro factor elaborado por el testículo es, como se

ha señalado de naturaleza androgénica. En la rata, conejo y el hombre el andrógeno predominante es la testosterona, mientras que en el ratón, cordero y el cerdo se producen tanto testosterona como androstenodiona (Gier y col. 1970).

La involución del ductus de Müller acontece alrededor del día 15 en la rata y el día 60 en el hombre. Como consecuencia de ello, crece y se desarrolla el ductus de Wolff, dando origen al epidídimo, vas deferens y vesículas seminales. Todas estas estructuras son sensibles a la acción de la testosterona. Por otra parte, a partir del seno y tubérculo urogenital, derivan la uretra, glándula prostática y genitales externos. Estas últimas estructuras dependen de la acción de la dihidrotestosterona (DHT) durante un período crítico del desarrollo embriológico (Wilson, 1978).

El inicio de la síntesis de testosterona se correlaciona con la diferenciación de las células de Leydig, las que involucionarán al final de la gestación. Durante la vida fetal luego de haber alcanzado su nivel máximo de producción de andrógenos, las células de Leydig se transforman en fibroblastos o bien se desintegran. Posteriormente, estas células al recibir el estímulo de la LH/hCG se reactivan y diferencian en células de Leydig. Así en el conejo, a las 5-6 semanas del nacimiento, las células adquieren nuevamente su morfología típica para alcanzar un nivel máximo de producción de andróge-

nos entre la 9-10 semana (Gondos y col., 1976). En este caso, se observa por lo tanto, paralelismo entre la capacidad esteroideogénica y la diferenciación celular.

Es oportuno mencionar que en humanos se han hallado células mesenquimatosas en testículos inmaduros, capaces de responder a la estimulación con hCG. Esta observación indica que los fibroblastos humanos poseen capacidad esteroideogénica. Por consiguiente, podría inferirse además que la activación de dichas células precede a la diferenciación de las células de Leydig (Chemes y col., 1985).

EL TESTICULO.

En la mayoría de los mamíferos el testículo se encuentra ubicado en el escroto y está compuesto básicamente por dos comportamientos: el sector intersticial y tubular. Pese a que en cada uno de ellos ejercen su efecto diferentes trofinas hipofisarias (LH y FSH respectivamente), ambos están íntimamente relacionados.

El intersticio, está integrado por las células de Leydig rodeadas por tejido conectivo, vasos sanguíneos y linfáticos. La función principal de dichas células es desarrollar y mantener la esteroidogénesis y circundar a los túbulos con un líquido rico en andrógenos.

Los túbulos seminíferos, donde tiene lugar la espermatogénesis, están integrados por las células germinales y de Sertoli. Estas últimas mediante "uniones estrechas" dan lugar a la formación de un sector basal y de otro contiguo a la luz tubular. En el primero se hallan las espermatogonias (Tipo A, intermedias y B) que se dividen por mitosis. En el segundo sector residen los espermatocitos secundarios de vida corta, originados por la primera división meiótica, que posteriormente y luego de una segunda división originan las espermátides.

Mediante un proceso de diferenciación denominado espermiogénesis, las espermátides se transforman en espermatozoides los que son expulsados a la luz del túbulo.

BARRERA HEMATOTESTICULAR.

Las células de Sertoli se extienden desde el sector basal al lumen y las uniones establecidas entre ellas constituyen lo que se denomina la barrera hemato-testicular (Dym y col., 1970). Esta barrera no sólo divide en dos sectores a los túbulos seminíferos sino que también selecciona el pasaje de sustancias presentes en la sangre o en el líquido del compartimiento intersticial. Los andrógenos y en especial la testosterona, son las sustancias que con mayor facilidad traspasan dicha barrera. El establecimiento de la misma es previo al desarrollo de los estadios iniciales de la espermatogénesis y una vez formada origina un medio con características bien definidas, el cual es esencial para alcanzar algunos estadios de la meiosis. Dicha barrera determina, además, que el sistema inmunológico del organismo no reconozca las células germinales haploides como propias y las preserve de ser neutralizadas inmunológicamente (Setchell, 1980).

Rodeando a los túbulos se encuentran las células peritubulares, que en forma semejante a las del tejido muscular liso intervienen en la contracción de los mismos (Clermont, 1958).

LA CELULA DE LEYDIG.

Las células de Leydig ocupan, según las especies, entre

el 2 y el 37% del volumen testicular (Christensen, 1975).

En testículo de rata y humano hay aproximadamente 25×10^6 y 700×10^6 células intersticiales, respectivamente (Mori y col., 1980; Kaler y col., 1978). En el caso especial del hombre, las células de Leydig son de forma poligonal con un diámetro aproximado de 15 - 20 μm . Presentan núcleos grandes, ovales o redondeados, con uno o dos nucleolos excéntricos. Se caracterizan por poseer un abundante retículo endoplásmico liso, aparato de Golgi bien desarrollado, numerosas gotas de lípidos y lisosomas. Todas estas estructuras son indicativas de su función esteroidogénica con actividad secretora (Pelliniemi y col., 1980).

El citoplasma presenta regular cantidad de mitocondrias con crestas preferentemente laminares y también es característica la presencia de cristales de Reinke (Christensen, 1975). Dentro de las células de Leydig,, tanto las mitocondrias como el retículo endoplásmico liso, contienen complejos enzimáticos que intervienen en la biosíntesis de esteroides.

La actividad esteroidogénica de la célula de Leydig está por consiguiente íntimamente correlacionada con su estructura. Recientemente Ewing y col., (1983) utilizando técnicas de perfusión "in vitro" y ultramicroscopía, describieron que parte del efecto trófico de la LH sobre las células de Leydig se efectúa a través del control de la biogénesis y recambio del retículo endoplásmico liso.

BIOSINTESIS Y METABOLISMO DE ESTEROIDES.

El colesterol es la molécula precursora a partir de la cual se sintetizan los distintos esteroides en las células de Leydig (Figura 1). El pool de dicho precursor puede derivar de: 1) síntesis de novo a partir de acetato; 2) ésteres de colesterol almacenados como gotas lipídicas en el citoplasma y 3) colesterol proveniente del plasma sanguíneo que es transportado dentro de la célula por lipoproteínas de alta o baja densidad, que se unen a receptores específicos ubicados en la membrana de la célula de Leydig (Brown y col., 1976).

Los ácidos grasos constituyen, probablemente, los principales precursores de la biosíntesis del colesterol testicular. El sistema enzimático para la degradación de los ácidos grasos (β -oxidación) se localiza en las mitocondrias y el producto de dicho metabolismo, acetil-CoA, es transformado en el citoplasma en 3-hidroxi 3metil-glutaril-CoA y posteriormente reducido a ácido mevalónico en el retículo endoplásmico. Los pasos sucesivos incluyen la formación de farnesil pirofosfato, escualeno y lanosterol. Este último compuesto es convertido a colesterol a través de enzimas presentes en el retículo endoplásmico. Es importante señalar que la acetil-CoA, puede provenir también de la oxidación aeróbica de la glucosa.

Independientemente de su origen, el colesterol libre

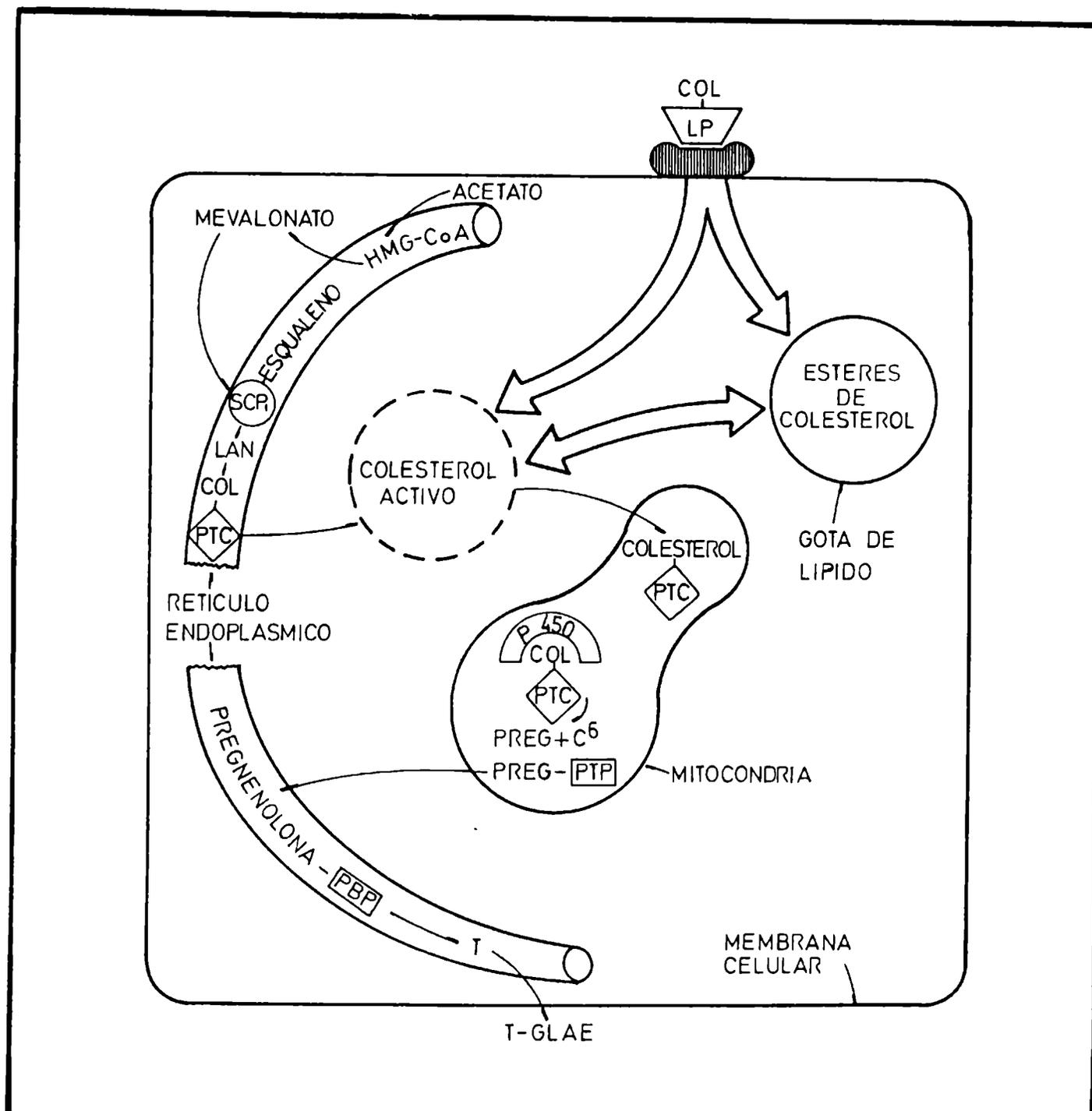


Figura 1.

Organización espacial del aparato biosintético de la
testosterona en la célula de Leydig.

Figura 1.

Organización espacial del aparato biosintético de la testosterona en la célula de Leydig. El "pool" activo de colesterol (col) proviene de: a) síntesis "de novo", b) ésteres de colesterol almacenado en gotas de lípidos, o c) colesterol del plasma sanguíneo, que es transportado por lipoproteínas (LP) de alta o baja densidad, las cuales pueden unirse a receptores de membrana en la célula de Leydig. Con la excepción del hidroximetil-CoA reductasa (HMG-CoA) que se localiza en el retículo endoplásmico, la mayoría de las reacciones iniciales de la síntesis del colesterol tienen lugar en el citoplasma celular. El escualeno requiere una proteína transportadora (SCP) para su conversión a lanosterol (LAN), ya que es insoluble en agua. El colesterol es probablemente transportado dentro de la mitocondria por una proteína (PTC) y la misma facilita la unión del colesterol al componente P-450 de la enzima que rompe la cadena lateral del colesterol produciendo pregnenolona (PREG) e isocaproaldehído (C⁶). El transporte de PREG hacia el retículo endoplásmico está facilitado por una proteína transportadora de PREG (PTP), donde es convertida a testosterona (T). La T es secretada fuera de la célula de Leydig y su transporte facilitado por proteínas tales como: ABP (proteína transportadora de andrógenos), albúmina y principalmente GLAE (globulina ligadora de andrógenos y estradiol) (Reproducido de Ewing y col., 1983, con modificaciones).

en el citoplasma debe mobilizarse hacia la membrana mitocondrial externa y probablemente es transportado por una proteína específica (Kan y col., 1973).

El complejo enzimático que rompe la cadena lateral del colesterol se halla situado en la membrana interna mitocondrial. Una amplia serie de reacciones, catalizadas por las 20 y 22 hidroxilasa, introduce grupos hidroxilos en las posiciones respectivas, previa ruptura del enlace entre los carbonos 20 y 22 catalizada por la 20 y 22 liasas. El sistema enzimático, acoplado al citocromo P 450, actúa como oxidasa final de las hidroxilaciones. Numerosos estudios han demostrado que la conversión de colesterol a pregnenolona por este complejo enzimático intramitocondrial constituye el paso limitante para la biosíntesis de testosterona (Hall, 1970).

La pregnenolona formada y probablemente unida a una proteína ligadora (PBP), llega hasta el retículo endoplásmico donde es convertida a andrógenos. Este proceso se esquematiza en la Figura 2 y requiere la intervención de 5 reacciones enzimáticas catalizadas por las siguientes enzimas: 17 α - hidroxilasa, 17-20 liasa o desmolasa, 3 β - hidroxioesteroide-deshidrogenasa, Δ_5 -3 cetohidroxioesteroide isomerasa, y 17 - β - hidroxioesteroide-deshidrogenasa. Como se muestra en el diagrama, las reacciones enzimáticas se pueden realizar con diferentes secuencias, dando lugar a varios caminos alternati-

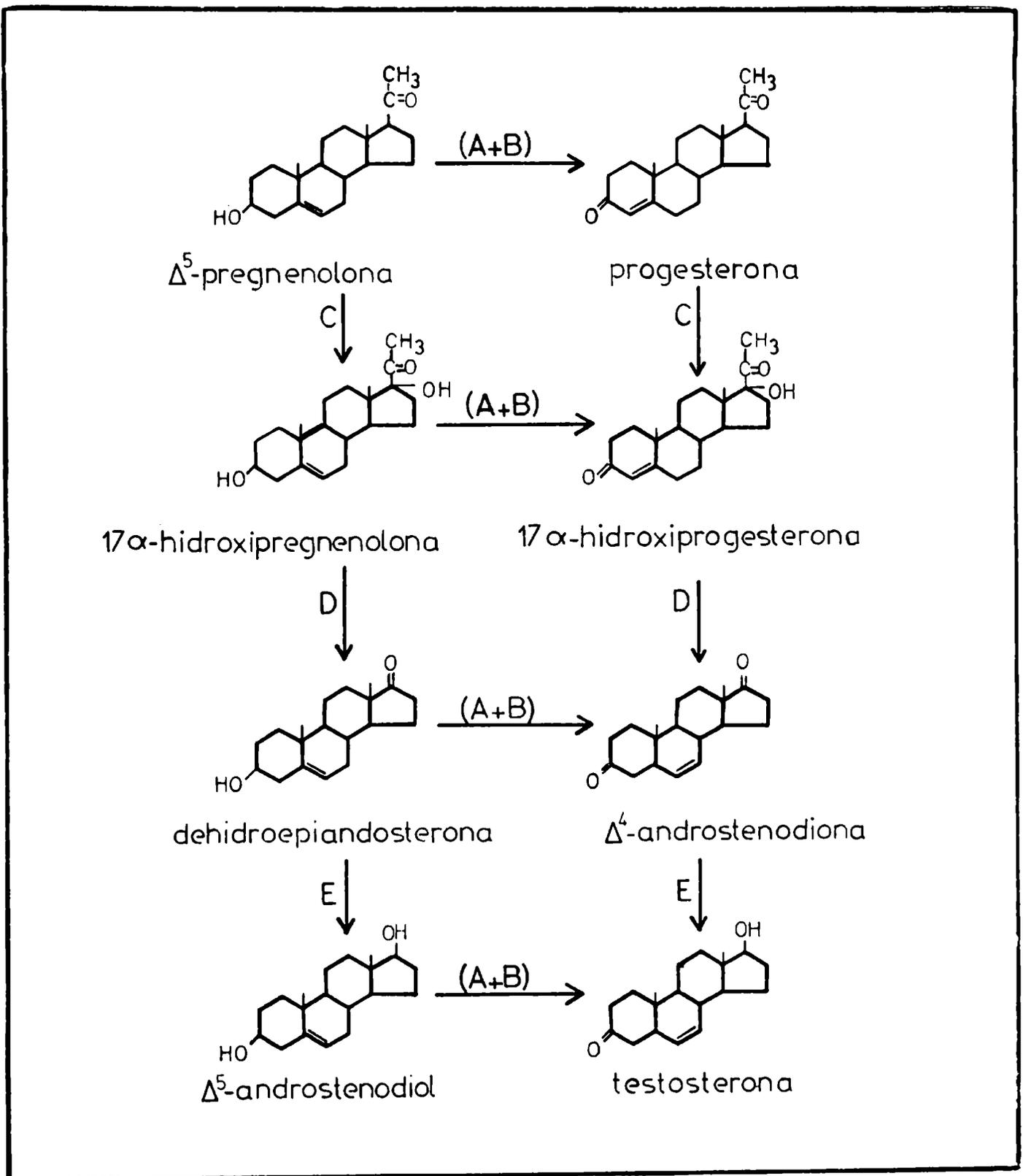


Figura 2.

Reacciones involucradas en la conversión de Δ^5 -pregnenolona a tes-
tosterona.

A + B = 3 β hidroxisteroide-deshidrogenasa + Δ^5 -3 cetohidroxi-
esteroide-isomerasa.

C = 17 α -hidroxilasa.

D = C 17 - 20 liasa o desmolasa.

E = 17 β -hidroxisteroide-deshidrogenasa.

vos para la síntesis de testosterona a partir de pregnenolona. El camino de la progesterona, o bien vía Δ_4 , es la que predomina en la rata (Samuels, 1975), mientras que en el hombre, la vía Δ_5 parece tener una mayor importancia (Axelrod, 1965).

En la célula de Leydig, por la presencia de la 5 α -reductasa y a partir de diferentes sustratos se elaboran andrógenos 5 α -reducidos, siendo la DHT el metabolito 5 α -reducido de la testosterona. Este andrógeno biológicamente muy activo, es reconocido en algunos tejidos efectores por presentar una mayor afinidad por el receptor de andrógenos que la testosterona misma. La testosterona puede ser metabolizada a otros compuestos reducidos como el 5 α -androstano-3 α , 17 β diol (3 α -DIOL) y el 5 α -androstano-3 β , 17 β diol (3 β -DIOL) a partir de DHT en una reacción reversible por la acción de las enzimas 3 α y 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa respectivamente.

En la célula de Leydig, tanto la testosterona como la androstenodiona pueden ser convertidas a estrógenos por acción de la "aromatasa", que en realidad comprende a una serie de enzimas. A través de estas reacciones enzimáticas la testosterona es transformada a estradiol, la androstenodiona a estrona y la enzima 17 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa puede interconvertir la estrona a estradiol. Si bien el sector intersticial es el lugar principal de producción de esteroides

en el testículo hay numerosas evidencias que demuestran que el túbulo también posee capacidad para la biosíntesis de andrógenos y estrógenos.

En la rata, se ha demostrado que las células de Sertoli y los espermatocitos tienen gran capacidad para metabolizar testosterona a andrógenos 5α -reducidos.

En determinadas edades del desarrollo este sector testicular posee muy altas actividades de las enzimas 5α -reductasa y 3β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (Dorrigton y col., 1975).

Las células de Sertoli también poseen capacidad aromata-sa y dicha actividad es estimulada por FSH (Amstrong y col., 1975). Aún no se ha establecido cual es la estructura celular predominante en la elaboración de estrógenos y probablemente ello tenga una relación temporal con el estadio del desarrollo. Así por ejemplo, en la rata las células de Sertoli prepubera-les elaboran 17β -estradiol antes que se manifieste la prime-ra onda de la espermatogénesis, sugiriendo que en este período la síntesis de estrógenos en el sector tubular podría ser de importancia fisiológica.

REGULACION HORMONAL DE LA FUNCION TESTICULAR.

EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO-GONADAL.

El hipotálamo es una estructura integradora de los impul-

Los factores que llegan al sistema nervioso central y elabora factores propios (LH-RH, factor liberador de gonadotrofinas) que ejercen su efecto en la hipófisis anterior. Estos factores llegan a través de los vasos portales a las células gonadotróficas de la hipófisis donde estimulan la síntesis y secreción de LH y FSH. Las gonadotrofinas controlan la función testicular constituyendo lo que se denomina el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Tanto los esteroides sexuales como la inhibina, sintetizados en el testículo, son capaces de interaccionar a nivel hipotálamo-hipofisario, regulando la secreción de LHRH, LH y FSH. (Franchimont y col., 1978).

El inicio de la secreción de testosterona por el testículo fetal parece ser independiente de la presencia de gonadotrofinas. En el período neonatal, y especialmente en el humano la testosterona, androstenodiona y estradiol se elevan probablemente debido al alto tenor de gonadotrofinas existentes. A partir de los 10-11 años comienza la testosterona a ascender, alcanzando los valores del adulto entre los 15 y 17 años de edad (Winter y col., 1972).

En la rata, en cambio, los niveles de testosterona alcanzan su pico en el día 18 de la gestación (Weisz y col., 1980). Este andrógeno declina al nacimiento alcanzando un nivel mínimo entre los días 20-21, momento que marca la finalización del período infantil del desarrollo (Ojeda y col.,

1980). La testosterona se mantiene en niveles bajos hasta el día 35, momento en que comienza a elevarse (período juvenil) (Piacsex y col. 1978). Estas variaciones en los niveles séricos de testosterona se acompañan de cambios concomitantes en los andrógenos 5α -reducidos tal como se ha descrito anteriormente.

Ha sido clásicamente aceptado que el comienzo de la pubertad se debe a un progresivo aumento en la secreción de gonadotrofinas, que resultaría de una menor sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisario al efecto inhibitorio de los esteroides sexuales (Kaplan y col., 1976).

Entre algunas de las diferencias existentes entre el hombre y la rata en el inicio de la pubertad, puede mencionarse que el ascenso en los niveles de LH que se observa en la rata es más lento y progresivo. En el período juvenil, el aumento rápido del número de receptores de LH en el testículo (Ketelslegers y col., 1978) es seguido por un manifiesto ascenso en la testosterona sérica, sugiriendo que en la rata macho, la maduración de la gonada es más importante que la disminución de sensibilidad del hipotálamo a los esteroides sexuales (Odell y col., 1976). El control de la secreción de FSH no puede ser explicado a través de una modificación en la sensibilidad del hipotálamo a los esteroides, ya que los niveles de FSH alcanzan un nivel máximo entre los 35 y

40 días de edad y luego van disminuyendo al alcanzarse la pubertad completa. Resultados recientes indicarían que la secreción de FSH es regulada por la inhibina sintetizada en las células de Sertoli (Franchimont y col., 1978).

El inicio de la pubertad en las diferentes especies en general es un proceso que conduce al control de la función testicular y comprende la interacción de LH, FSH, PRL, LHRH y probablemente péptidos opioides originados en el sistema nervioso central (Blank y col., 1979).

En el humano, dicho comienzo se debería preferencialmente a un cambio de sensibilidad del hipotálamo al efecto inhibitorio de los esteroides sexuales. En la rata, en cambio, se basaría principalmente en una maduración de la gonada por mecanismos aún desconocidos.

EFFECTOS HORMONALES SOBRE LAS CELULAS INTERSTICIALES.

La LH es la principal hormona regulatoria del desarrollo y función de las células de Leydig (Hooker, 1970). Esta hormona ejerce efectos regulatorios sobre la esteroidogénesis y al mismo tiempo produce una acción trófica para mantener la función de las células intersticiales. LH al igual que otras hormonas peptídicas, produce sus efectos interactuando inicialmente con sitios específicos de unión localizados en la superficie de la membrana de las células efectoras (Means, 1975). El complejo hormona-receptor formado es capaz de pene-

trar en la célula a través de un proceso conocido bajo el nombre de endocitosis. Hasta el momento, no se ha dilucidado si el complejo receptor-LH es reciclado a la superficie de la membrana celular o si la hormona libre es degradada en los lisosomas (Ascoli y col., 1977).

En preparaciones de células de Leydig de diferentes especies se han descrito sitios específicos de unión para LH (Charreau y col., 1974; Sunby y col., 1982). A partir de la unión de la LH a estos sitios, se estimula rápidamente la actividad adenilato ciclasa (AAC) y la producción de testosterona (Catt y col., 1974). La activación de la AAC en el testículo en presencia de iones Mg^{++} , origina la conversión de ATP en AMPcíclico (AMPC). Este nucleótido cíclico que puede ser degradado por una fosfodiesterasa a 5'AMP, se une a la subunidad regulatoria de una proteína quinasa (PK) y da lugar a la liberación de la subunidad catalítica libre. La PK testicular es estimulada entonces por LH, favoreciendo la fosforilación de proteínas que pueden estar involucradas en la biosíntesis de esteroides (Charreau y col., 1985).

En la rata, el número de receptores de LH por célula de Leydig es aproximadamente igual a 20.000. Realizando estudios de unión de LH a sus sitios receptores y correlacionándolos con la esteroidogénesis, se vió que cada célula de Leydig contiene un exceso de sitios específicos de unión para LH,

ya que con una ocupación del 1% de los receptores se obtiene una respuesta esteroidogénica máxima. La estimulación en la producción de AMPc no se detecta hasta que el andrógeno alcanza su producción máxima (Moyle y col., 1975). Esta observación llevó por mucho tiempo a cuestionar el carácter de segundo mensajero del AMPc en el mecanismo de la acción hormonal. Sin embargo, en la actualidad existen claras evidencias del papel desempeñado por el AMPc en la estimulación de la síntesis de andrógenos por LH. Así, se ha observado un incremento en la producción "in vitro" de testosterona en respuesta a AMPc ó dibutiril-AMPc y también a toxina colérica, aunque en este último caso es necesaria una mayor ocupación de los sitios receptores de AMPc en la quinasas de proteínas (Dufau y col., 1977).

El sitio regulatorio más importante sobre la esteroidogénesis por acción de la LH es, como ya se ha mencionado, la escisión de la cadena lateral del colesterol (Van der Vusse y col., 1975).

El mantenimiento de los receptores de LH en la célula de Leydig depende, al menos en parte, de la acción trófica de la propia hormona y de otras hormonas hipofisarias, en especial FSH y PRL. Sin embargo FSH no afecta en gran medida la esteroidogénesis testicular y no existen en la célula de Leydig sitios específicos de unión para esta gonadotropina

(Charreau y col., 1985). Sus efectos en el sector tubular se describirán en una próxima sección.

La hormona hipofisaria PRL, es considerada un importante regulador de la función testicular. Charreau y col., (1977) demostraron la presencia de sitios receptores específicos en el sector intersticial del testículo. Dada la estrecha relación del tema con este trabajo de Tesis, la importancia de la PRL en la función gonadal será tratada "in extenso" en otra sección.

Volviendo a las acciones de LH sobre la célula de Leydig es oportuno mencionar que a partir de estudios realizados administrando una única o múltiples dosis de hCG, en diferentes modelos experimentales, se han obtenido los siguientes resultados: a) altas dosis de esta hormona producen un aumento en la secreción de testosterona, originándose posteriormente un período refractario en el cual el testículo no responde a la subsecuente administración de hCG; durante este proceso, se ha observado que existe una pérdida de receptores para LH y alteraciones en la síntesis de testosterona (Purvis, 1977); b) el proceso de regulación del receptor de LH se disocia de las alteraciones que se producen en la biosíntesis de esteroides; c) los cambios en la esteroidogénesis inducidos por la administración de hCG son diferentes según la vía de administración y d) una máxima producción de testosterona

se obtiene luego de pequeñas dosis de hCG (Cigorruga y col., 1978).

En otro estudio estos mismos autores (Cigorruga y col., 1979) señalaron cierta semejanza entre el proceso de desensibilización testicular y la inhibición de la secreción de testosterona luego de administrar estradiol.

Desde hace tiempo es conocida la inhibición de la función testicular inducida por estrógenos (Moore y col., 1932). Este efecto fué clásicamente atribuído a una acción inhibitoria sobre la secreción de LH hipofisaria (Verjans, 1974). Sin embargo, la disminución de dicha función puede ocurrir sin cambios en los niveles séricos de LH (Chowdhury, 1974). De estos resultados surgió entonces que los estrógenos ejercerían también un efecto directo sobre el testículo. Al administrar ^3H -17 β -estradiol "in vivo" se ha observado una clara localización del esteroide radiactivo en los núcleos de la célula de Leydig, mientras que no se detecta captación del esteroide en las células de Sertoli, germinales o peritubulares. A través de métodos autoradiográficos o bioquímicos (Stumpf, 1969; Mulder y col., 1973), se evidencia que el tejido intersticial contiene macromoléculas capaces de ligar estrógenos con alta afinidad y limitada capacidad.

Por otra parte, los andrógenos principal producto sintetizado por las células de Leydig, pueden interactuar con di-

chas células. Al respecto, se ha demostrado una nítida acumulación nuclear específica de ^3H -testosterona ó ^3H -DHT (Sar y col., 1975). Además en ratas portadoras del síndrome de feminización testicular (tfm), con resistencia a la acción androgénica como consecuencia de un número reducido o ausencia de receptores para andrógenos, no ha podido evidenciarse la presencia específica del andrógeno tritiado en células de Leydig (Sar y col., 1975).

Con relación a la presencia de estos sitios de unión para andrógenos en células de Leydig y su posible significado fisiológico, debe mencionarse que Purvis y col. (1979) postularon que estas hormonas esteroideas estarían involucradas en un mecanismo de retroalimentación negativa ultra-corto en relación al fenómeno de desensibilización testicular.

Finalmente, Le Febvre y col. (1980) describieron la presencia en las células intersticiales de sitios receptores para LH-RH. El efecto agudo de su unión a los receptores, es aumentar la esteroidogénesis mientras que la administración crónica produce una inhibición de la misma.

Más recientemente ha sido de considerable interés la descripción de un factor con actividad LH-RH simil presente en extractos testiculares, el cual es capaz de desplazar al LH-RH-I¹²⁵ de dichos sitios receptores (Sharpe y col., 1981). Posteriormente se estableció que este factor es segregado

por las células de Sertoli y es regulado por la acción de la FSH (Sharpe y col., 1984).

EFFECTOS HORMONALES SOBRE LOS TUBULOS SEMINIFEROS.

El sector tubular del testículo se halla regulado por la acción conjunta de FSH y andrógenos.

La única localización de sitios de unión específicos para FSH, ha sido la célula de Sertoli (Means, 1975; Schanbacher, 1979). Por acción de la gonadotropina ocurren importantes cambios morfológicos y bioquímicos en la célula de Sertoli, los que proveen el medio hormonal necesario para el desarrollo y diferenciación de las células germinales.

La interacción de la FSH con su célula efectora resulta en la estimulación de la adenilato ciclasa y la disminución de la actividad fosfodiesterasa con el subsecuente aumento en los niveles de AMPc. Estas observaciones han sido realizadas tanto "in vivo" como en cultivo de células de Sertoli (Conti y col., 1982; Verhoeven y col., 1981).

Conjuntamente con el aumento del AMPc, la FSH desencadena otros efectos sobre la célula de Sertoli tales como: a) producción de lactato y piruvato (Le Gac y col., 1982); b) secreción de líquido tubular (Sharpe y col., 1979); d) secreción de LH-RH simil (Sharpe y col., 1981); e) producción de inhibina que regula la síntesis y liberación de FSH (Steinberger y col., 1979) y f) como ya se ha mencionado la metaboli-

zación de andrógenos y aumento en la actividad aromatasas. (Dorrington y col., 1978). Se han dado pruebas concluyentes que las células germinales requieren energía para su desarrollo y ésta es provista por las células de Sertoli de la vecindad, las que la obtienen a partir de glucosa, lactato y piruvato; esta producción es estimulada por FSH vía AMPc. Ambos productos (lactato y piruvato) son indispensables para la síntesis de proteínas y ARN en las células germinales (Jutte y col., 1981), como así también para la provisión de niveles adecuados de ATP y glucosa-6-fosfato en espermátocitos primarios y espermátides (Le Gac y col., 1982).

Además de estimular la secreción de líquido tubular, la FSH también regula la elaboración de proteínas específicas en las células de Sertoli; entre ellas se encuentra la denominada proteína ligadora de andrógenos (ABP) (French y col., 1973). El ABP es una glicoproteína constituida por dos subunidades con pesos moleculares de 41.000 y 45.000 daltons (Musto y col., 1982). El ABP es secretado en respuesta a la FSH, aunque los andrógenos constituyen un muy importante estímulo para su síntesis (Hansson y col., 1976). El efecto causado por los andrógenos resulta de su interacción con sitios específicos de unión y descriptos en la célula de Sertoli (Sar y col., 1975). Estos sitios presentan características fisicoquímicas muy similares a las de los hallados anterior-

mente en la próstata ventral y epidídimo (Hansson y col., 1976).

Volviendo a las acciones conjuntas de FSH y andrógenos sobre la célula de Sertoli, se ha establecido que en ausencia de FSH (hipofisectomía), diferentes andrógenos y en particular DHT, son capaces de mantener una producción de ABP normal, siempre que el tratamiento sustitutivo sea iniciado inmediatamente (Hansson y col., 1975). Al respecto, la FSH puede reinducir la producción de ABP aún transcurrido cierto tiempo luego de la hipofisectomía (Purvis y col., 1977). Entre las funciones atribuidas al ABP, la más relevante es el transporte de andrógenos desde el intersticio al túbulo, que a través del lumen acceden, así al epidídimo. De esta manera se proveería al epidídimo de un tenor elevado de andrógenos, necesarios para la maduración de los espermatozoides (Blaquier y col., 1972).

Existen evidencias que indican que el ABP además de ser secretado al lumen de los túbulos seminíferos y vía rete testis al epidídimo, en cierta proporción sería liberado desde el sector basal de las células de Sertoli hacia los linfáticos y la sangre. Si bien se ha demostrado la secreción bidireccional de ABP, aún no ha sido establecida en forma precisa la función del ABP en la circulación general (Gunsalus y col., 1980).

La célula de Sertoli elabora también el péptido LHRH

símil, como ya se ha mencionado anteriormente, y la inhibina, que es una proteína con un peso molecular mayor de 12.000 daltons. Esta proteína inhibe la síntesis y secreción de FSH, actuando a nivel hipofisario, aunque también se ha postulado al hipotálamo como sitio adicional de acción, siendo su secreción independiente de las células germinales y peritubulares pero influenciada por la testosterona sintetizada en las células de Leydig (Verhoeven y col., 1983).

El sitio principal de la acción hormonal (FSH-andrógenos) en la regulación de la espermatogénesis se halla localizado en la célula de Sertoli. Sin embargo, aunque en mucho menor proporción también se han descrito receptores de andrógenos en células germinales (espermatogonias y espermatocitos) (Wilson y col., 1975).

Finalmente, se ha postulado también alguna acción de los andrógenos en las células peritubulares, comprobándose que son capaces de concentrar dichos esteroides (Hansson y col., 1976).

Comunicación intercelular:

Además de la regulación primordial que ejercen las gonadotropinas hipofisarias sobre el testículo, en los últimos años se han presentado evidencias que avalan el concepto relacionado al control de la función testicular a través de factores elaborados en la misma gonada (Bergh, 1982). Algunas de las observaciones más importantes realizadas por distintos

grupos y que apoyan estos conceptos son los siguientes:

- 1) las características de las células de Leydig ubicadas en la proximidad de los túbulos seminíferos varían en relación al estadio del ciclo espermatogénico (Bergh, 1982);
- 2) las células de Sertoli producen factores que influyen la función de las células de Leydig (Grotjan y col., 1982; Parvinen y col., 1984) y
- 3) las células de Sertoli son los mediadores a través de los cuales la FSH induce receptores de LH en las células de Leydig y modifica la capacidad esteroidogénica de las mismas (Reventos y col., 1983; Bergh, 1984).

Todos estos datos destacan la importancia de las interacciones entre las células germinales, Leydig y Sertoli, a través de factores elaborados fundamentalmente en estas últimas. Este mecanismo regulatorio, que está actualmente en pleno estudio, es conocido como regulación parácrina del testículo (Steinberger y col., 1984).

TRANSPORTE DE ESTEROIDES SEXUALES EN LA CIRCULACION.

Una vez que los esteroides sexuales han sido sintetizados en la gonada, estas hormonas pueden seguir tres caminos: a) interactuar dentro del mismo testículo; b) transportarse al epidídimo donde contribuirán a la maduración de los espermatozoides y c) secretarse a la corriente sanguínea.

En la circulación general los esteroides sexuales se unen a diferentes proteínas con las que pueden asociarse o disociarse y solo una pequeña fracción de la hormona circula libre, mientras que la mayoría es transportada como complejo esteroide-proteína.

El pequeño porcentaje de esteroide no ligado es el biológicamente activo ya que puede atravesar la membrana celular de diferentes tejidos efectores y ejercer allí su efecto biológico. En apoyo de esta idea se debe mencionar que la tasa de depuración metabólica, que está en relación directa con la cantidad de hormona libre circulante, disminuye significativamente en situaciones donde se producen elevaciones en la unión de estas proteínas transportadoras.

En el humano la testosterona circulante se halla fundamentalmente unida a dos proteínas del suero y solo un pequeño remanente, menor del 3%, permanece en estado libre (Vermeulen y col., 1971; Rivarola y col., 1968). Una de estas proteínas es la albúmina, a la cual se une con baja

afinidad ($K_a: 10^5 M^{-1}$) y alta capacidad, tratándose de una unión inespecífica ya que la albúmina es capaz de ligar distintos esteroides. La otra proteína es una globulina que liga andrógenos y estrógenos con mayor afinidad ($K_a: 10^9 M^{-1}$) y ha recibido varias denominaciones a partir de su descripción original (PLT, SHBG, TEBG, GLAE) (Mercier y col., 1968, Murphy, 1968).

La GLAE tiene la particularidad de unir, además de la testosterona y el estradiol, otros andrógenos como la DHT, Δ_5 -androstenediol y 3 α -DIOL. La proteína transportadora se ha descrito en el hombre, conejo, bovinos, reptiles y anfibios, estando aparentemente ausente en el gato y los roedores; sin embargo, Susuki y col. (1981) la detectaron también en suero de rata macho a partir de los 15 días de edad.

Los niveles sanguíneos de GLAE en el humano son más altos en la mujer y en los niños de ambos sexos antes de la pubertad, estando los mismos regulados por diversas hormonas. Así mientras los estrógenos y las hormonas tiroideas los incrementan, los andrógenos y derivados de la progesterona los disminuyen (Forest y col., 1968; Clark y col., 1971).

Las posibles acciones de la GLAE son: a) transporte de la hormona en forma inactiva; b) protección del esteroide a su ataque por enzimas, captación y metabolismo hepático

e c) integración de un reservorio hormonal, que a través de cambios relativamente rápidos en su asociación/disociación con el esteroide, permiten que el organismo disponga de hormona libre con el fin de mantener la homeostasis requerida.

En la actualidad la mayoría de los autores sostienen que los niveles de testosterona en la circulación disminuyen con el envejecimiento (Horton y col. 1975); Pirke y col., 1975; Rubens y col., 1974; Stearns y col. 1974; Vermeulen y col. 1972), exteriorizándose de forma más evidente la caída en la testosterona libre (Vermeulen y col., 1971) y el ascenso en la GLAE (Vermeulen y col., 1972).

También se ha observado en hombres en la senectud, una menor secreción de testosterona (Pirke y col., 1973) y respuesta gonadal al test de estímulo con hCG (Pirke y col., 1977; Rubens y col., 1974).

Por otra parte, los estrógenos aumentan con la edad y probablemente sean responsables de los mayores niveles de GLAE durante el envejecimiento, pues los mismos son capaces de estimular su síntesis por el hígado. Sin embargo, los niveles totales de testosterona en la senectud no se modifican sustancialmente. Este hecho puede explicarse por el aumento de unión de la GLAE y la disminución de la tasa de depuración metabólica de esteroide (Horton, 1978).

MECANISMO DE ACCION DE ANDROGENOS.

Los andrógenos ejercen su acción biológica en los denominados tejidos efectores cuya característica es la capacidad de retener en forma específica la hormona (H).

Una de las características de un tejido efector para andrógenos es su capacidad de retener en forma específica la hormona (H).

Los trabajos de Bruchovsky y col. (1968) y Anderson y col. (1968), demostraron la captación y retención de ³H-testosterona en la próstata, vesículas seminales y glándulas coagulantes de rata. En estos tejidos así como en el epidídimo que poseen alta actividad de la enzima 5 α -reductasa, la testosterona es reducida a dihidrotestosterona (DHT) y este producto es el principal andrógeno captado.

La hormona se une específicamente a macromoléculas propias del tejido, los receptores hormonales (R), y forma el complejo hormona-receptor (HR). Las principales características físico-químicas de dichos complejos son: termolabilidad, sensibilidad a enzimas proteolíticas, dependencia de grupos sulfhidrílos, vida media (T 1/2) a 0-4°C mayor de 24 hs, movilidad electroforética en geles de poliacrilamida agarosa con Rf = 0.45; punto isoeléctrico = 5,8; precipitación por sulfato de amonio (30-40 % de saturación), capacidad de unión limitada, alta afinidad ($K_a = 2-5 \times 10^{10} M^{-1}$) y unión a celulosa acoplada a ADN.

Una vez formado el complejo H-R en la fracción soluble (HR_c), se activa mediante un cambio de conformación especial y luego se transporta al interior del núcleo celular (HR_n) incorporándose a sitios aceptores de la cromatina donde estimula la transcripción genética.

La unión del andrógeno al R se realiza de tal forma, que estéricamente la H está "envuelta" por el R, ya que no puede ser reconocida por un anticuerpo anti-DHT. Esto indicaría que el sitio aceptor solo reconoce a la porción proteica del complejo $H-R_n$. Por lo tanto, la H en lugar de ser la portadora del mensaje para su tejido efector, sólo serviría para producir un cambio conformacional del $H-R_c$ que transformado en H-R activo, se trasloca al núcleo y actúa sobre la cromatina.

Como resultado de estudios mas recientes llevados a cabo con R de estrógenos (King y col., 1984; Welshons y col., 1984), se ha propuesto que la activación tendría lugar en el núcleo, ya sea interactuando la H con el R de origen en su mayoría nuclear o bien con el complejo originado en el citoplasma. Es precisamente este aspecto el que merece la mayor atención últimamente, es decir, el estado del R nativo o inactivo y el activo, que es el que se une firmemente a los sitios aceptores de la cromatina y es capaz de desencadenar las acciones bioquímicas subsecuentes y que expresarán un efecto biológico determinado (Jensen, 1984; Gorski y col., 1968).

PAPEL DEL CINCO EN LA FUNCION REPRODUCTIVA.

El estudio de la importancia fisiológica del cinc (Zn) en la reproducción se inicia con los trabajos de Bertrand y Vladesco (1921), quienes encontraron elevadas concentraciones del metal en el tracto genital masculino. En el semen humano se detectan entre 5 y 22 mg de cinc/100 ml, en tanto que la próstata contiene también niveles muy elevados, especialmente en la porción dorso-lateral (Mawson y col., 1951).

El cinc seminal parece ser fundamentalmente de origen prostático y al respecto se ha informado que sus concentraciones no difieren sustancialmente en plasma seminal de pacientes normo, oligo o azoospermicos (Mann, 1964). No obstante, Mawson y col. (1953) demostraron que las gametas masculinas también contienen considerable reservas del metal. El cinc presente en los espermatozoides es probablemente incorporado a las proteínas espermáticas en los túbulos seminíferos durante el desarrollo de la espermatogénesis. Algunas evidencias avalando esta idea se han presentado en la rata (Wetterdal, B, 1958).

Tanto la captación de ^{65}Zn como el contenido endógeno de este catión en el tejido prostático, parecen estar sujetos a una cierta regulación hormonal. Así en la rata, la castración provoca una caída en los niveles de cinc pros-

táticos, mientras que la administración de testosterona los restituye (Rosoff B. y col., 1968).

El testículo es un órgano que también manifiesta una preferencial captación de ^{65}Zn . Por técnicas autorradiográficas se ha demostrado una distribución irregular de la radioactividad, siendo máxima la densidad en el túbulo seminífero (Wetterdal, 1958).

Estos estudios y los de otros grupos de trabajo sugieren que el espermatozoide sería el responsable de la acumulación de cinc en el sector tubular del testículo (Millar y col., 1961).

Ha sido propuesto que la captación del cinc por el testículo es un mecanismo sensible a ciertas hormonas peptídicas tales como PRL, LH y FSH y en este sentido se comprobó que la hipofisectomía en ratas adultas disminuye en un 40 % la captación de cinc por el testículo (Gunn y col., 1961).

Se ha demostrado una captación diferencial de cinc por el testículo y la próstata, comprobándose que son necesarias concentraciones menores de cinc para mantener la espermátogénesis que para preservar el tamaño de las glándulas sexuales accesorias. Además, mientras el cinc prostático parece no ser esencial para la fertilidad (Gunn y Gould, 1958), la presencia de cantidades suficientes del mismo es necesaria para un completo desarrollo de las gametas

y el mantenimiento del epitelio germinal (Millar y col., 1960).

El cinc es requerido para todas las fases del ciclo celular, hecho indudablemente ligado a su participación en la síntesis de ADN, ya que tanto las polimerasas del ácido ribonucleico como las correspondientes al ácido desoxirribonucleico son catalogadas como metaloenzimas. Resulta entonces, que una de las principales funciones del cinc consiste en su papel de cofactor enzimático. Hoy se sabe que existen alrededor de 70 metaloenzimas que requieren cinc para sus funciones (Prasad, 1976). Entre ellas se encuentran la 5 α -reductasa prostática y la 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, involucradas ambas tal cual ha sido mencionado previamente, en el metabolismo de la testosterona (Prasad y col., 1967; Habib, 1978). Con respecto a estas enzimas esteroideogénicas se ha demostrado un efecto bifásico del cinc sobre la 5 α -reductasa prostática (de Larminat y col., 1981) y un efecto inhibitorio sobre la epididimaria (Monsalve y Blaquier, 1977).

Pese a todas estas observaciones el verdadero papel que desempeña el cinc no ha sido completamente esclarecido y su importancia fisiológica se manifiesta por las alteraciones funcionales que determinan deficiencias de dicho metal, tanto a nivel clínico como experimental.

El hipogonadismo primario en el sexo masculino se considera asociado a cuadros de deficiencia de cinc. Esta alteración se manifiesta en los casos de disminuciones severas o leves del metal (Prasad, 1983).

Tanto en la rata como en humanos las deficiencias de cinc están asociadas a un incremento en los niveles séricos de FSH y LH, disminución en los niveles de testosterona circulante y alteración de la espermatogénesis (Abbasi y col., 1980; Lei y col., 1976; Prasad, 1983). Es además interesante puntualizar que en ratas tfm se hallaron niveles muy reducidos de cinc en el testículo (Chan y col., 1981).

Pacientes con hemodiálisis crónica por uremia, los cuales presentan una deficiencia en cinc, desarrollan disfunción testicular y se ha demostrado que dicha alteración puede ser revertida por la administración del metal en la dieta (Antoniu y col., 1977). Asimismo, en ciertos tipos de oligospermias la terapia con cinc, restaura los niveles de andrógenos plasmáticos y el número de espermatozoides (Hartoma y col., 1977).

Considerables cantidades de este metal han sido detectadas en el testículo de rata (Prasad y col., 1967). Sin embargo, en el hombre el contenido de cinc en testículo y epidídimo no ha sido documentado.

INFLUENCIA DE LA PRL EN LA FUNCION GONADAL MASCULINA.

La PRL es sintetizada por las células acidófilas de la adenohipófisis denominadas lactotropos. Esta hormona es la única entre las elaboradas por la hipófisis anterior, cuya secreción está sometida a un control inhibitorio hipotalámico dominante. Actualmente se acepta que fisiológicamente el factor inhibitorio (PIF) más importante es la dopamina, la cual es sintetizada en las neuronas tuberoinfundibulares del hipotálamo medio basal (Meites y col., 1972). La dopamina es liberada en la eminencia media y transportada hasta la hipófisis anterior por el sistema porta.

En algunas condiciones experimentales en los mamíferos y también en otras especies, coexistiría además un factor liberador de la secreción de esta hormona (PRF). Al respecto, la TRH ha sido preferentemente considerada como la hormona liberadora de PRL (Vale y col., 1977).

Muchos otros agentes pueden además modificar su secreción: la temperatura, stress, estradiol, algunos neurotransmisores como por ejemplo la serotonina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA), péptidos como endorfinas y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), sustancia P y otros.

En general todas las influencias que desde el medio externo o interno modifican la secreción de PRL, lo hacen fundamentalmente a través de los distintos factores hipotalámicos.

(Libertun y col., 1980; Mc Cann y col., 1984).

Entre las numerosísimas acciones biológicas adjudicadas a la PRL en diferentes sistemas biológicos, los efectos relacionados con la reproducción son los que predominan claramente en los mamíferos (Nicoll, 1971).

Desde el año 1941 se conoce la importancia de la PRL en la regulación de la función reproductiva en la hembra comprobándose su capacidad para regular la función ovárica y en especial la del cuerpo lúteo (Astwood, 1941; Evans y col., 1941). Es innegable además, su importancia en el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria como así también en la secreción de gonadotrofinas durante la lactación (Turkington, 1972).

La importancia de la PRL en la función reproductiva masculina, se ha establecido, sin embargo, a partir de estudios más recientes.

Huggins y col. (1946) observaron que la hipofisectomía ocasiona en perros atrofia testicular y prostática. Más tarde, Wood y Simpson (1961) comprobaron que la administración de PRL a ratas hipofisectomizadas es capaz de revertir la involución gonadal post-hipofisectomía.

La capacidad de la PRL en influenciar la función gonadal fué también establecida por estudios realizados en ratones enanos deficientes genéticamente en PRL. Estos animales son infértiles pese a mantener normales los niveles de gona-

dotrofinas (Bartke, 1965), pero son capaces de responder al tratamiento con dicha hormona restaurando la espermatogénesis (Bartke, 1977).

La PRL es particularmente importante también en los cambios reproductivos que acontecen en animales que presentan variaciones estacionales en su ciclo reproductivo.

Interesantes evidencias de la participación de esta hormona en la función gonadal se establecieron en el hamster. Cuando estos animales son expuestos a cortos períodos de luz se observa atrofia testicular (Turek y col., 1975), disminución en los niveles séricos de PRL y también en la LH, FSH y testosterona circulantes (Bex y col., 1978). Cuando estos roedores son sometidos a cortos períodos de luz se les administra PRL ovina, recuperan el tamaño testicular, elevan los niveles de testosterona y restauran la espermatogénesis (Bartke y col., 1979).

En los últimos años se ha ido sosteniendo cada vez con mayor énfasis la idea de que la PRL tiene una acción directa sobre la función testicular (Hansson y col., 1976). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que existen importantes diferencias entre los niveles de PRL alcanzados, las distintas especies estudiadas y los modelos experimentales utilizados.

Al igual que otras hormonas peptídicas, la PRL ejercería sus efectos, interactuando con receptores específicos

localizados en la membrana celular de numerosos tejidos entre los que se incluyen las células de Leydig del intersticio testicular y el tubo epididimario (Charreau y col., 1977; Aragona y col., 1975). Es interesante consignar que dichos sitios específicos de unión para PRL en el testículo son modulados por los niveles periféricos de LH y por la hormona homóloga (Morris y col., 1980; Huhtaniemi y col., 1981). Entre las múltiples acciones de la PRL sobre la función testicular, probablemente la más importante es el efecto estimulador sobre el número de receptores de LH en las células intersticiales y su acción sinérgica con esta hormona. Esta observación ha sido realizada en diferentes modelos experimentales (Bex y col., 1977; Zipf y col., 1978).

Además de sus efectos sobre los receptores de LH, la PRL puede favorecer el contenido de colesterol esterificado en el testículo y las actividades de las enzimas 3 β y 17 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (Hafiez y col., 1972; Bartke, 1971). Estas acciones podrían ser consecuencias de sus efectos sobre los receptores de LH o representar puntos independientes de acción de la hormona.

La inducción de hipo e hiperprolactinemias de manera crónica en ratas prepuberales, por la administración de agonistas o antagonistas de la dopamina (bromocriptina o sulpirida respectivamente), demuestra una correlación positiva

va entre el número de sitios de unión de LH en el testículo y los niveles de PRL circulantes (Calandra y col., 1982).

Morris y col. (1980) describieron que la administración crónica de 100 µg de PRL/día a ratas adultas provoca una disminución en los receptores de LH. Esta observación fué la primera evidencia de que la PRL puede ejercer, según la dosis utilizada, efectos facilitatorios o inhibitorios sobre la función testicular.

Se han presentado también algunas evidencias relacionadas a un efecto agudo de la PRL sobre la función testicular. Luego de dos horas de la administración de una única dosis de PRL a ratas adultas, se observa un aumento significativo en los niveles séricos e intratesticulares de andrógenos (Belanger y col., 1981).

A pesar de existir numerosos trabajos relacionados a la acción de esta hormona en el eje hipotálamo-hipófisogonadal en distintas especies en la adultez, son relativamente escasos los estudios relacionados con los niveles de PRL circulantes y el funcionalismo testicular durante el desarrollo puberal. A este respecto, es interesante destacar que en la rata macho los niveles de PRL aumentan a partir de los 20-25 días de edad manteniéndose elevados hasta cerca de los 50 días, habiéndose sugerido que dicha hormona podría jugar algún papel en el desarrollo de los órganos sexuales (Negro Vilar y col., 1977).

En el hombre la PRL puede también ejercer efectos opuestos dependiendo de los niveles existentes. Mientras que una elevación crónica en los niveles de PRL se acompañan de hipogonadismo (Perryman y col., 1981), hipoprolactinemias inducidas por breves períodos de tiempo incrementan los niveles de testosterona sérica luego del estímulo con hCG (Ambrosi y col., 1976). Con relación a lo primero, existe unanimidad de criterio en cuanto a que las hiperprolactinemias patológicas inhiben la función gonadal en el hombre. Los síndromes de deficiencia de prolactina, aunque sumamente raros en el hombre, podrían también asociarse a alteraciones reproductivas (Turkington y col., 1972).

Los mecanismos de acción para estos fenómenos se han asentado tanto a nivel central como periférico. A nivel superior se ha constatado que el sistema opioide se halla involucrado, y así por ejemplo la administración de naloxona recupera la pulsatilidad en la descarga de LH. A nivel periférico se ha encontrado una respuesta disminuída de la gónada al test de estímulo con hCG (Faglia y col., 1983).

Por otra parte, se ha encontrado que la PRL se halla presente en el plasma seminal en niveles considerablemente más elevados que en el suero periférico (Sheth y col., 1975). Además, esta hormona se une específicamente a la membrana de los espermatozoides (Bartke, 1980). La información exis-

tente sobre el rol de la PRL a este nivel es contradictoria. Sin embargo, la mayoría de los autores indican que niveles elevados de PRL resultan en una menor concentración y motilidad de los espermatozoides. Recientemente se ha postulado además que la PRL ejerce un efecto negativo sobre la capacidad funcional de las gametas masculinas, pues espermatozoides humanos provenientes de pacientes hiperprolactinémicos muestran una capacidad anormal de penetración a ovocitos de hamster (Sueldo y col., 1985).

O B J E T I V O S.

En la sección anterior se ha tratado de resumir la información actualizada referente a ciertos aspectos de la regulación hormonal de la gonada masculina, habiéndose dedicado especial interés al papel desempeñado por la PRL y el cinc en la función reproductiva.

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

- 1.- Establecer las concentraciones intratisulares de andrógenos y cinc en tejido testicular y epididimario humano y estudiar las modificaciones en el eje hipófiso-gonadal luego de la inducción de la hipoprolactinemia.
- 2.- Analizar la posible participación de la PRL en la función testicular durante la maduración sexual de la rata.

PRIMERA PARTE

MATERIALES Y METODOS I

M A T E R I A L E S .

REACTIVOS UTILIZADOS.

Los compuestos radiactivos utilizados se obtuvieron de New England Nuclear Corp, EE.UU.: 1,2-³H-Testosterona, actividad específica 41.2 Ci/mmol, 1,2-³H-Dihidrotestosterona, actividad específica 50.6 Ci/mmol, 1,2-³H-Androstan-3 α , 17 β -diol-5 α , actividad específica 40.9 Ci/mmol, 1,2,6,7-³H-Androstenodiona 90 Ci/mmol y (¹²⁵I) INa.

Las placas de silica gel utilizadas para el control de pureza de los esteroides radiactivos fueron de 20 x 20 cm (Kieselgel 60 F 254) de Merck.

Los esteroides no radiactivos utilizados: testosterona, dihidrotestosterona (DHT), 5 α -androstandiol (3 α -Diol) y Δ_4 -Androstenodiona (Δ_4 Adiona) fueron de Sigma Chemical Comp. y Steraloids (EE.UU).

Los solventes fueron todos de calidad analítica, proviniendo según los casos de Merck, Mallinckrodt o Sintorgan.

La celita empleada para la separación de esteroides fué de grado analítico Filter-aid, Johns-Mansville (EE.UU).

El antisuero utilizado para el RIE de testosterona, obtenido por inmunización a conejos con testosterona conjugada en un período de 4 meses sucesivos y suministrada sus antígenos por vía intraperitoneal (IP) (100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 10 μ g/ml).

antisuero específico para DHT cedido por el Instituto Pasteur de París fue obtenido en conejos con DHT conjugada en posición 1 α con albúmina y carboximetiloxima. El antisuero utilizado para el RIE de 3 α -DIOL fue obtenido por inmunización en conejos con 3 α -DIOL conjugado en posición 15 con albúmina y carboximetiloxima (Immunotech, Montreal, Canadá).

El anticuerpo anti-Adiona fue obtenido por inmunización a conejos con Δ_4 androstenodiona conjugada en posición 6 con albúmina y hemocianina, cedido gentilmente por el Dr. Karl Pirke, (Max-Planck Institut für Psychiatrie, Munich, Alemania Federal). Para la determinación de LH se utilizó un anticuerpo cedido por National Pituitary Agency (batch Nº 2). Para la marcación y como estandar de referencia se utilizó en este RIE, hCG altamente purificada (31079; 20.000 IU IRP-2 h MG/mg) provisto por The Hormone and Isotope Laboratory, Aker Hospital Oslo, Noruega. El kit utilizado en la determinación de PRL por RIE fué provisto por la National Pituitary Agency (NIH-NPA, batch h-PRL-I-6). El carbón Norit A y el Dextran T-80 de Calbiochem utilizados en la separación de la fracción libre y unida en los RIE de esteroides fueron de Amend Drug Chem. Co. y de Pharmacia Fine Chem. respectivamente.

Todos las otras drogas y reactivos utilizadas se obtuvieron de Sigma Chem. Company (St. Louis, Missouri).

PACIENTES Y TRATAMIENTOS.

Las muestras de tejido testicular y epididimario utilizadas en este estudio fueron obtenidos de 31 pacientes que debieron ser orquidectomizados como terapia médica debido a diferentes patologías. La causa más frecuente de la indicación de la cirugía fué la presencia de un carcinoma de próstata y por ese motivo la mayoría de los pacientes tenían una edad superior a los 50 años. Ninguno de los pacientes estudiados habían recibido previamente tratamiento radiante y hormonal, con excepción de tres de ellos que fueron tratados con estrógenos. Dichos pacientes recibieron 5 mg de dienoestrol oral por día, por períodos de tiempo comprendidos entre 2 y 6 meses.

En un grupo de 12 pacientes, previo consentimiento, se indujo una hipoprolactinemia mediante la administración de bromocriptina (Parlodel, Sandoz, Suiza) durante 7 días consecutivos, a una dosis de 7.5 mg por día distribuidos en tres tomas diarias. Dicha droga ha sido utilizada por algunos grupos de trabajo en el tratamiento de esta patología prostática (Coune y col., 1975).

En las Tablas 1 y 2 se detallan las características de todos los pacientes estudiados, indicándose, edad, diagnóstico, tratamiento en caso de haberse efectuado y forma de obtención del tejido.

T a b l a 1.

| Paciente | Edad (años) | Diagnóstico | Tratamiento | Obtención del tejido |
|----------|----------------|-------------|---------------------|-------------------------|
| KJ | 76 | CP | ---- | Orquidectomía |
| FV | 59 | CP | ---- | " |
| LC | 71 | CP | ---- | " |
| AM | 61 | CP | ---- | " |
| LG | 62 | CP | ---- | " |
| JJ | 60 | CP | ---- | " |
| FH | 63 | CP | | " |
| FE | 64 | CP | ---- | " |
| GJ | 72 | CP | ---- | " |
| BG | 76 | CP | ---- | " |
| LM | 67 | CP | ---- | " |
| GR | 61 | CP | ---- | " |
| MO | 64 | CP | ---- | " |
| | | | dienoestrol 5mg/día | |
| SM | 68 | CP | " | " |
| FJ | 39 | CP | " | " |
| PF | 69 | CP | " | " |
| SJ | 55 | CPe | ---- | " |
| AB | 18 | CT | ---- | " |
| JY | 34 | CT | ---- | " |

CP : carcinoma de próstata.

CPe: carcinoma de pene.

CT : tumor de testículo.

T a b l a 2.

| Paciente | Edad (años) | Diagnóstico | Tratamiento | Obtención del tejido | |
|----------|----------------|-------------|---------------|-----------------------|---------------|
| | | | | biopsia testicular | orquidectomía |
| O | 52 | CP | --- | + | - |
| | | | bromocriptina | - | + |
| P | 58 | CP | --- | + | - |
| | | | bromocriptina | - | + |
| Q | 59 | CP | --- | + | - |
| | | | bromocriptina | - | + |
| R | 62 | CP | --- | + | - |
| | | | bromocriptina | - | + |
| S | 63 | CP | --- | + | - |
| | | | bromocriptina | - | + |
| T | 64 | CP | --- | + | - |
| | | | bromocriptina | - | + |
| U | 65 | CP | --- | + | - |
| | | | bromocriptina | - | + |
| V | 66 | CP | --- | + | - |
| | | | bromocriptina | - | + |
| X | 69 | CP | --- | + | - |
| | | | bromocriptina | - | + |
| K | 70 | CP | --- | + | - |
| | | | bromocriptina | - | + |
| Z | 71 | CP | --- | + | - |
| | | | bromocriptina | - | + |
| M | 73 | CP | --- | + | - |
| | | | bromocriptina | - | + |

CP: carcinoma de próstata.

bromocriptina: tratamiento por 7 días (7,5 mg/día).

M E T O D O S

OBTENCION DEL TEJIDO.

Respecto a la obtención del tejido debe consignarse que este fué obtenido mediante orquidectomía bilateral y por biopsia testicular en el caso de la muestra basal en los pacientes en que se indujo hipoprolactinemia, al momento de realizar la toma biópsica para el diagnóstico anatomopatológico del carcinoma. En ambos casos las operaciones se realizaron bajo anestesia peridural y el tiempo transcurrido entre la inyección del anestésico y la cirugía fué en todos los casos de 20 minutos aproximadamente.

Cuando se obtuvieron muestras de sangre, las extracciones se efectuaron siempre previo a la anestesia y alrededor de las 8 horas.

PROCESAMIENTO DEL TEJIDO.

Luego de la obtención, las piezas quirúrgicas fueron enfriadas rápidamente y trasladadas al Laboratorio en forma inmediata. En 2 casos, diferentes muestras provenientes del mismo paciente fueron mantenidas en hielo seco y en hielo común para evaluar la conservación de las mismas durante el transporte

Cada una de las muestras de tejido fueron fraccio-

nadas en 3 alícuotas diferentes, adecuadas a la realización de las determinaciones que se detallan a continuación:

a) Dosaje de andrógenos: Se pesaron 100 a 300 mg de tejido testicular o epididimario y se colocaron en viales de vidrio con 5 ml de acetona, conservándose a -20°C hasta su procesamiento.

En 9 casos el tejido epididimario fue cuidadosamente separado en sus tres segmentos principales cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) y separaron fracciones de cada segmento independientemente. En los restantes casos los estudios se realizaron en fracciones de Ca del epididimo. En los estudios de paralelismo para las determinaciones de testosterona y DHT en los tejidos considerados, se pesaron fracciones de 36, 52, 112 y 194 mg de tejido testicular de un paciente y 48, 70, 108 y 212 mg de porción de la cabeza del epididimo correspondiente. Con el mismo objetivo, y para el dosaje de 3α -Diol se tomaron 103, 165 y 309 mg de tejido testicular y 70.8, 122 y 192.3 mg de tejido epididimario de otro paciente.

Con el objeto de evaluar una posible metabolización, se obtuvieron muestras de tejidos correspondientes a 3 pacientes las que fueron procesadas inmediatamente siendo homogeneizadas en acetona y buffer fosfato.

b) Dosaje de Cinc: Se pesaron porciones de tejido de aproxi-

madamente 100 mg y se colocaron en tubos de polietileno conservándose, a -20°C , hasta el momento de su determinación por espectroscopía en absorción atómica.

c) Control histológico del tejido: En todos los casos estudiados una pequeña porción de tejido fue fijada en solución de Bouin y posteriormente procesada para realizar el estudio histológico.

DOSAJE DE ANDROGENOS TESTICULARES Y EPIDIDIMARIOS.

- EXTRACCION Y PARTICIONES CON DIFERENTES SOLVENTES.

Para poder determinar los niveles de andrógenos en el tejido fué necesario realizar una preparación previa del tejido con el objeto de eliminar interferencias. Las muestras una vez descongeladas, se homogeneizaron en 5 ml de acetona en un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA Werk, Breisgau) mediante 4 golpes de 15 segundos con intervalos de 30 segundos de enfriamiento cada vez. Previamente se habían agregado a las muestras los esteroides radiactivos (^3H -Testosterona ^3H -DHT y ^3H -3 α -Diol) en calidad de estandars internos para evaluar las pérdidas ocurridas durante el procesamiento. Los esteroides tritiados se prepararon en acetona, se agregó a cada tubo 6000 dpm en 100 μl , se incubó durante 10 minutos y se centrifugó a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se trasvasó a tubos cónicos, dividiendo cada muestra en dos partes y se evaporó a sequedad.

El extracto, obtenido se resuspendió con 1 ml de agua bidestilada, se calentó a 50°C durante 10 minutos y se agitó en un agitador "Vortex" durante 1 minuto.

La extracción se realizó con éter, agregándose 10 ml de solvente por tubo. Los tubos fueron agitados durante 2 minutos y se congeló la fase acuosa en una mezcla de hielo seco y acetona. Se trasvasó la fase etérea a otro tubo cónico y luego una vez evaporada a sequedad, se retomó con 1.4 ml de metanol. Luego de agitar los tubos durante 1 minuto se les agregó 0,6 ml de agua y se agitó nuevamente durante 1 minuto.

Para eliminar interferencias de lípidos en los tejidos se realizó una segunda partición con hexano. Se agregó a cada tubo 2 ml, se agitó durante 2 minutos y se descartó la capa superior. Posteriormente se agregaron 6 ml de diclorometano a cada tubo, agitándose durante dos minutos. La capa superior fué descartada, evaporándose a sequedad la fase de diclorometano.

Finalmente se redisolvió el extracto con 1 ml de iso-octano. Las muestras fueron luego cromatografiadas en microcolumnas de celita para separar los distintos andrógenos.

- CROMATOGRAFIA EN MICROCOLUMNAS DE CELITA:

Entre las diferentes metodologías utilizadas para ais-

lar esteroides, la cromatografía en columnas de celita presenta varias ventajas. Constituye un soporte inerte adecuado para la fase fija en una cromatografía de reparto y no presenta blancos detectables en la curva estandar del RIE. Para conseguir un perfil de elución de buena reproducibilidad fue necesario evitar la variabilidad en el contenido de agua de la celita influenciada en gran medida por el medio ambiente. A tal fin y previo al armado de las columnas se realizó la activación de la celita a 400°C durante 6 horas y se conservó en estufa a 100°C hasta su utilización.

La fase estacionaria en esta cromatografía está constituida por los solventes etilenglicol-propilenglicol en relación 2:1 V/V. La celita se mezcló cuidadosamente con los solventes (1:1 p/v) hasta obtener una pasta homogénea y esponjosa (20-30 minutos). Luego se llenaron las columnas de vidrio de 0.5 cm de diámetro y 50 cm de largo de manera de obtener una altura de llenado de 5 cm. En la parte inferior se colocó un pequeño disco de teflón poroso y las columnas se compactaron de manera uniforme. Una vez armadas las columnas, se realizó un lavado de las mismas con 10 ml de isooctano. Las muestras que habían sido resuspendidas en 1 ml de isooctano se sembraron en cada columna y posteriormente se eluyeron los esteroides utilizando como fase móvil mezclas de solventes de diferentes polaridad para cada hormona.

La elución se llevó a cabo con Nitrógeno a presión constante de manera de obtener un goteo de aproximadamente 20 gotas por minuto. La temperatura ambiente se mantuvo siempre alrededor de 20°C.

El diagrama de elución de las columnas fué el siguiente:

- a) 1 ml de muestra disuelta en isooctano (siembra).
- b) 5 ml de isooctano (lavado).
- c) 4 ml de isooctano: tolueno 70 : 30 (eluye DHT).
- d) 2 ml de isooctano: tolueno 60 : 40 (lavado).
- e) 4 ml de isooctano: tolueno 60 : 40 (eluye testosterona).
- f) 6 ml de ciclohexano: acetato de etilo 85 : 15 (eluye 3 α -Diol).

Los volúmenes recogidos se evaporaron a sequedad y se resuspendieron en el buffer utilizado en el RIE. Luego del agregado de solución centellante, una fracción de cada tubo fué contada en un Contador de Centelleo Líquido. Las recuperaciones obtenidas por este método se calculan comparando la actividad (cpm) en cada una de las muestras con la del estandar original agregado.

- RADIOINMUNOENSAYO (RIE).

La composición del buffer en que se resuspendieron las muestras para dosarlas mediante RIE fue la siguiente:

Para un litro de solución: $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}.7\text{H}_2\text{O}$ 10.8 g.

| | |
|--|-------|
| $\text{PO}_4\text{NaH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ | 4.7 g |
| Azida sódica | 1 g |
| ClNa | 9 g |
| Gelatina | 1 g |

Este buffer ajustado a pH 7, fue además utilizado para la preparación de las soluciones estandars, la dilución de los antisueros y trazadores y la preparación de la suspensión del carbón.

Las curvas estandars se prepararon con esteroides no marcados en un rango de 12.5 a 800 pg/ 100 μl de buffer a partir de soluciones madres de 16 $\mu\text{g/ml}$ en etanol. Las diluciones se renovaron mensualmente y se conservaron 4°C. La solución madre se preparó anualmente y se aguardó a -20°C.

Los andrógenos radiactivos se guardaron en etanol o benceno: etanol 9 : 1 de acuerdo a su polaridad y se conservaron a 4°C.

La pureza de los esteroides radiactivos fué controlada mensualmente por cromatografía en capa delgada en placas de silica gel 20 x 20 (Kieselgel 60 F 254, Merck). Se utilizó como solvente de desarrollo el sistema cloroformo/metanol 98:2 y los Rf para cada andrógeno fueron: testosterona: 0.41, dihidrotestosterona: 0.53 y 3 α -androstandiol: 0.28. Para su utilización en el ensayo los andrógenos tritiados se prepararon en buffer fosfato (12.000 a 15.000 dpm/100

µl) y utilizados siempre dentro de los tres días de haber sido preparados.

Los antisueros empleados para dosar testosterona, DHT y 3 α -Diol se diluyeron en el momento de realizar el ensayo en buffer fosfato a una concentración previamente establecida que unía aproximadamente el 40% del andrógeno marcado.

A continuación se detalla el porcentaje de reacción cruzada con una serie de esteroides y que fué calculada como la relación entre la masa de esteroides necesaria para producir un desplazamiento del 50% en la curva, con respecto a la masa del esteroide en estudio necesaria para producir el mismo desplazamiento.

Anti-Testosterona.

| | | |
|----------------------------------|-------|---|
| testosterona | 100 | % |
| dihidrotestosterona | 100 | % |
| epitestosterona | 0.1 | % |
| androstandiol | 1.6 | % |
| androstandiona | 0.3 | % |
| dehidroepiandrosterona | 0.002 | % |
| estradiol | 0.003 | % |
| estriol | 0.001 | % |
| estrona | 0.001 | % |
| progesterona | 0.05 | % |
| 17 α -hidroxiprogesterona | 0.003 | % |
| desoxicorticosterona | 0.001 | % |

Anti-DHT

| | | |
|--|------|---|
| dihidrotestosterona | 100 | % |
| testosterona | 23 | % |
| 5 α -androstan-17 β -ol-3-ona | 1.5 | % |
| androstenediona | 0.6 | % |
| androstenediol | 0.3 | % |
| androsterona | 0.17 | % |

Anti-3 -Diol

| | | |
|--|-----|---|
| Androstan-3 α -, 17 β -diol | 100 | % |
| pregnan-3 α -ol-20-ona | 5 | % |
| dihidrotestosterona | 0.3 | % |
| testosterona | 0.2 | % |
| progesterona | 0.1 | % |
| pregnenolona | 0.1 | % |
| 17 α -OH-progesterona | 0.1 | % |
| dehidroepiandrosterona | 0.1 | % |
| androstenediona | 0.1 | % |
| estrona | 0.1 | % |
| estradiol | 0.1 | % |

La suspensión de carbón utilizada para la separación de las fracciones libres de la unida se preparó en buffer al 0.5% con el agregado de dextrán (0.05%) y se guardó a 4°C

por períodos de tiempo no mayores de 15 días. En el momento de utilizarlo se agitó durante 15 minutos a 4°C.

Los ensayos se realizaron en un volumen final de 0.5 ml, las muestras y la curva estandar se ensayaron por duplicado, y las alícuotas requeridas para cada una de las muestras se llevaron a 300 μ l con buffer fosfato. Los estandars de cada andrógeno se agregaron en cantidades de 12.5 a 800 pg, en alícuotas de 300 μ l en el mismo buffer. El anticuerpo fué agregado en un volumen de 100 μ l. Finalmente, se agregó la solución del andrógeno radiactivo, 100 μ l por tubo (12.000-15.000 dpm). Anticuerpos, trazadores y estandars o desconocidos, se incubaron a 4°C durante 16 a 20 horas. Las fracciones libres y unidas al anticuerpo se separaron con el agregado de 200 μ l de la solución de carbón-dextrán. Luego de mezclar cada tubo, estos se mantuvieron a 4°C durante 10 minutos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada.

El sobrenadante que contenía la fracción unida al anticuerpo fué trasvasado a viales de polietileno que contenían 0.3 ml de dioxano y a los cuales se agregó 2.4 ml de solución de centelleo. La radiactividad presente se determinó en un Contador de Centelleo Líquido.

Cálculos: Se realizó una transformación logit-log de los datos para la evaluación de curvas estandars y cálculo

de desconocidos. La regresión lineal fue calculada luego de truncamiento.

Los datos fueron corregidos de acuerdo a la alícuota tomada, recuperación calculada y mg de tejido utilizados, de manera que las concentraciones de los andrógenos se expresaron en ng de andrógeno presente por gramo de tejido.

DETERMINACION DE Zn POR ABSORCION ATOMICA.

Es un método muy sensible capaz de detectar cantidades del orden de nanogramos del elemento en cuestión.

Se debe obtener el metal en estado de vapor atómico, lo cual se logra vaporizando la solución de muestra sobre una llama oxidante (generalmente de aire-acetileno) y produciendo luego transiciones electrónicas del metal mediante procesos excitatorios propios de una lámpara de cátodo hueco.

- PREPARACION DE MUESTRAS Y SOLUCIONES ESTANDARS.

Se utilizó una solución patrón preparada a partir de un estandar de sulfato de cinc en solución 0.1 M Tritisol que se llevó a 2 litros con CLH 1% (V/v). A partir de esta solución y en el momento de realizar las determinaciones, se realizaron diluciones para lograr concentraciones de 0.5 µg/ml que se usaron como testigos.

Los tejidos a analizar, (testículos y epidídimos) una vez descongelados, se homogeneizaron en agua bidestilada (2.5 ml), se guardaron 200 µl para determinar proteínas, y el

volumen restante fue sometido a la técnica "Wet Ashing" para destruir la materia orgánica.

A cada homogenato se le agregó 1 ml de mezcla HNO_3 : HClO_4 (1:1) v/v y se calentó a ebullición durante 2-3 horas. Al cabo de este período, se verificó que la solución resultante fuera límpida y sin resto de tejido alguno. Se dejó enfriar y se llevó a 10 ml con agua bidestilada.

Se preparó también un blanco de reactivos consistente en agua bidestilada con el agregado de 1 ml de HNO_3 : HClO_4 . Este se sometió al mismo tratamiento que las muestras, calentamiento y dilución a 10 ml con agua bidestilada.

Las muestras así preparadas se sometieron a la determinación de Zn por triplicado en el espectrómetro de absorción atómica que funciona en el Instituto de Neurobiología (Servicio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

CONTROL HISTOLOGICO DEL TEJIDO. El tejido testicular fresco se fijó en Bouin y luego de embeberlo en parafina, secciones de 5 μm fueron teñidos con hemotoxilina/eosina y ácido periódico de Schiff /hemotoxilina. En todos los casos se evaluó el estado del intersticio y los tubos seminíferos de cada preparado en un Microscopio Zeiss Standard 18 con accesorios de microfotografía automático.

DETERMINACIONES HORMONALES EN EL SUERO DE LOS PACIENTES.

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción venosa de la vena antecubital de cada paciente pre y post tratamiento con bromocriptina y mantenidas a temperatura ambiente hasta su coagulación. Luego de centrifugados, los sueros obtenidos fueron guardados a -20°C hasta el momento de ser utilizados para la determinación de PRL, LH y hormonas esteroideas.

- MEDICION DE PRL Y LH SERICAS.

Para la determinación de PRL y LH séricas se utilizaron técnicas de RIE de doble anticuerpo. El ensayo se efectuó en alícuotas de 50 y 200 μl de suero respectivamente y por duplicado. Sobre los sueros alícuotados se agregó el primer anticuerpo y se incubó a 4°C durante 24 hs. Se agregó luego la hormona marcada y al cabo del tercer día el segundo anticuerpo. Luego de mantener las muestras a 4°C entre 48-72 hs., se separó la hormona unida de la libre mediante centrifugación. Se aspiró el sobrenadante de cada muestra y en los precipitados correspondientes a los complejos hormona-anticuerpo se contó la radiactividad en un Contador Gama Automático Beckman modelo 4000.

Los resultados para PRL y LH humanas se expresaron en ng/ml y mUI/ml respectivamente.

- MEDICION DE ANDROGENOS SERICOS.

Para la determinación de andrógenos plasmáticos se realizaron tres extracciones previas con éter etílico, siendo la relación volumen total de éter/suero de 10 a 1. Luego de evaporarse la fase orgánica se resuspendieron las muestras en buffer fosfato.

La testosterona se determinó sobre alícuotas equivalentes a 40 μ l de suero. No se realizó separación previa de esteroides en columnas de celita y debido a que el antisuero utilizado cruza con DHT, los niveles de testosterona evaluados en suero corresponden a la suma de testosterona + DHT.

Las alícuotas utilizadas para la determinación de Δ_4 androstenodiona y 3 α -Diol correspondieron a 80 y 300 μ l de suero original respectivamente.

Los ensayos para testosterona y 3 α -Diol fueron idénticos a los descriptos anteriormente y el método utilizado para la medición de Δ_4 androstenodiona fue realizado con el mismo protocolo experimental.

Los resultados obtenidos para testosterona y Δ_4 androstenodiona se expresaron en ng/100 ml y los correspondientes a 3 α -Diol plasmáticos en pg/ml.

El límite de sensibilidad del método para todos los ensayos en suero fué 12.5 pg y los errores intra e interensayo fueron en todos los casos inferiores al 10%.

OTROS METODOS.

Las mediciones de proteínas fueron hechas por el método de Lowry y col.(1951) empleando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

Para el análisis de los datos se utilizó el test de Student no apareado y cuando se comparó el efecto del tratamiento con bromocriptina para los distintos parámetros se utilizó el test apareado. De este modo, en el presente estudio cada paciente resultó ser su propio control.

RESULTADOS I

NIVELES DE ANDROGENOS Y CINC EN TEJIDO

TESTICULAR Y EPIDIDIMARIO HUMANO:

CONTROLES METODOLOGICOS.

- VALIDACION DEL METODO:

Los andrógenos presentes en el testículo y epidídimo se midieron por radioinmunoensayo (RIE) luego de homogeneización en acetona, extracción con éter, partición con diferentes solventes y posterior aislamiento en microcolumnas de celita. Para realizar una evaluación adecuada de esteroides en tejido por dicho método fue necesario demostrar que no existían interferencias en el ensayo.

Dos criterios han sido clásicamente utilizados para validar el dosaje de esteroides por RIE, en primer lugar ausencia de blancos de reactivos y en segundo lugar existencia de paralelismo entre la curva estandar y una curva construída con cantidades crecientes de tejido. En todos los ensayos realizados los blancos de reactivos fueron no detectables.

El test de paralelismo se llevó a cabo aplicando criterios desarrollados por Rodbard y col.(1974).

Una vez obtenidos los órganos, se disecaron inmediatamente 4 muestras de cada tejido de un mismo paciente y se procesaron en idénticas condiciones experimentales. Luego de la extracción y purificación del esteroide tal como se describió

en la sección Materiales y Métodos, todas las muestras utilizadas para el test se evaluaron en un mismo RIE.

Al procesar los datos mediante análisis de regresión y transformación logit-log (Figura 3) se obtuvo una pendiente ($p \pm ES$) para la curva estandar de testosterona de 2.30 ± 0.03 , mientras que las correspondientes a dicha hormona en testículo y epidídimo fueron 2.62 ± 0.06 y 2.09 ± 0.07 respectivamente. Los mg de tejido utilizados están corregidos por la recuperación calculada luego del agregado de un estandar interno a cada muestra y se indican en el eje de las abscisas.

Como puede observarse, existe un claro paralelismo en los ensayos de testosterona testicular y epididimaria sin diferencias significativas entre las pendientes.

Respecto a la determinación de DHT en ambos tejidos también se observó paralelismo (Figura 4). En este caso la pendiente que se obtuvo fue 2.19 ± 0.01 para la curva estandar y 2.30 ± 0.08 y 2.43 ± 0.06 las pertenecientes a la concentración de DHT en testículo y epidídimo respectivamente. La Figura 5 representa el resultado del test de paralelismo para concentración de 3α -Diol tisular. En este caso tampoco hubo diferencias significativas entre las pendientes de la curva estandar y aquellas correspondientes a los tejidos (curva estandar 2.43 ± 0.01 ; testículo: 2.20 ± 0.08 y epidídimo: 2.00 ± 0.09).

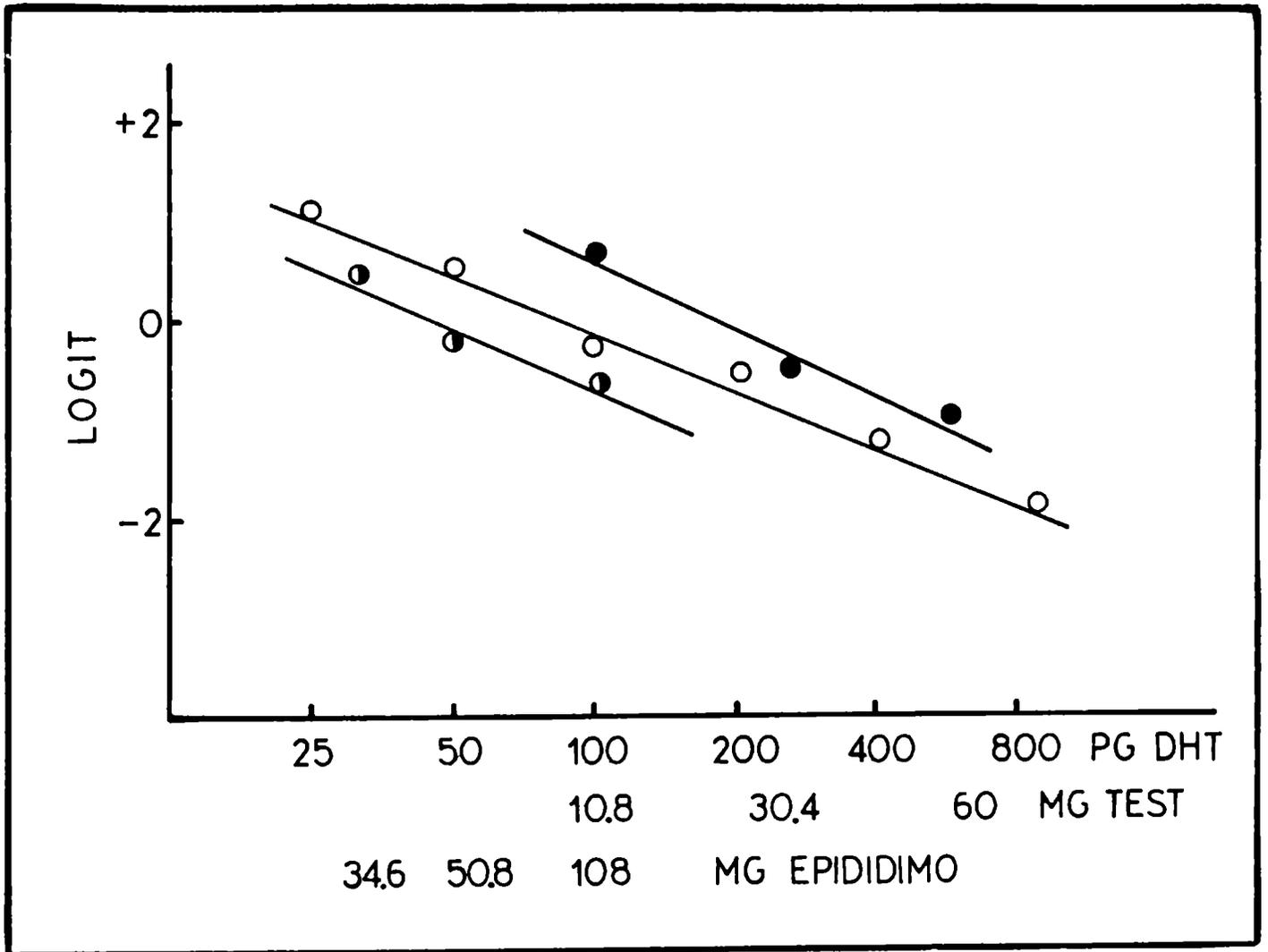


Figura 4.

Test de paralelismo entre la curva estandar de DHT y dos curvas construidas con cantidades crecientes de tejido testicular y epididimario .

(Se representa la función logit del porcentaje de unión en función del logaritmo de la concentración de DHT).

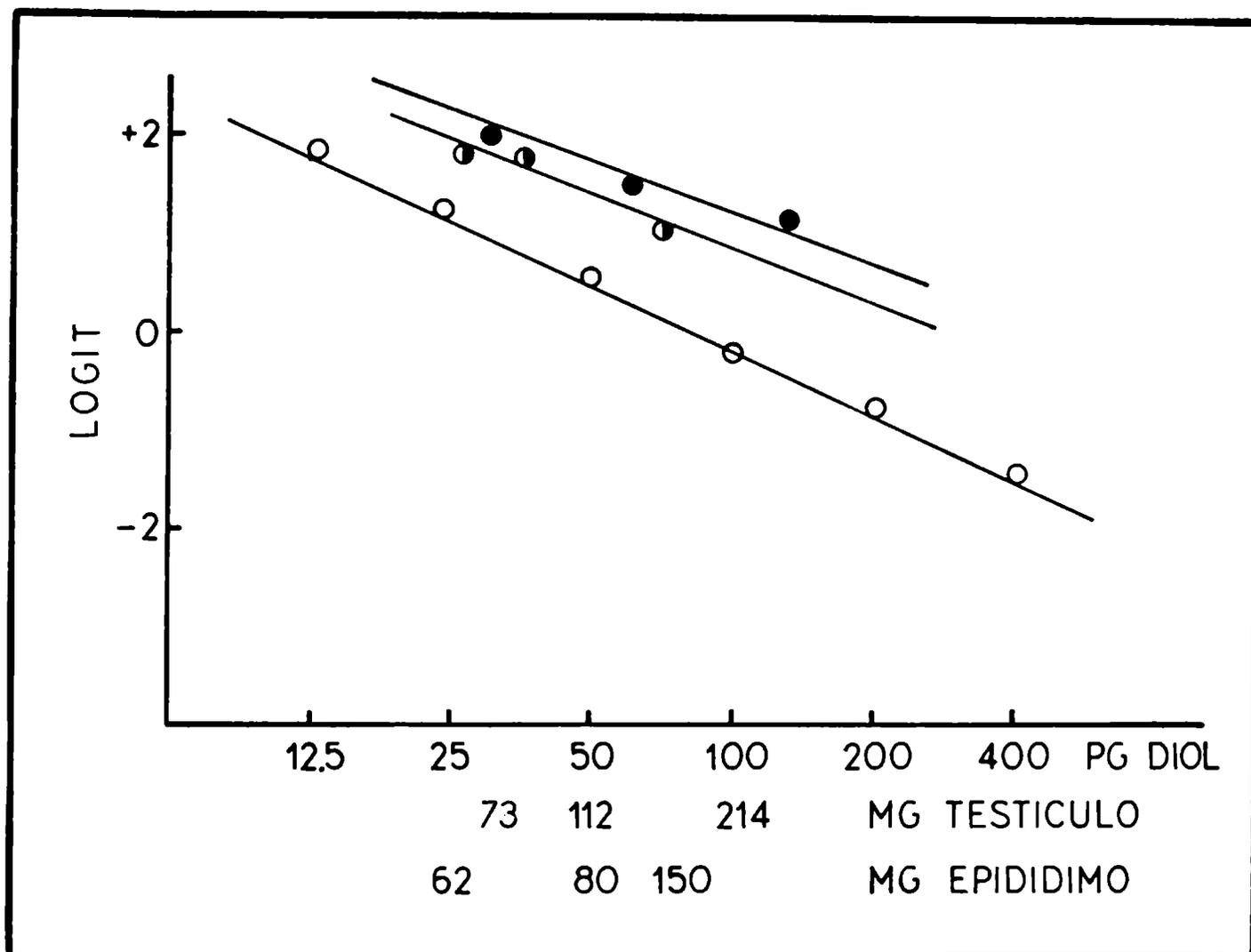


Figura 5.

Test de paralelismo entre la curva estandar de 3α -Diol y dos curvas construidas con cantidades crecientes de tejido testicular y epididimario .

(Se representa función logit del porcentaje de unión en función del logaritmo de la concentración de 3α -Diol).

- VARIACION INTER E INTRAENSAYO:

El siguiente paso fue establecer las variaciones intra e interensayo en los tejidos a estudiar. La primera se determinó a través de las diferencias de duplicados de muestras de tejido procesadas en un mismo ensayo y fueron para testosterona, DHT y 3 α -Diol: 9,8%; 11,1% y 11,8% respectivamente. En relación al epidídimo y los mismos andrógenos las variaciones fueron 10,8%; 11,3% y 11,9%.

Para analizar la variación interensayo se calculó el coeficiente de variación de los valores obtenidos de un pool de tejido testicular y otro epididimario medidos en circunstancias diferentes. Luego del análisis de los datos los resultados obtenidos en testículo fueron: 13,2%; 13,5% y 13,6% y en epidídimo: 12,8%; 13,8% y 14,1% para testosterona, DHT y 3 α -Diol respectivamente.

Por lo tanto, puede concluirse que el método empleado para la determinación de los 3 andrógenos tisulares, en ambos tejidos, presenta una buena reproducibilidad.

- EVALUACION DE PERDIDAS DURANTE LA EXTRACCION Y PURIFICACION DE ESTEROIDES:

La complejidad del método utilizado para la extracción de andrógenos tisulares y que permite su posterior dosaje por RIE, resulta en diferentes pérdidas en cada una de las muestras. Con el objeto de evaluar las mismas, se agregaron

6.000 dpm de cada andrógeno tritiado como estandar interno previo a la homogeneización.

En el eluido correspondiente a cada andrógeno, al final de la cromatografía en microcolumnas de celita, se determinó la radiactividad remanente. Los porcentajes de recuperación así calculados fueron los siguientes (\bar{X} + ES): testículo; n = 35, testosterona: $63,8 \pm 12,4\%$; DHT: $50,0 \pm 8,6\%$ y 3α -Diol: $64,1 \pm 9,0\%$ y epidídimo; n = 20, testosterona: $59,5 \pm 8,5\%$; DHT: $50,1 \pm 6,3\%$ y 3α -Diol $57,1 \pm 6,5\%$.

- TRANSPORTE Y HOMOGENEIZACION DE LOS TEJIDOS:

Se determinó si existían diferencias en las concentraciones de los diferentes andrógenos tisulares que dependieran de las condiciones de transporte de las muestras luego de la extracción del tejido. Con ese fin, muestras de tejido correspondientes a un mismo paciente, fueron transportadas al Laboratorio en hielo común (0 - 4°C) o hielo seco (-76°C). Como se muestra en la Tabla 3, no se detectaron diferencias significativas al transportar el tejido por uno u otro método.

Se han descripto importantes diferencias en los dosajes de andrógenos tisulares tanto en humanos como en la rata al homogeneizar los tejidos en buffer o en solventes orgánicos (Hammond y col., 1978; Campo y col., 1979). Teniendo en cuenta este antecedente, se homogeneizaron segmentos de una misma muestra en buffer o en acetona tal como se detalló en la sec-

T a b l a 3.

| Paciente | Transporte | Homogenización | Tejido (mg) | Testosterona (ng/g) | DHT (mg/g) |
|----------|------------|----------------|-------------|---------------------|------------|
| B | 0-4°C | buffer | 71,6 | 583 | 23,0 |
| B | 0-4°C | acetona | 51,0 | 699 | 18,0 |
| B | -76°C | acetona | 72,5 | 689 | 16,5 |
| H | 0-4°C | buffer | 96,8 | 542 | 21,0 |
| H | 0-4°C | acetona | 87,9 | 589 | 19,6 |
| H | -76°C | acetona | 85,4 | 551 | 20,0 |
| C | 0-4°C | buffer | 227,0 | 339 | 21,4 |
| C | 0-4°C | acetona | 222,0 | 419 | 17,9 |

Concentraciones de testosterona y DHT en biopsias de testículo de tres pacientes (B, H y C). El tejido fue alternativamente transportado a 0°C - 4°C ó a -76°C (hielo seco) y homogeneizado en buffer o acetona.

ción Materiales y Métodos Ira. Parte. Así pudo comprobarse que homogeneizando los tejidos en un medio acuoso se obtienen concentraciones de testosterona levemente menores y que en cambio las correspondientes a DHT son incrementadas. En vista de estos resultados se decidió transportar los tejidos entre 0-4°C, disecarlos a dicha temperatura y homogeneizarlos en acetona. Cuando las mediciones de andrógenos no se realizaron en forma inmediata las muestras en acetona se conservaron a -70°C hasta su procesamiento.

- CONCENTRACION DE TESTOSTERONA Y DHT EN TESTICULO.

La medición de andrógenos y sus metabolitos ha sido habitualmente realizada en muestras de sangre y orina, obteniéndose así cierta información respecto de la producción y metabolismo de dichas hormonas. Sin embargo, los niveles periféricos no siempre reflejan las concentraciones presentes en los tejidos, ya que ésta depende de numerosos factores tales como: metabolismo propio del tejido, proteínas que unen específicamente andrógenos, formación "in situ" de estas hormonas y la depuración del esteroide en el propio tejido.

La información existente hasta el presente en relación a las concentraciones intratesticulares de andrógenos en humanos es relativamente escasa (Ruokonen y col., 1972; Morse y col., 1973; Steinberger y col., 1974). Con el propósito de ampliar dicha información, se dosaron los andrógenos endó-

genos en testículos provenientes de un grupo de pacientes que debían ser orquidectomizados como parte de su plan terapéutico.

Con el objeto de establecer si el nivel de andrógenos en cada testículo era representativo del par, se estudiaron las concentraciones de testosterona y DHT en las gonadas derecha e izquierda simultáneamente. Los resultados obtenidos, representados en la Tabla 4, muestran que no hubo diferencias en las concentraciones de andrógenos entre una y otra gonada en ninguno de los casos estudiados, siendo los cambios experimentados menores que el coeficiente de variación intraensayo. A partir de ese momento se obtuvieron siempre muestras correspondientes a testículo derecho.

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos al estudiar la concentración testicular de testosterona y DHT en un grupo de pacientes (n = 25), con edades comprendidas entre 52 y 76 años (Promedio: 65 años), portadores de carcinoma de próstata. Estos pacientes no habían recibido tratamiento hormonal o radiante, previo a la orquidectomía. El nivel de testosterona resultó claramente superior al de su metabolito 5 α -reducido DHT. Los resultados expresados en ng/g de tejido fueron: (\bar{X} + ES) (testosterona: 501 \pm 41 versus DHT: 15,5 \pm 10,0) y la relación T/DHT fué 47,3 \pm 29,9. Si bien en la población estudiada, la relación T/DHT fue variable entre

T a b l a 4.

| Gonada | Tejido (mg) | Testosterona (ng/g) | DHT (ng/g) |
|------------------------|-------------|---------------------|------------|
| Derecha ₁ | 122,5 | 335,4 | 14,0 |
| Izquierda ₁ | 246,5 | 347,9 | 12,0 |
| Derecha ₂ | 162,0 | 613,0 | 24,5 |
| Izquierda ₂ | 194,0 | 652,0 | 26,0 |

Niveles de DHT y testosterona determinados simultáneamente en testí-
culo derecho e izquierdo de dos pacientes con carcinoma de próstata.

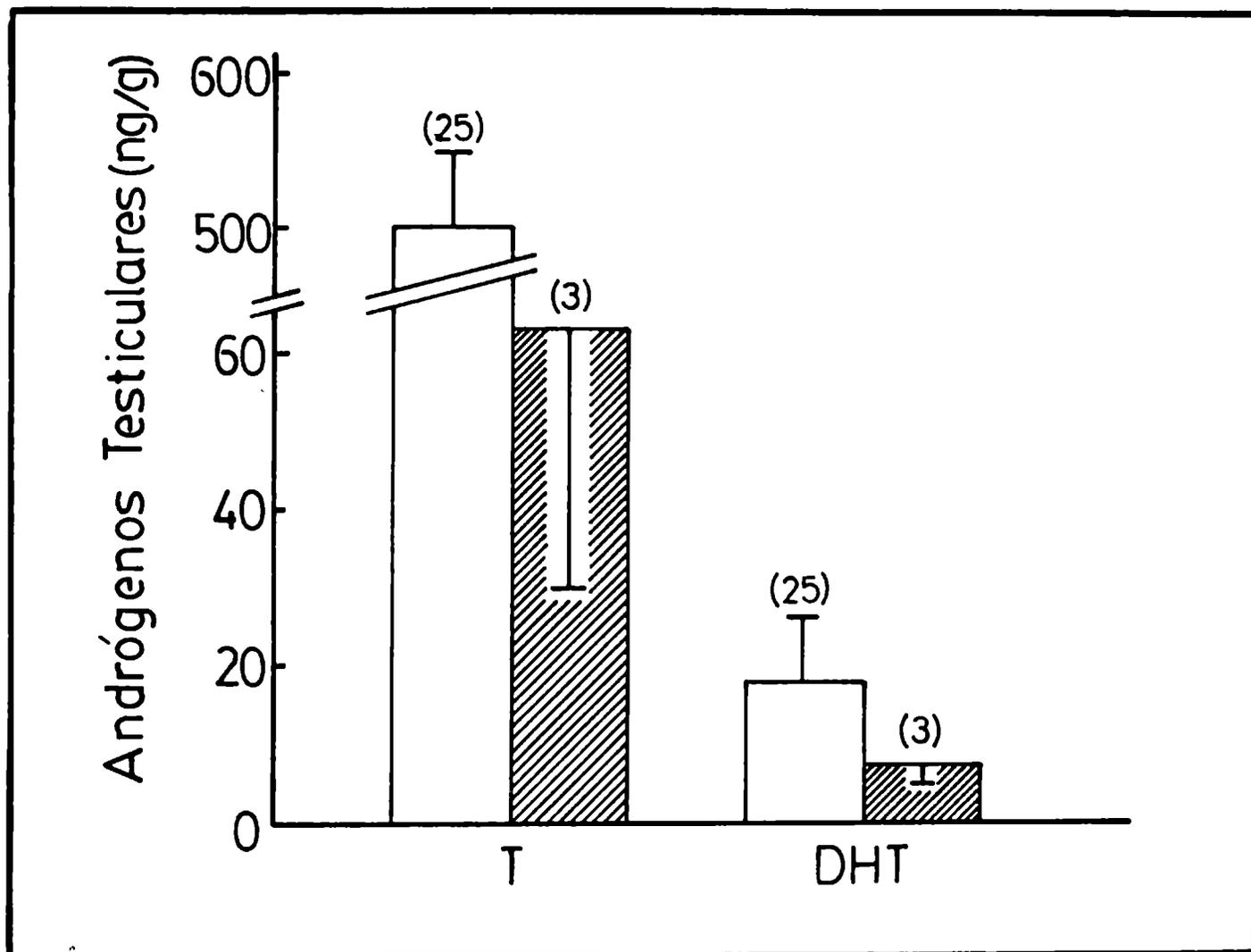


Figura 6.

Concentración de andrógenos testiculares determinados por RIE previa extracción, purificación y aislamiento en microcolumnas de celita. Las barras vacías corresponden a las concentraciones de T y DHT en pacientes con carcinoma de próstata sin tratamiento previo. Las barras sombreadas muestran las concentraciones de ambos andrógenos en pacientes con carcinoma de próstata tratados con dienoestrol, 5 mg/día durante más de 2 meses.

cada uno de los pacientes, la concentración de testosterona fue siempre por lo menos quince veces superior a la del andrógeno reducido.

Con fines comparativos se analizó además el contenido testicular de andrógenos en pacientes que presentaban otras patologías. Un paciente portador de un carcinoma de pene mostró niveles gonadales de testosterona: 253 y DHT: 31 ng/g (T/DHT: 12). Dos pacientes que presentaban un tumor de testículo mostraron concentraciones de testosterona: 862 y 765 ng/g; DHT: 17,7 y 12,8 ng/g y una relación T/DHT: 49 y 59,7 respectivamente.

Como puede observarse en las patologías estudiadas, tanto los niveles de andrógenos como la relación T/DHT resultaron en el rango de valores encontrados en los pacientes con carcinoma de próstata.

Los estrógenos son utilizados en el tratamiento del carcinoma de próstata por su conocido efecto inhibidor de la función testicular (Alder, 1968). Resultó entonces también de interés estudiar la concentración intratesticular de testosterona y DHT en un grupo de tres pacientes con carcinoma de próstata que habían recibido estrógenos (dienoestrol, 5 mg/día vía oral) durante un período promedio de 4 meses previo a la orquidectomía. En la Figura 6 se resumen los efectos de

dicho tratamiento, y puede observarse que mientras la concentración gonadal de testosterona descendió en un 85%, la correspondiente a DHT lo hizo en un 55% ($p < 0.001$).

Estos resultados confirman que la concentración de los dos andrógenos más importantes en la gonada masculina se hallan profundamente disminuidos durante la estrogenoterapia.

CONCENTRACIONES DE TESTOSTERONA Y DHT EN EPIDIDIMO.

Los andrógenos son sintetizados fundamentalmente en el sector intersticial del testículo y llegan a través de la rete testis o por vía sanguínea y linfática al epidídimo.

Se sabe que la función epididimaria es andrógeno-dependiente, habiéndose demostrado en el epidídimo proteínas receptoras de andrógenos en el citosol y núcleo, como así también una glicoproteína soluble que une específicamente andrógenos (ABP) (Blaquier, 1971; Blaquier y col., 1973; Ritzen y col., 1973). Ambos tipos de proteínas estarían involucradas en el mecanismo de acción de andrógenos en el tejido epididimario y por consiguiente en el proceso de maduración de los espermatozoides (Hansson y col., 1975).

Las concentraciones endógenas de testosterona y DHT en el epidídimo humano han sido poco investigadas (Purvis y col., 1978; Leionen y col., 1980).

Con el objeto de estudiar los niveles propios del tejido epididimario y relacionarlos a los de la gonada correspondien-

te, se midieron las concentraciones endógenas de testosterona y DHT en porciones de cabeza de epidídimo en 18 muestras pertenecientes a los mismos pacientes descritos previamente. Los resultados obtenidos están representados en la Figura 7. Como puede observarse la concentración de testosterona resultó significativamente mayor que la de DHT: ($\bar{X} + ES$); $38,58 \pm 2,96$ ng/g versus $18,37 \pm 1,96$ ng/g ($p < 0.01$). La relación T/DHT en este tejido fué $2,32 \pm 1,59$. Los datos muestran en el epidídimo una mayor proporción del andrógeno reducido respecto de la testosterona cuando se lo compara con los niveles presentes en el testículo (Figura 7).

En el paciente con carcinoma de pene la concentración de testosterona fue $37,6$ ng/g; la de DHT $18,7$ ng/g y la relación T/DHT $2,01$. En un paciente con tumor de testículo la testosterona fue $33,8$ ng/g, la DHT $23,5$ ng/g y la relación T/DHT $1,43$. Como se puede notar las concentraciones halladas para los andrógenos epididimarios en esta dos últimas patologías no presentan diferencias sustanciales con las halladas para los carcinomas de próstata.

CONCENTRACIONES DE ANDROGENOS EN DIFERENTES SEGMENTOS EPIDIDIMARIOS.

En varias especies animales, se ha descrito un gradiente de concentración de DHT desde la cabeza a la cola del epidí

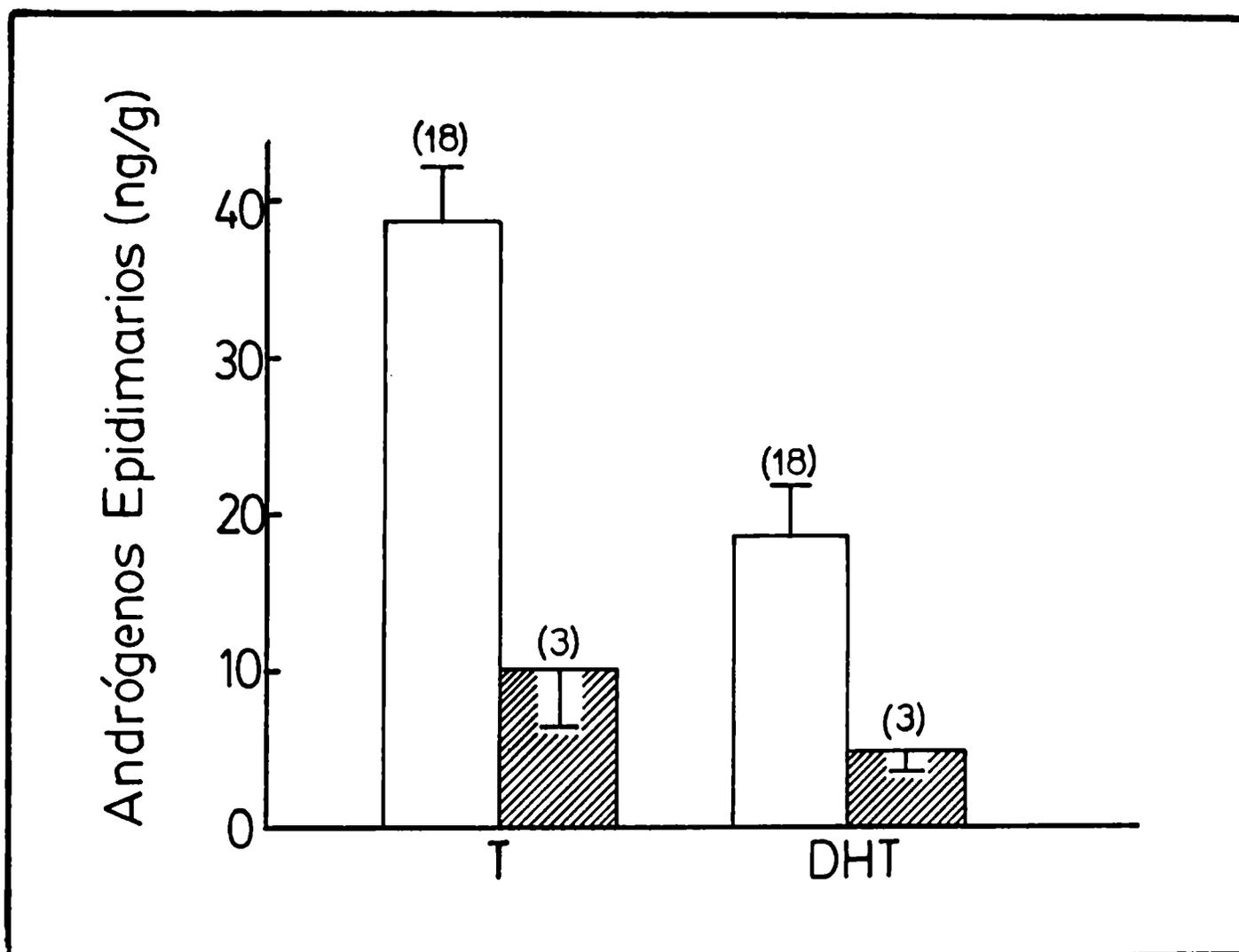


Figura 7.

Concentración de T y DHT determinados por RIE en la cabeza del epidídimo, en pacientes con carcinoma de próstata sin tratamiento previo (barras vacías) y luego de la administración de dienoestrol (5 mg/día) por períodos superiores a 2 meses (barras sombreadas).

dimo (Frankel y col. 1970; Aafjes y col., 1972). En la rata, los niveles de DHT se han correlacionado con un gradiente similar de ABP a lo largo de dicho tubo (Purvis y col., 1978).

Con el propósito de investigar la distribución de andrógenos en el epidídimo humano, se evaluaron los mismos en tres segmentos diferentes del órgano: cabeza, cuerpo y cola. Las muestras fueron obtenidas de 9 pacientes con carcinoma de próstata, 3 de los cuales habían sido tratados previamente con estrógenos. La Figura 8 resume las concentraciones encontradas en los diferentes segmentos epididimarios. La concentración de testosterona hallada ($\bar{X} \pm ES$) fue: cabeza $37,8 \pm 5,4$ ng/g; cuerpo: $40,9 \pm 7,7$ ng/g y cola: $40,2 \pm 6,7$ ng/g mientras que los niveles correspondientes a la DHT fueron; cabeza: $21,0 \pm 4,4$; cuerpo: $20,8 \pm 5,1$ y cola: $17,7 \pm 3,0$. Las relaciones T/DHT fueron: $1,9 \pm 0,4$; $1,9 \pm 0,3$ y $2,2 \pm 0,5$ respectivamente. Como puede observarse ambos andrógenos se distribuyeron uniformemente desde la porción proximal a la distal del epidídimo, no constatándose un gradiente de concentración semejante al que ha sido demostrado en varios modelos animales (Frankel y col., 1970). El tratamiento con estrógenos disminuyó significativamente los niveles de testosterona y DHT en cada uno de los segmentos epididimarios y los porcentajes de disminución fueron; testosterona: cabeza 73% ($p < 0.005$); cuerpo 76% ($p < 0.001$) y cola: 88% ($p < 0.005$); DHT, cabeza

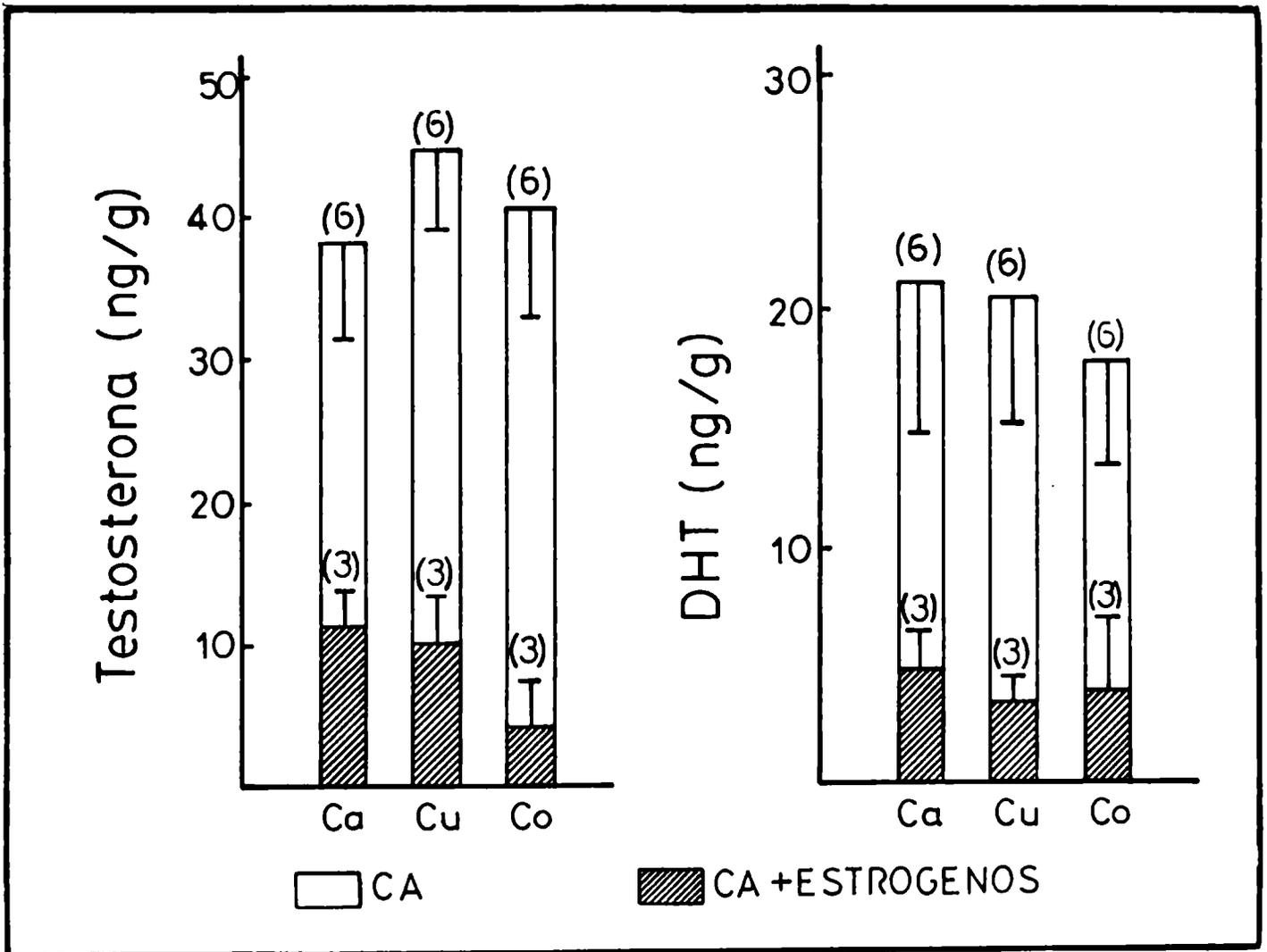


Figura 8.

Concentración de T y DHT en los diferentes segmentos epididimarios: cabeza (Ca) cuerpo (Cu) y cola (Co) en 6 pacientes con carcinoma de próstata sin tratamiento previo (CA) (barras lisas) y 3 pacientes que habían recibido dienoestrol (CA + estrógenos) durante 2 meses antes de la orquidectomía (barras sombreadas).

79% ($p < 0.01$); cuerpo 84% ($p < 0.02$) y cola 79% ($p < 0.01$) (Figura 8).

Las concentraciones de proteínas (Media \pm DS) en el tejido testicular y en los diferentes segmentos del epidídimo fueron: testículo; 50 ± 10 mg/g epidídimo; cabeza: 56 ± 12 mg/g; cuerpo: 54 ± 11 y cola: 57 ± 9 mg/g de tejido. Como se puede observar el contenido de proteínas está uniformemente distribuido entre los diferentes segmentos epididimarios y en este órgano con relación a la gonada. Por consiguiente los resultados de las concentraciones de andrógenos y cinc, mostrados y que se detallarán a continuación, no se modifican relativamente al expresarlos por gr de tejido o por mg de proteínas.

CONCENTRACIONES DE CINC EN TESTICULO Y EPIDIDIMO.

Se sabe que el cinc se encuentra en altas concentraciones en los órganos sexuales accesorios y es particularmente importante en el estudio de las diferentes patologías de la próstata (Maan y col., 1964). Por otra parte, se han descrito frecuentemente asociaciones de deficiencias de cinc con cuadros clínicos de hipogonadismo (Prasad, 1983).

Algunos autores han descrito concentraciones elevadas de este metal en testículo de rata; no existiendo hasta el presente, estudios simultáneos de andrógenos y cinc en testícu-

lo y epidídimo humano. Con el propósito de obtener este tipo de información y en el mismo grupo de pacientes anteriores se determinaron las concentraciones de cinc en biopsias de tejido testicular o epididimario. Luego de destruir la materia orgánica, el cinc fue determinado por espectroscopía en absorción atómica tal como se detalla en la sección Materiales y Métodos. La Figura 9 resume los resultados obtenidos, y como puede observarse las concentraciones de cinc fueron muy semejantes en los dos órganos analizados (Media \pm ES) testículo: $62,2 \pm 7,6$ ug/g y epidídimo $67,2 \pm 11,1$ ug/g de tejido.

En el grupo de pacientes bajo tratamiento con estrógenos, sólo se observó una tendencia a disminuir los niveles de cinc en cada órgano pero el efecto no fué estadísticamente significativo (Figura 9).

CORRELACION ENTRE ANDROGENOS TESTICULARES Y CINCO.

El cinc influencia la actividad de numerosas enzimas incluyendo la 5α -reductasa prostática, enzima responsable de transformar la testosterona a DHT. Habib y col. (1976), establecieron en pacientes con carcinoma e hiperplasia benigna de la próstata, algunas correlaciones entre el cinc y los andrógenos. En base a estos hallazgos es que resultó entonces de interés tratar de establecer si existía alguna correlación entre las concentraciones de andrógenos y el cinc en testículo y epidídimo.

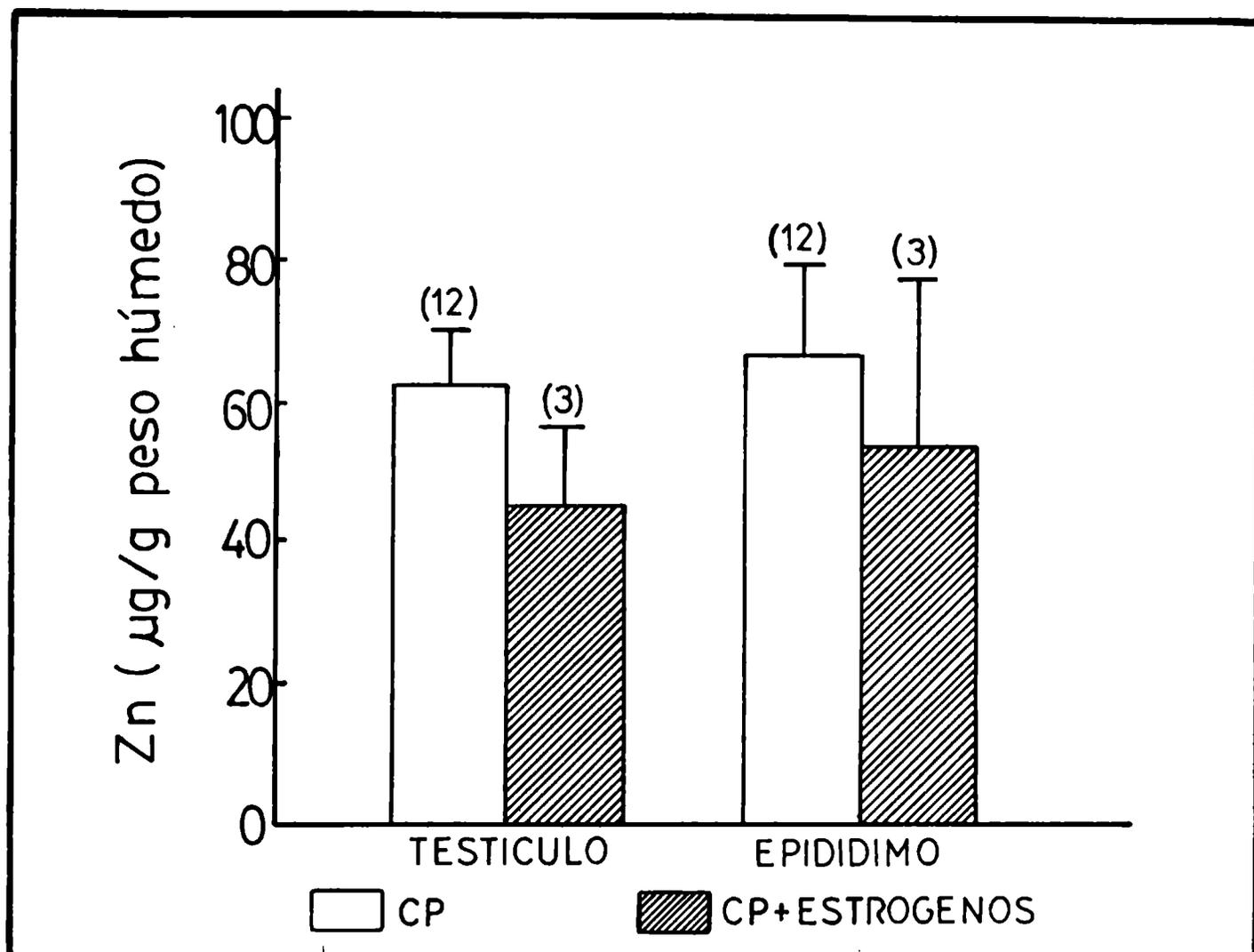


Figura 9.

Concentraciones de Zn en biopsias de tejido testicular y epididimario determinados por espectroscopía de absorción atómica previa destrucción de la materia orgánica. Las barras vacías corresponden a pacientes con carcinoma de próstata (CP) sin tratamiento previo y las sombreadas a 3 pacientes bajo tratamiento con estrógenos (CP + estrógenos).

En las Figuras 10 y 11 se muestran los niveles de testosterona y DHT versus cinc en la gonada. Como se observa, se obtuvo una correlación positiva que resultó estadísticamente significativa en ambos casos. El coeficiente de correlación calculado para testosterona versus cinc fué $r = 0.53$ ($p < 0.05$) y para la DHT versus cinc este resultó $r = 0.78$ ($p < 0.01$). El análisis de correlación para los mismos parámetros en el tejido epididimario de estos pacientes mostró una tendencia totalmente opuesta. Se obtuvo una correlación negativa para ambos andrógenos y el cinc, resultando estadísticamente significativa sólo para testosterona versus cinc, con un coeficiente de correlación $r = 0,65$ ($p < 0.05$) (Figura 12). El coeficiente de correlación para DHT versus cinc fué $r = 0,37$ (Figura 13).

CONCENTRACIONES DE 3α -DIOL EN TESTICULO Y EPIDIDIMO.

En algunos de los pacientes con carcinoma de próstata se evaluó conjuntamente con la testosterona y DHT, el 3α -DIOL que resulta de la metabolización de esta última por acción de la enzima 3α -hidroxiesteroide-deshidrogenasa. En las Figuras 14 y 15 se muestran los resultados obtenidos en el tejido testicular ($n = 16$) y epididimario ($n = 10$). Las concentraciones de 3α -Diol en ambos órganos fueron muy bajas y sensiblemente menores que las de DHT. Dichos valores fueron

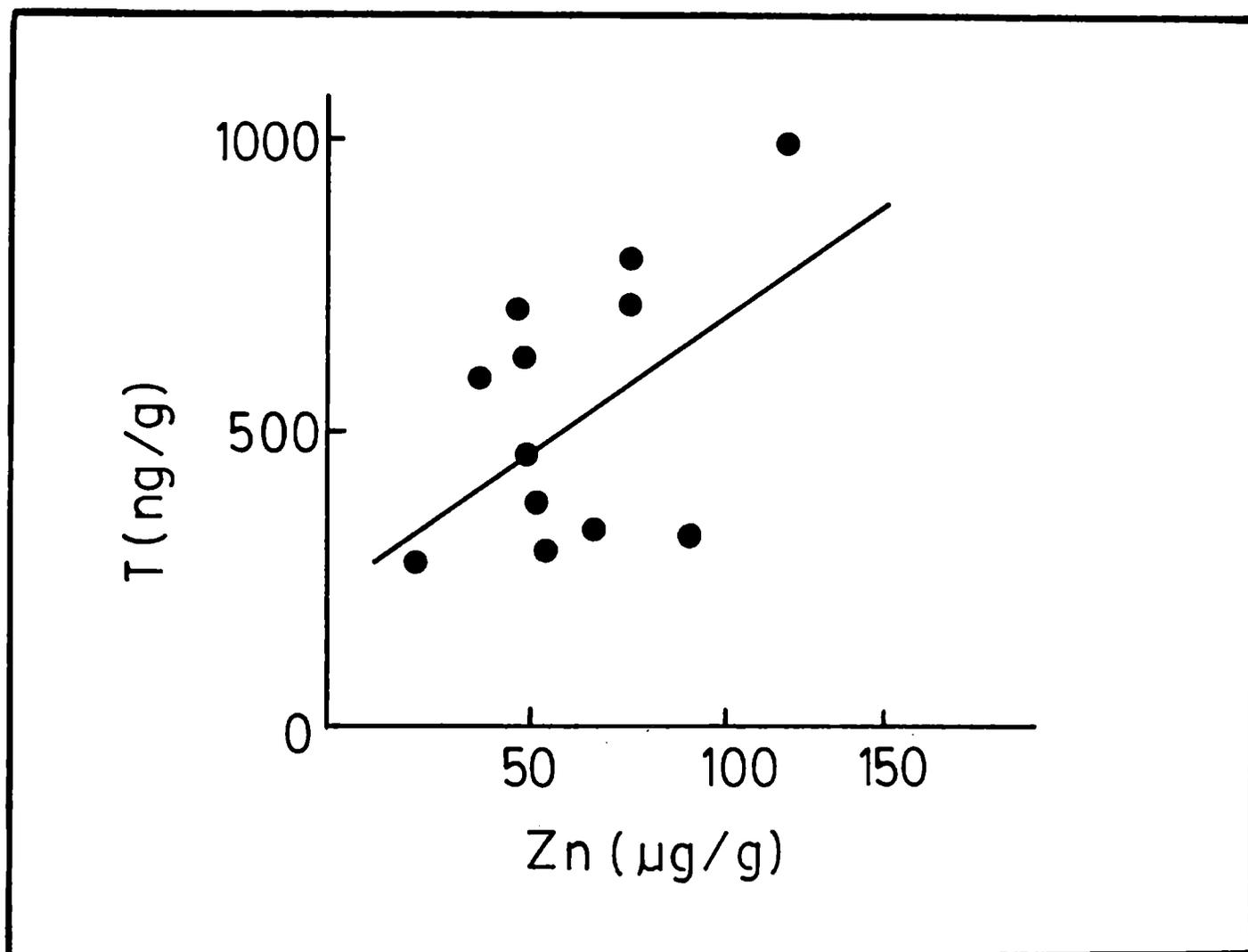


Figura 10.

Relación entre las concentraciones de T y Zn en tejido testicular humano. Coeficiente de correlación $r = 0.53$ ($p < 0.05$).

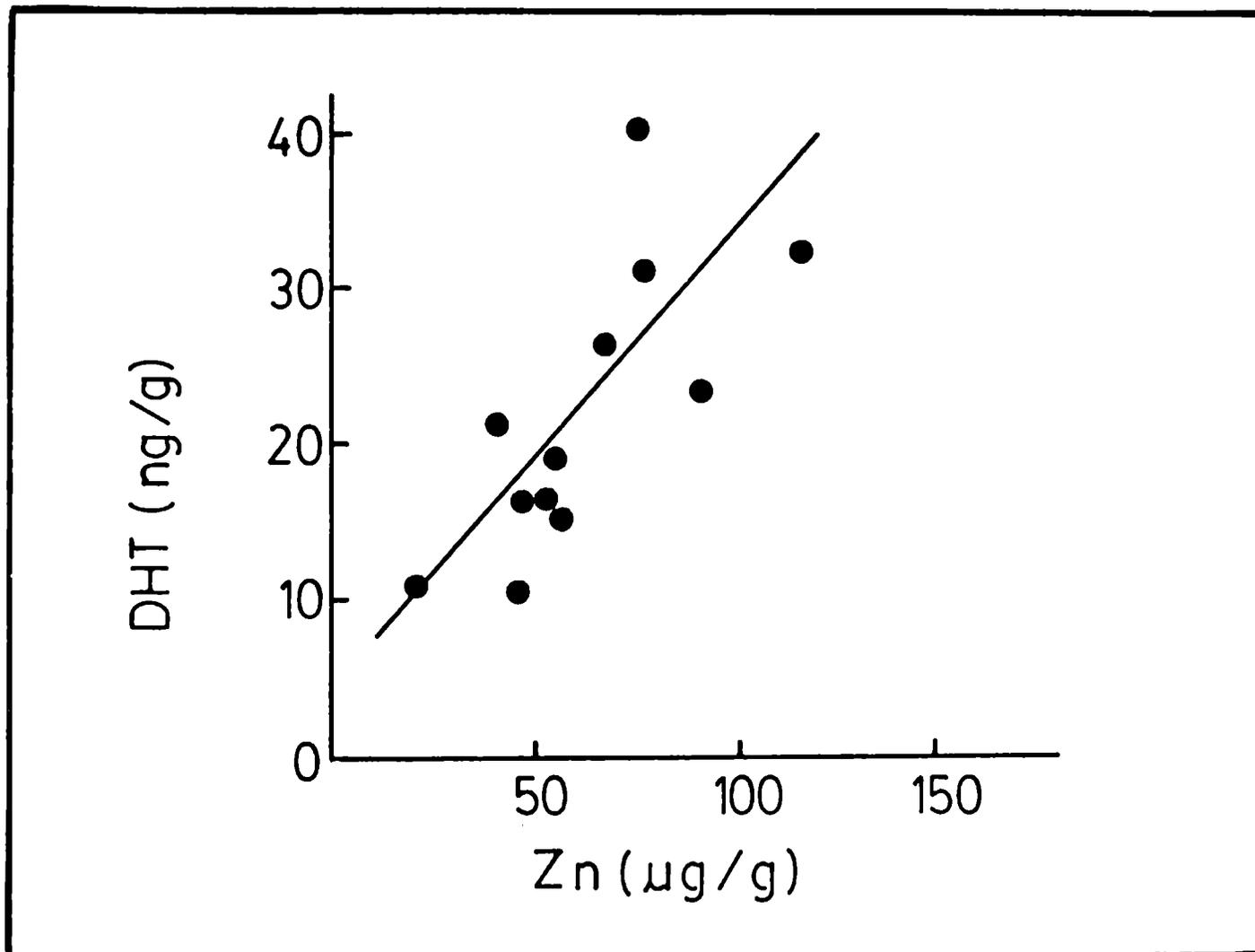


Figura 11.

Relación entre las concentraciones de DHT y Zn en tejido testicular humano de pacientes con carcinoma de próstata. Coeficiente de correlación $r = 0.78$ ($p < 0.01$).

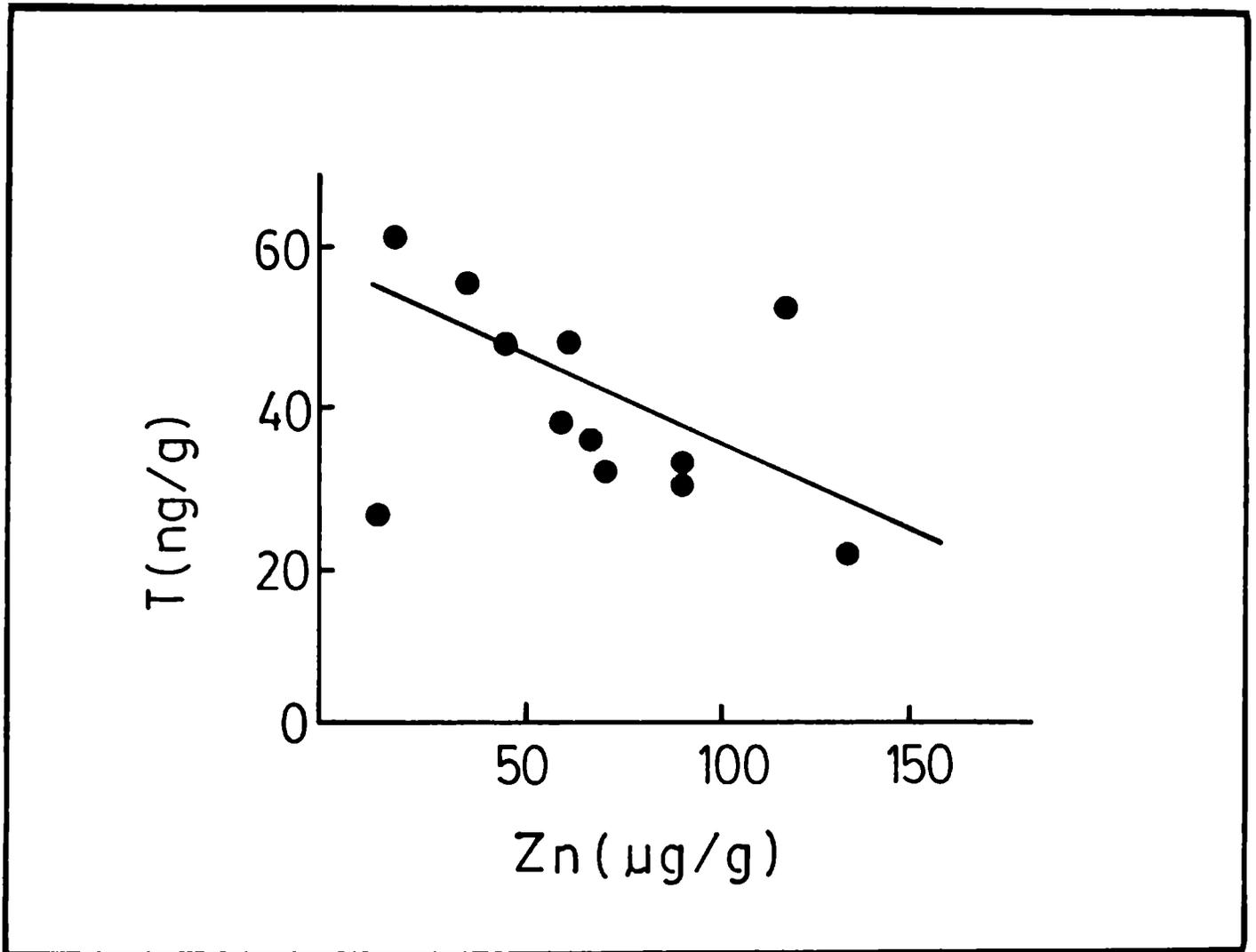


Figura 12.

Relación entre las concentraciones de T y Zn en tejido epididimario en pacientes con carcinoma de próstata. Coeficiente de correlación $r = 0,65$ ($p < 0.05$).

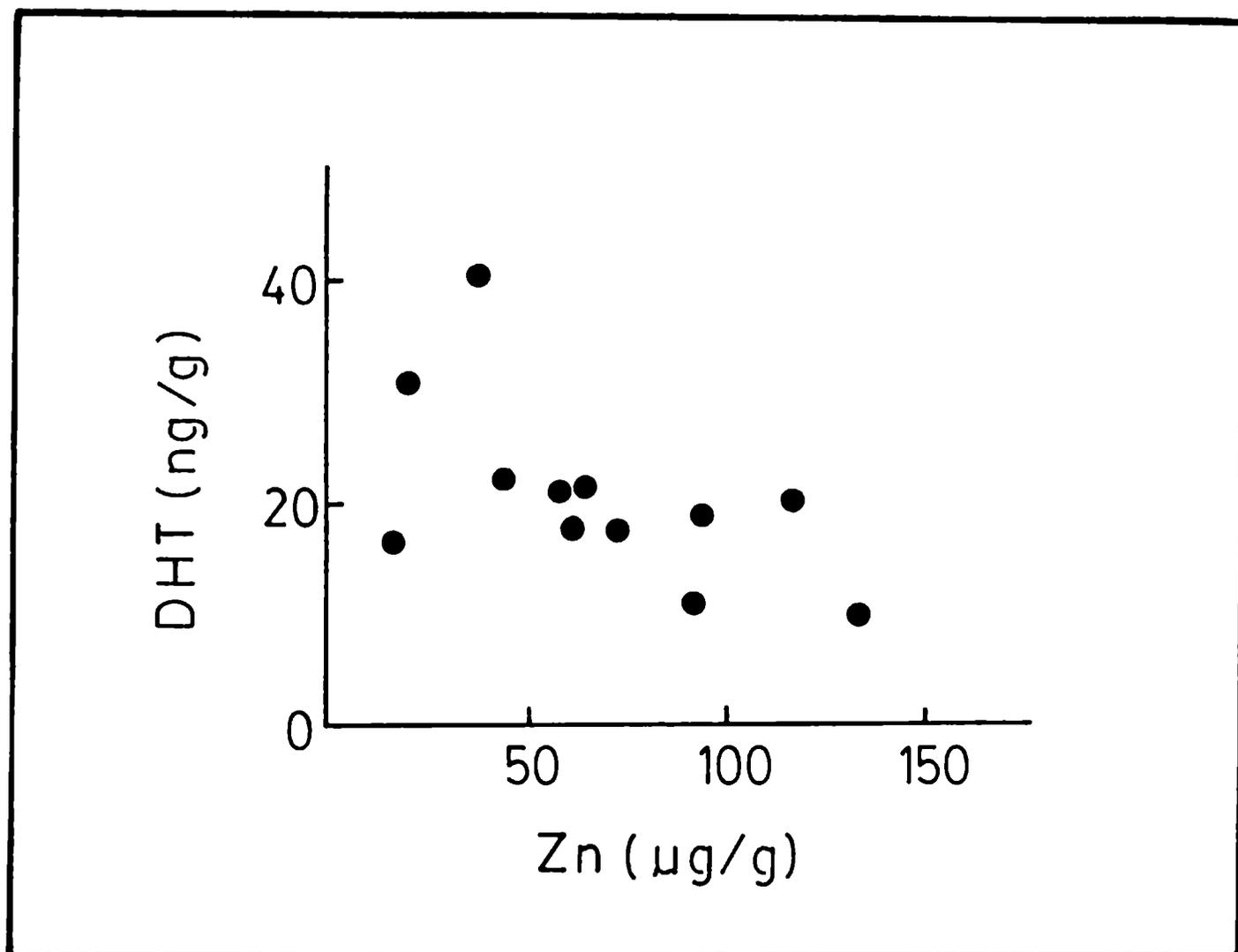


Figura 13.

Relación entre las concentraciones de DHT y Zn en tejido epididimario de pacientes con carcinoma de próstata. Coeficiente de correlación $r = 0,37$ (NS).

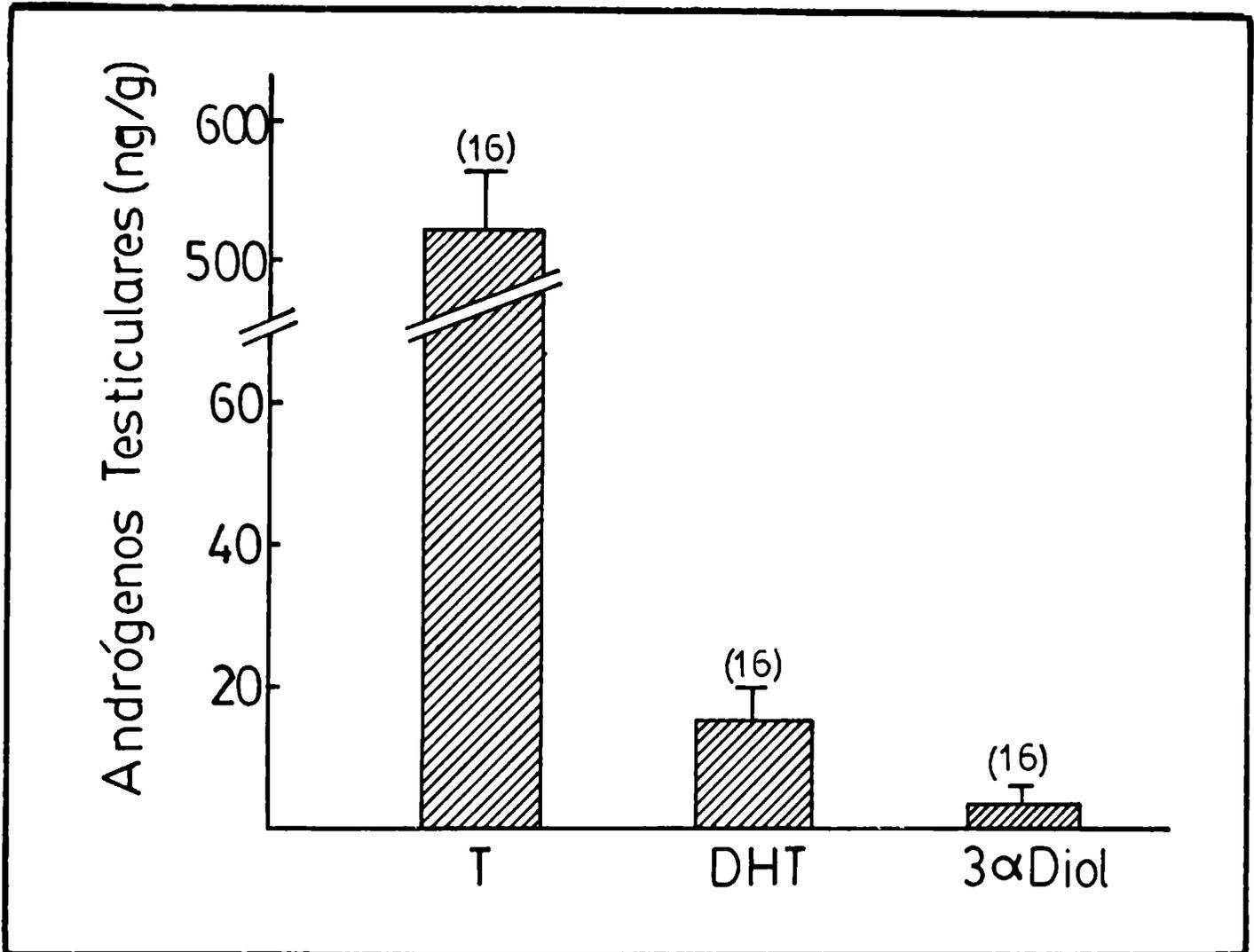


Figura 14.

Concentraciones intratesticulares de T, DHT y 3 α -Diol determinados por RIE en pacientes con carcinoma de próstata.

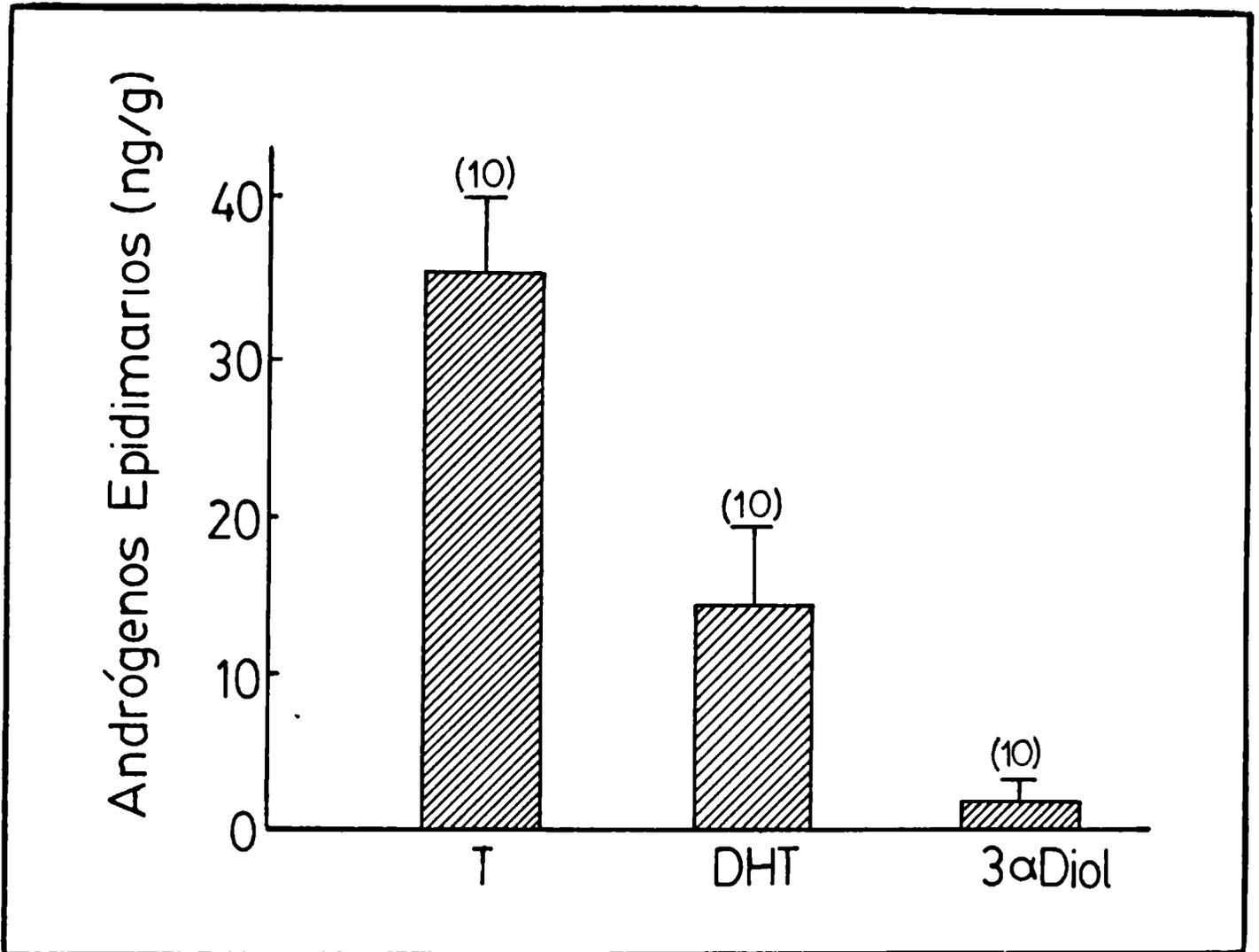


Figura 15.

Concentraciones de T, DHT y 3 α -Diol determinados por RIE en cabeza de epidídimo de pacientes con carcinoma de próstata.

los siguientes; testículo: $2,45 \pm 0,44$ ng/g; epidídimo: $2,22 \pm 0,64$ ng/g de tejido.

EFEECTO DE LA HIPOPROLACTINEMIA SOBRE EL EJE HIPOFISO-GONADAL.

En los últimos años se ha demostrado que la PRL participa activamente en el control de la función gonadal masculina. En el hombre, la hiperprolactinemia se asocia con importantes alteraciones en la función reproductiva, normalizándose esta función luego de disminuir los niveles elevados de PRL mediante la administración de un agonista dopaminérgico (Perryman y col., 1981, Koenig y col., 1977). Entre los neurofármacos existentes, la bromocriptina ha sido el más extensamente utilizado (Fossati y col., 1976). Esta droga tiene la capacidad de normalizar los trastornos sexuales referidos y dicho efecto ha sido atribuido en parte al descenso en los niveles circulantes de PRL.

Aplicando la metodología desarrollada anteriormente, se estudiaron los efectos de la administración de bromocriptina durante un breve período de tiempo en pacientes portadores de un carcinoma de próstata, sobre la distribución de distintas hormonas periféricas e intratesticulares.

NIVELES DE LH Y PRL EN SUERO.

Se seleccionó un grupo de pacientes con carcinoma de próstata en estadios C y D, los cuales recibieron durante 7 días bromocriptina (Parlodel, 2,5 mg, 3 veces por día, por vía oral). En cada paciente se realizaron dos extracciones de sangre de la vena antecubital; basal y luego de 7 días de tratamiento y en todos los casos las muestras fueron analizadas en forma simultánea por RIE. Los niveles de PRL obtenidos para cada paciente están representados en la Figura 16. Como puede observarse, en condiciones basales, únicamente 3 de los 12 pacientes (25%) mostraron niveles de PRL levemente superiores al rango normal (8-28 ng/ml), mientras que el valor promedio para la totalidad de los pacientes resultó ser (Media \pm ES) $23,75 \pm 2,5$ ng/ml.

Luego del tratamiento con bromocriptina durante 7 días se observó una marcada disminución (73%) en los niveles de PRL, resultando el valor promedio en los 12 pacientes ($\bar{X} \pm$ ES) $6,41 \pm 1,0$ ng/ml.

En el mismo grupo de pacientes, los niveles de LH pre y post tratamiento ($8,33 \pm 1,5$ y $8,91 \pm 2,1$ mUI/ml respectivamente) permanecieron en el rango de la normalidad (5-18 mUI/ml) (Figura 16).

NIVELES DE TESTOSTERONA, Δ_4 -ADIONA Y 3α -DIOL EN SUERO.

Se evaluaron los niveles séricos de testosterona,

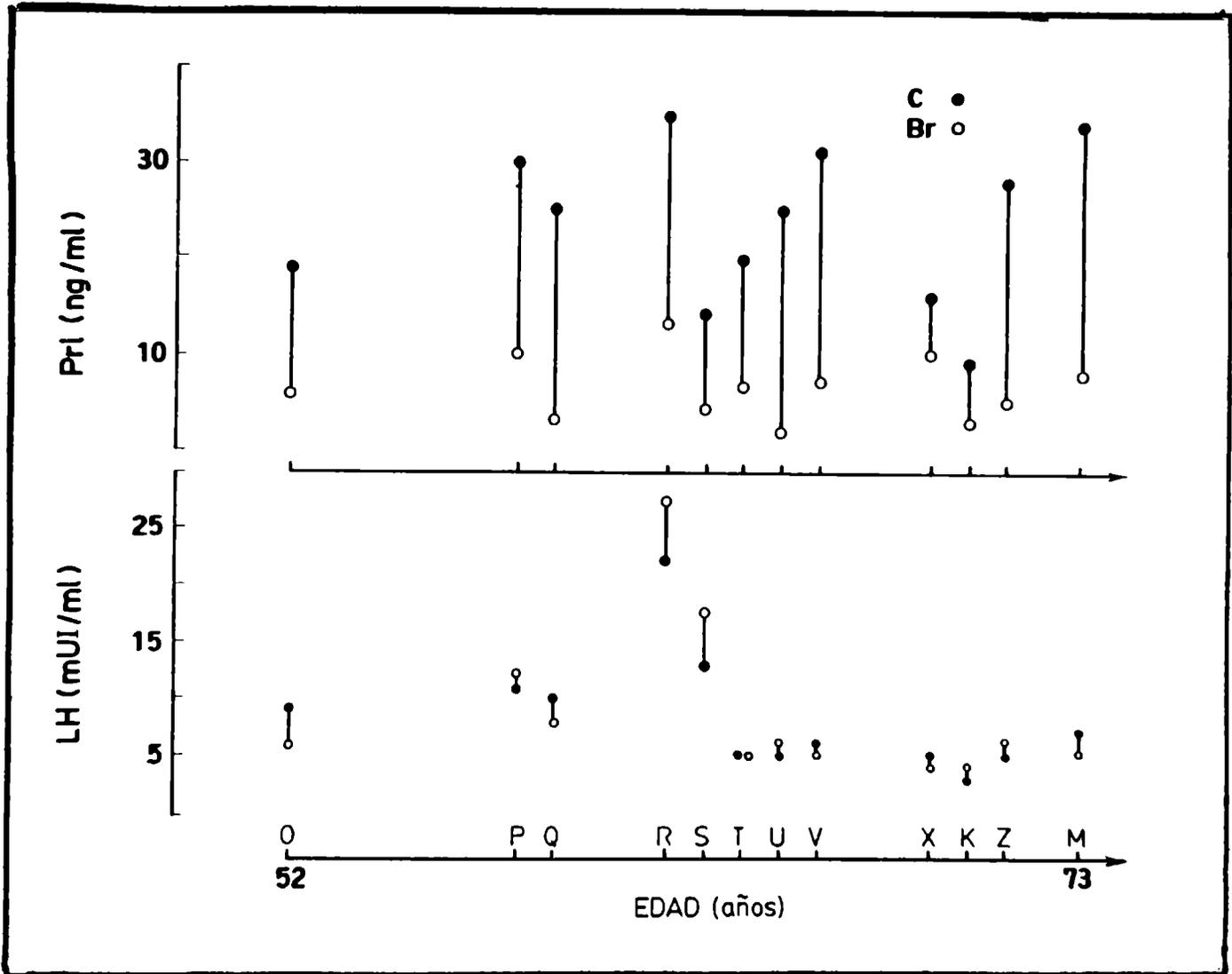


Figura 16.

Niveles individuales de PRL y LH séricos determinados por RIE en 12 pacientes con carcinoma de próstata en condiciones basales (c) ● y luego de 7 días de tratamiento con Br○(2,5 mg, 3 veces por día) .

3 α -Diol y Δ_4 -Adiona basales y post tratamiento con bromocriptina en el mismo grupo de pacientes que se describió anteriormente. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente por el test de Student apareado, demostrándose una disminución significativa ($p < 0.06$) en la testosterona circulante como consecuencia del tratamiento con el agonista dopaminérgico (Figura 17). Los niveles de Δ_4 -Adiona y 3 α -Diol plasmáticos no mostraron cambios significativos luego del tratamiento. En la Figura 18 se ilustran las modificaciones observadas en los tres andrógenos para cada paciente en particular, en función de la edad de los mismos. Los niveles basales de Δ_4 -Adiona resultaron en el rango normal (63 a 237 ng/100 ml) y como puede observarse, con la excepción de un solo paciente (Z), la bromocriptina no modificó sustancialmente este andrógeno. Los niveles basales de testosterona en todos los casos estudiados estuvieron dentro del rango normal (300 a 730 ng/100 ml). Luego del tratamiento, 5 de 12 pacientes (P, Q, T, U y K) evidenciaron un franco descenso en los niveles de testosterona en la periferia, mientras que en los 7 restantes no hubo modificaciones. En lo concerniente al 3 α -Diol circulante, tampoco se observaron cambios entre sus niveles basales y durante la hipoprolactinemia, con la excepción de 2 pacientes (P y T), que mostraron un moderado aumento en relación al límite superior normal (rango normal 50 a 200 pg/ml).

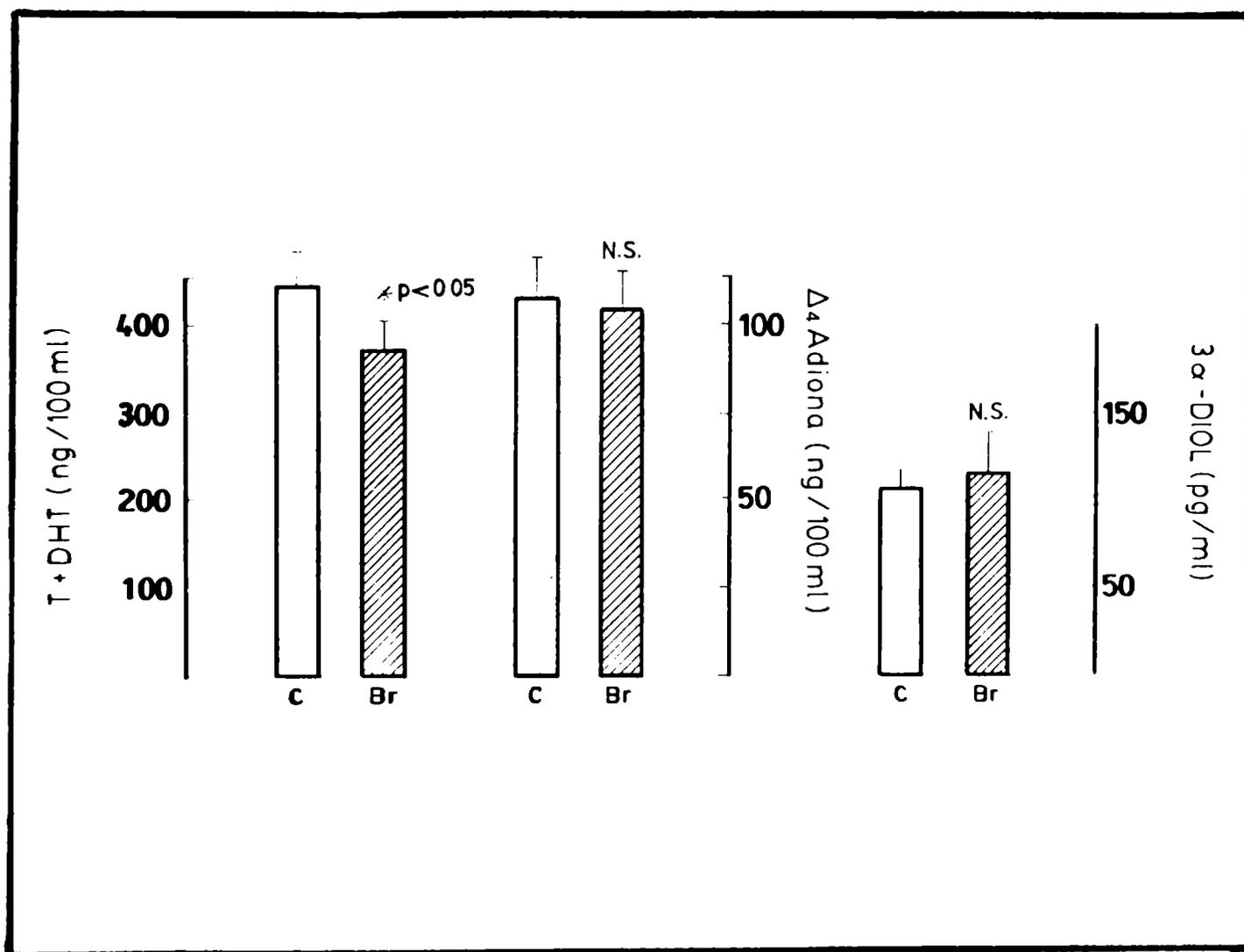


Figura 17

Niveles séricos de T + DHT, Δ 4-Adiona y 3 α -Diol en suero de pacientes con carcinoma de próstata en condiciones basales (c) y luego de 7 días de tratamiento (Br) como se indicó en la Figura 16. Cada barra representa el valor medio \pm el error estandar (n = 12).

* Datos significativamente diferentes del control (p < 0.05), test de Student apareado. NS: no significativo.

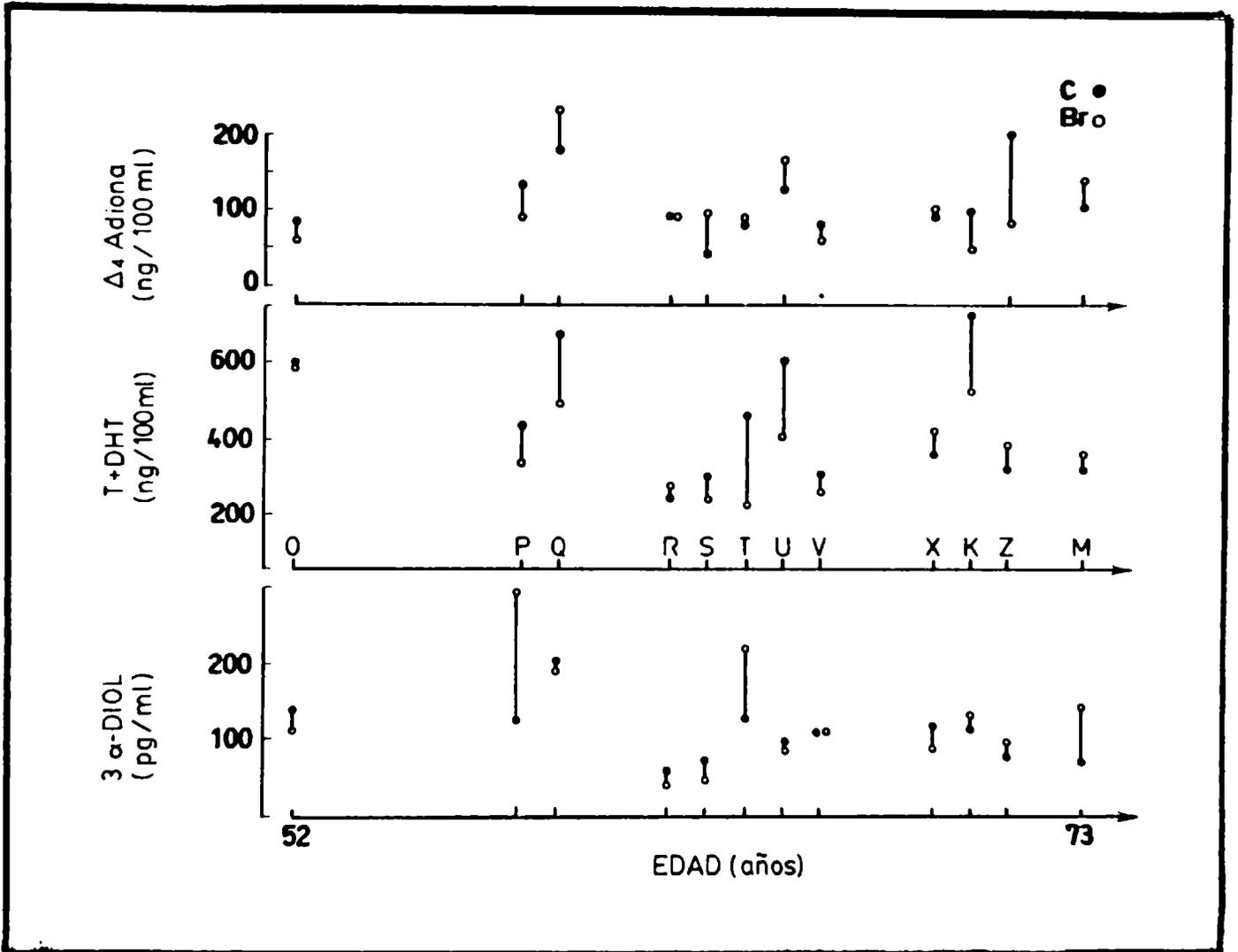


Figura 18.

Niveles séricos individuales de Δ_4 -Adiona, T + DHT y 3 α -Diol en 12 pacientes con carcinoma de próstata en condiciones basales (c) y luego del tratamiento especificado en la Figura 16 (Br).

CONCENTRACIONES INTRATESTICULARES DE TESTOSTERONA, DHT Y

3 α -DIOL.

En muestras de tejido obtenidas antes y al finalizar el período de tratamiento con bromocriptina, se determinó en el mismo grupo de pacientes anteriormente mencionados, las concentraciones intratesticulares de testosterona, DHT y 3 α -Diol por RIE específicos tal como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Luego de analizar los datos mediante el test de student apareado, pudo observarse una elevación significativa en la testosterona (32%, $p < 0,01$), DHT (35%, $p < 0.001$) y andrógenos totales (27%, $p < 0,02$). El aumento observado en el 3 α -Diol (11%) no fué significativo (Figuras 19 y 20).

Al analizar cada caso individualmente, es interesante remarcar la homogeneidad en la respuesta fundamentalmente para el principal andrógeno, la testosterona, que luego de la inducción de la hipoprolactinemia por bromocriptina se elevó en 11 de los 12 casos analizados (Figura 21). Como puede observarse en dicha figura, los cambios en la DHT fueron muy semejantes a los experimentados por la testosterona. Sólo en 2 casos (P y S), se observó un pequeño descenso, y uno de ellos fué precisamente el único paciente en que la testosterona había disminuído (Figura 21).

La figura 22 muestra el perfil de cambios correspon-

dientes a las concentraciones de 3α -Diol testicular, donde 8 de 12 pacientes incrementaron las mismas luego de la administración de bromocriptina. Puede observarse además que aumentos marcados en 2 de los pacientes (P y T) se correlacionaron con incrementos en este mismo andrógeno reducido, en sus niveles plasmáticos (Figuras 18 y 22).

CONCENTRACIONES DE TESTOSTERONA, DHT Y 3α -DIOL EN EL EPIDIDIMO.

En un número reducido de pacientes se pudo estudiar en forma conjunta con las determinaciones en testículo, la influencia de la hipoprolactinemia sobre las concentraciones de andrógenos en el tejido epididimario. La Figura 23 refleja la variación detectada para los diferentes andrógenos. La testosterona aumentó en el 75% de los pacientes, la DHT únicamente en el 25% y el 3α -Diol en el 100% de los mismos. Los aumentos en los valores absolutos de las medias fueron: testosterona 30% ($p < 0.01$) DHT 15% y Diol 20% ($p < 0.05$).

CONCENTRACIONES DE CINC EN TESTICULO Y EPIDIDIMO.

El tratamiento con bromocriptina durante 7 días no modificó los niveles de cinc en el tejido testicular (Figura 24) ni epididimario en ninguno de los pacientes estudiados. Los niveles encontrados en el testículo antes y después del tratamiento fueron: $80,7 \pm 8,07$ y $83,7 \pm 4,91 \mu\text{g/g}$.

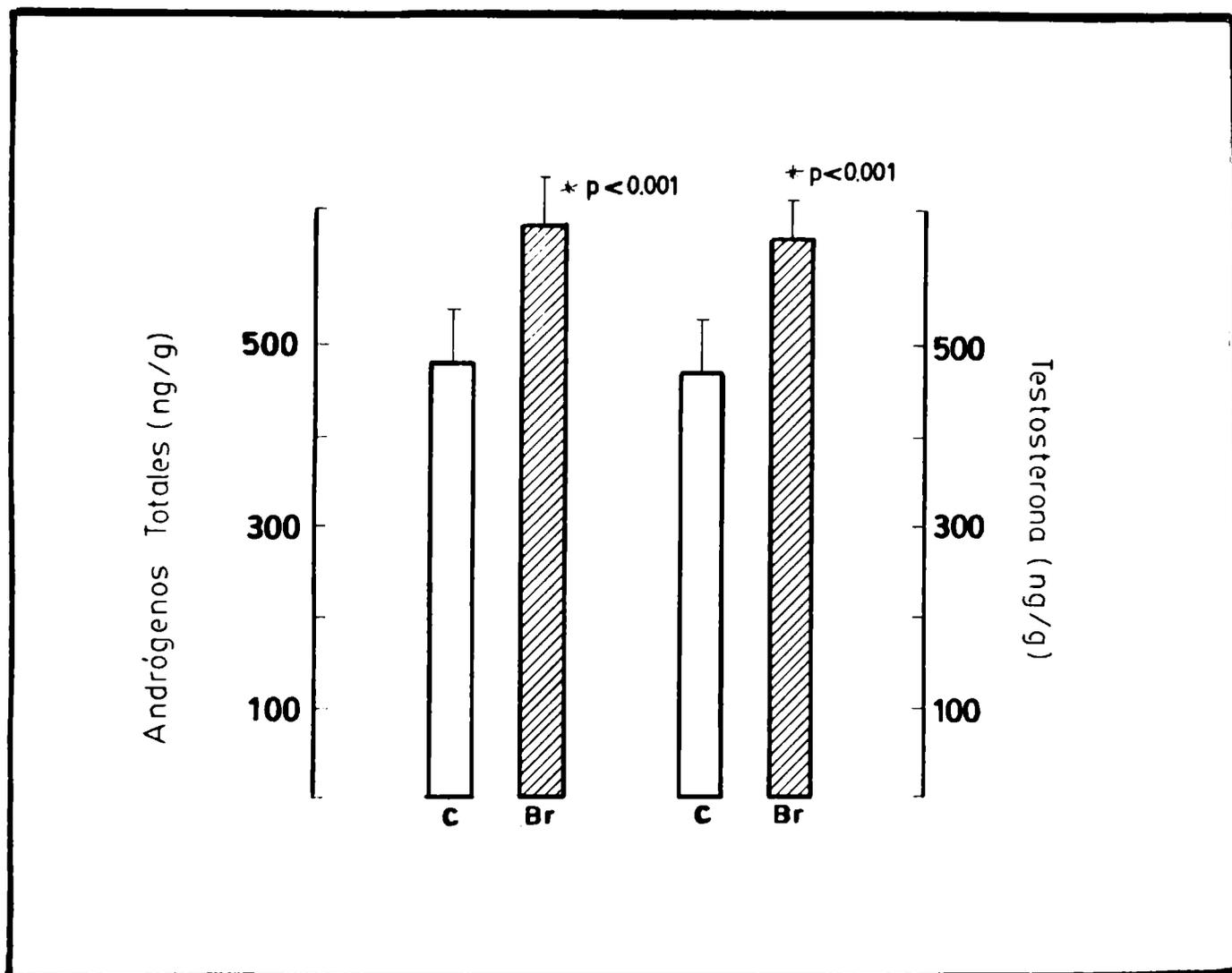


Figura 19.

Concentraciones intratesticulares de T y andrógenos totales en pacientes con carcinoma de próstata en condiciones basales (c) y luego de 7 días de tratamiento como se indicó en la Figura 16 (Br). Los andrógenos fueron determinados por RIE previa extracción, purificación y aislamiento en microcolumnas de celita. Cada barra representa el valor medio \pm error estandar (n = 12).

* Datos significativamente diferentes del control ($p < 0.001$), test de Student apareado.

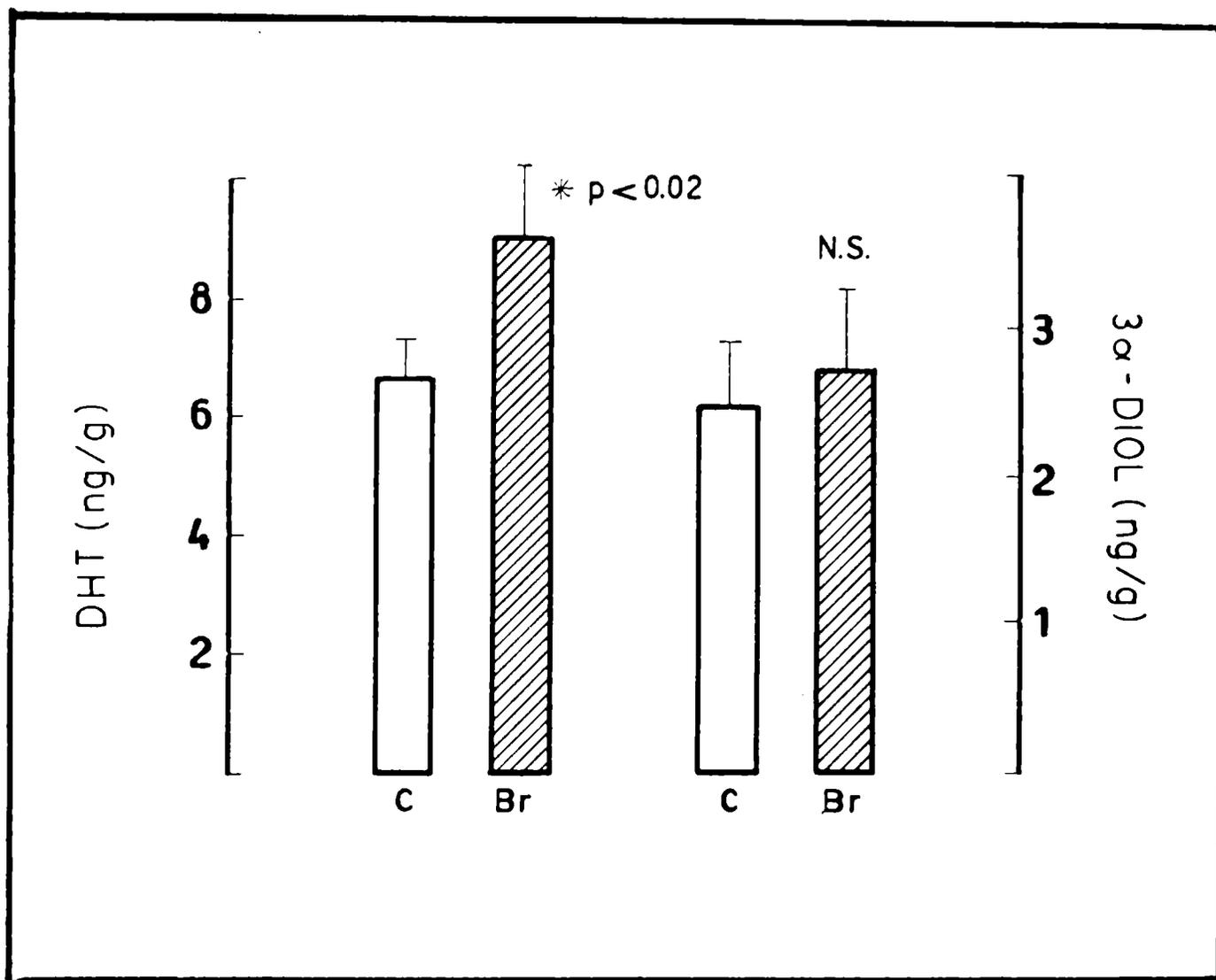


Figura 20.

Concentraciones intratesticulares de DHT y 3 α -Diol en pacientes con carcinoma de próstata en condiciones basales (c) y luego de 7 días de tratamiento como se indicó en la Figura 16 (Br). Los andrógenos fueron determinados por RIE previa extracción, purificación y aislamiento en microcolumnas de celita. Cada barra representa el valor medio \pm error estándar (n = 12). * Datos significativamente diferentes del control (p < 0.02), test de Student apareado, NS: no significativo .

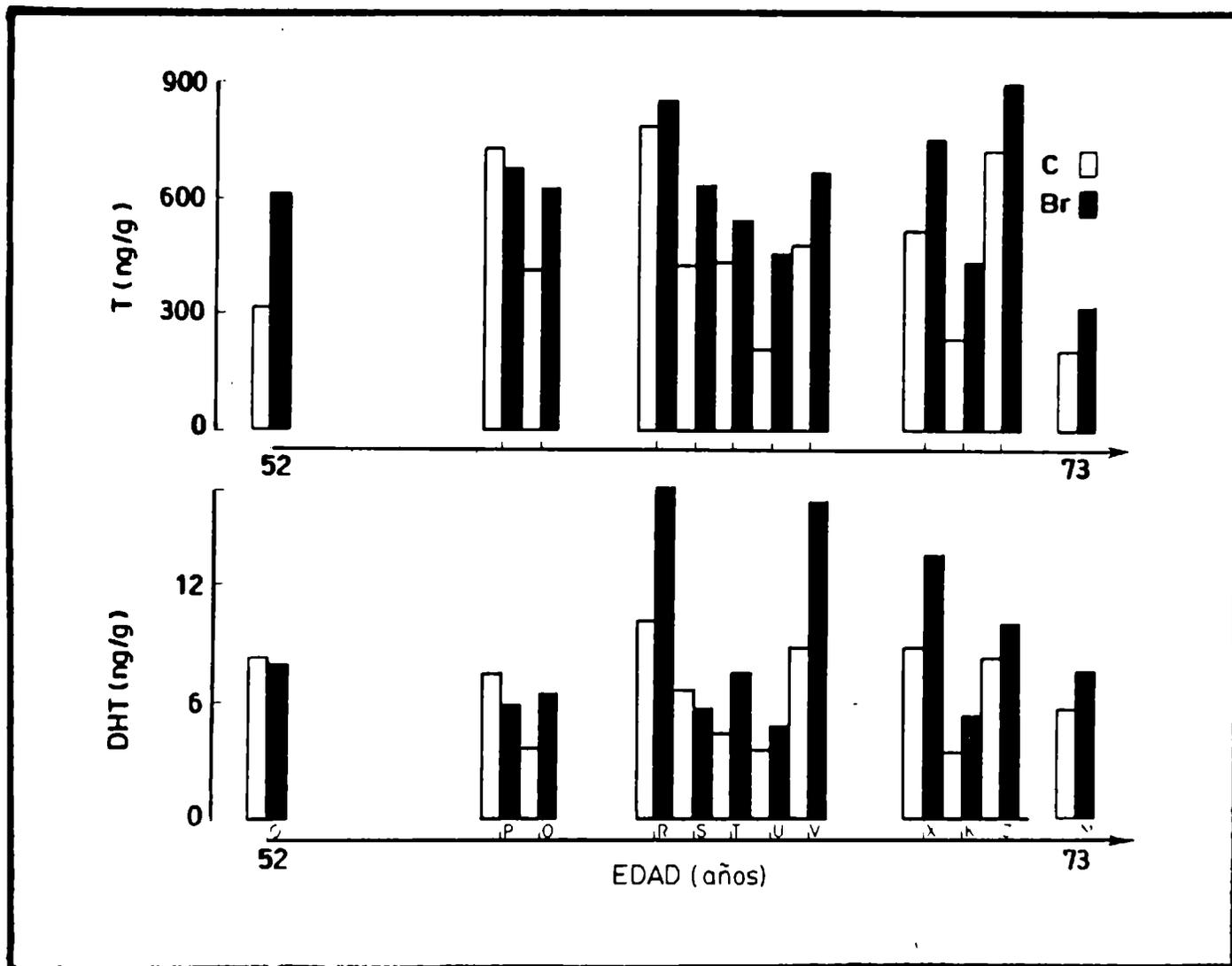


Figura 21.

Concentraciones intratesticulares de T y DHT en pacientes con carcinoma de próstata en condiciones basales (c) y luego de 7 días de tratamiento como se indicó en la Figura 16 (Br).

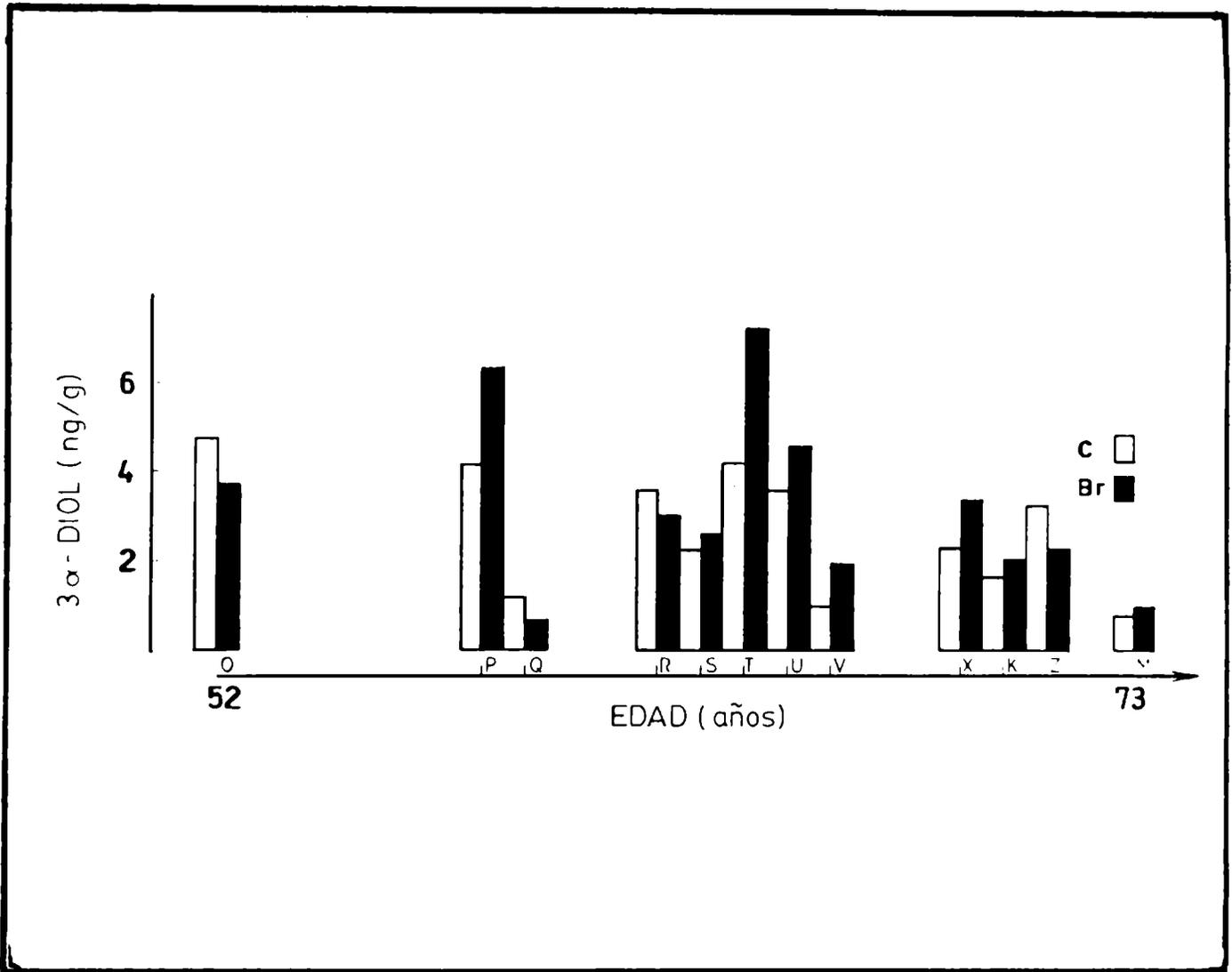


Figura 22.

Concentraciones intratesticulares de 3 α-Diol en pacientes con carcinoma de próstata en condiciones basales (c) y luego de 7 días de tratamiento como se indicó en la Figura 16 (Br).

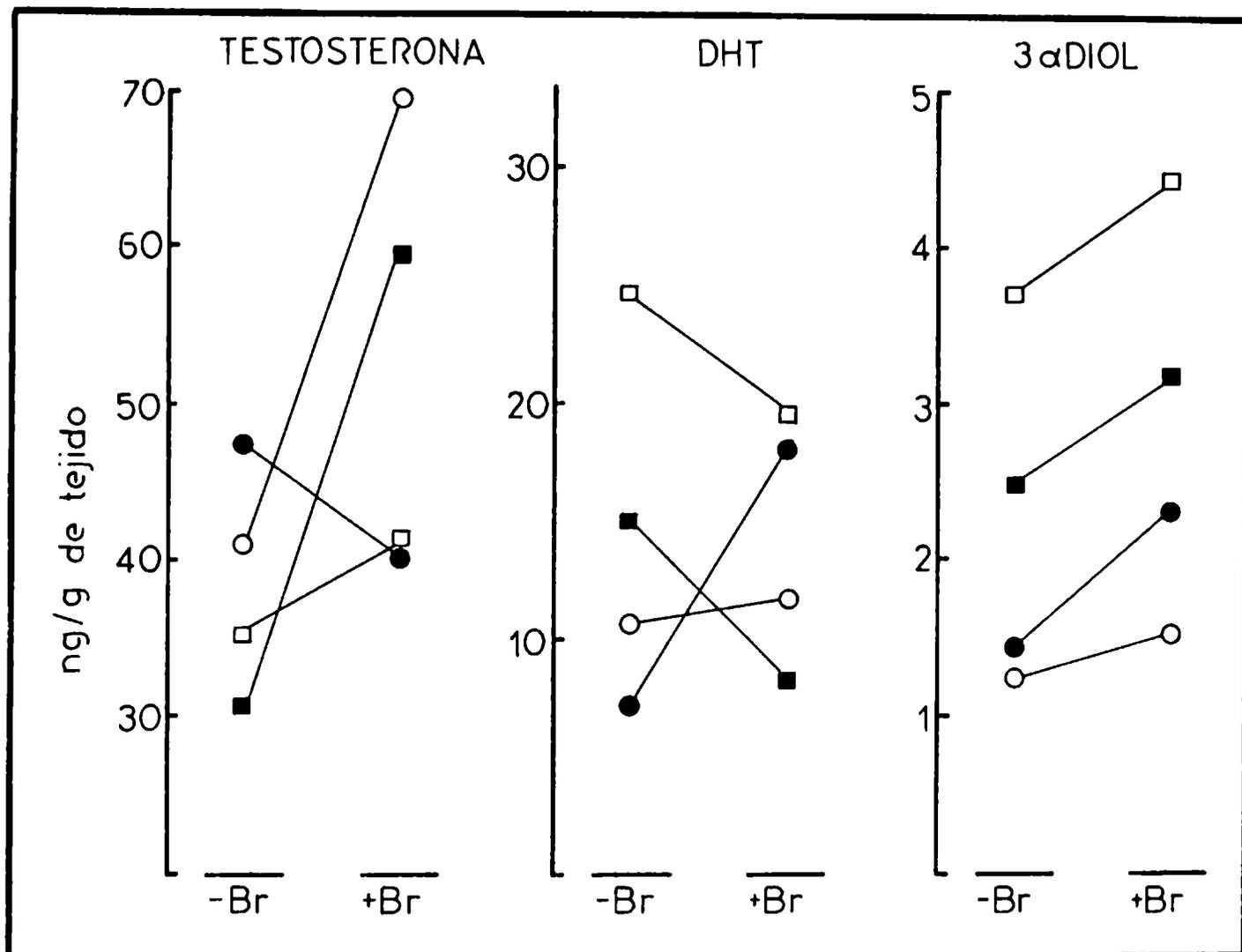


Figura 23.

Variaciones observadas en las concentraciones de T, DHT y 3 α -Diol en tejido epididimario de 4 pacientes en condiciones basales y luego del tratamiento especificado en la Figura 16 (Br).

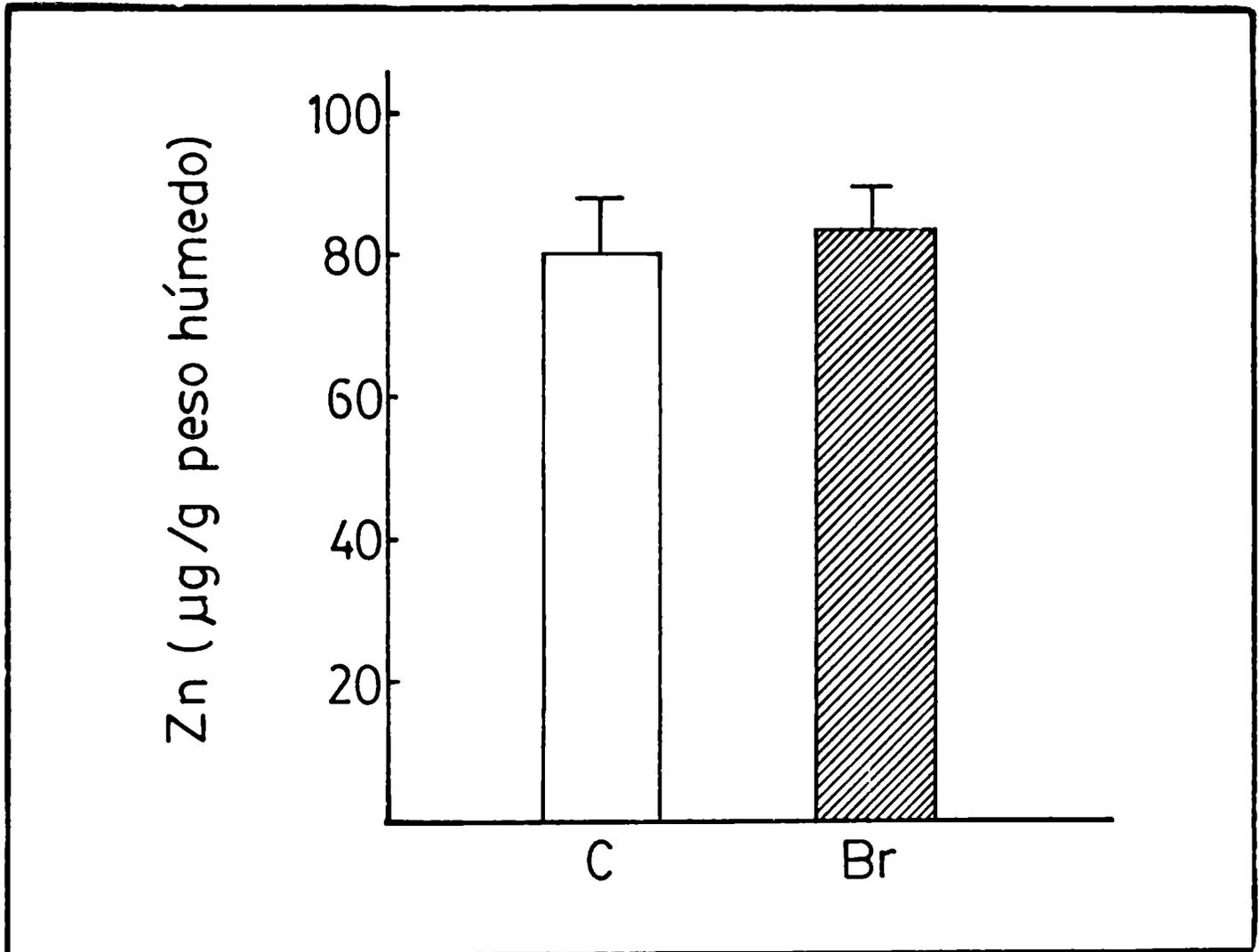


Figura 24.

Concentraciones intratesticulares de Zn determinadas por espectroscopía de absorción atómica previa destrucción de la materia orgánica, en pacientes con carcinoma de próstata, en condiciones basales (c) y luego del tratamiento especificado en la Figura 16 (Br). Cada barra representa el valor medio \pm error estandar n = 12).

MORFOLOGIA DEL TESTICULO DURANTE LA HIPOPROLACTINEMIA.

Mediante microscopía óptica se realizó el análisis histológico de dos biopsias testiculares para cada uno de los pacientes, tomadas al principio y al final de los 7 días de tratamiento con bromocriptina. Las biopsias pre-tratamiento en el grupo de pacientes estudiados mostraron un aspecto heterogéneo, con histología normal en algunos de los casos mientras que en otros se hallaba notablemente alterada.

Las células de Leydig maduras se observaron formando pequeños racimos, vecinos a capilares sanguíneos, mostrando citoplasma eosinófilo y en algunos casos con presencia de vacuolas.

Teniendo en cuenta el aspecto del intersticio los pacientes estudiados se pudieron ubicar en tres grupos diferentes. El primero, integrado por 4 de los 12 pacientes mostró un intersticio con escaso número de células de Leydig y la concentración de testosterona en este grupo fué ($\bar{X} \pm ES$) 325 ± 112 ng/g de tejido. En un segundo grupo con aspecto del intersticio considerado normal pudo ubicarse el mayor número de los pacientes y en este caso la testosterona testicular fué ($n= 7, \bar{X} \pm ES$) $507,5 \pm 158$ ng/g de tejido. La concentración de testosterona en el único paciente que presentabaseudohiperplasia nodular fué la más alta medida en condiciones basales: 793 ng/g de tejido.

Se comprobó entonces una correlación positiva entre la testosterona tisular y la cantidad relativa de células de Leydig presentes (Figuras 25, 26 y 27).

Por otra parte, se observó una amplia gama de variaciones en el aspecto de los túbulos seminíferos. Pudieron diferenciarse en algunas biopsias espermatogénesis completas mientras que en otros casos se observaron diversos grados de involución del órgano. Así estuvieron presentes hipoespermatogénesis de variable intensidad, espermatogénesis detenida, síndrome de Sertoli solo y pequeños focos de hialinosis tubular. Los niveles de testosterona intratesticulares no se correlacionaron con la histología de los túbulos seminíferos, observándose valores normales de testosterona testicular en pacientes con marcado daño tubular (Figura 26).

Se compararon las biopsias pre y post tratamiento en cada uno de los pacientes tratados con bromocriptina. No se detectaron cambios en el aspecto de los túbulos seminíferos ni en la morfología o número relativo de las células de Leydig, pese al claro incremento observado en la concentración intratesticular luego de los 7 días de administración de la droga.



Figura 25.

Microfotografía de un corte de testículo de un paciente con carcinoma de próstata y niveles bajos de testosterona intratesticular.

Se observa una disminución numérica de las células germinales con detención madurativa. En el área intersticial ilustrada no se visualizan células de Leydig maduras, distinguiéndose sólo células mesenquimáticas (H-E x 370).



Figura 26.

Microfotografía de un corte de testículo de un paciente con carcinoma de próstata y niveles de testosterona muy cercanos al valor medio de la población total.

Se observa aplasia germinativa ("Sertoli solo") y un engrosamiento de la pared de algunos túbulos. En el área intersticial se distinguen dos grupos pequeños de células de Leydig maduras con características normales (H-E.x 370).



Figura 27.

Microfotografía de un corte de testículo de un paciente con carcinoma de próstata con niveles elevados de T testicular. Se observa espermatogénesis completa y en el intersticio se visualiza un área de hiperplasia de células de Leydig maduras (H-E.x 370).

DISCUSSION I

Los niveles séricos de andrógenos han sido habitualmente utilizados en el hombre para evaluar la función endócrina testicular. Sin embargo dichos niveles periféricos muchas veces no representan exactamente la actividad esteroidogénica del tejido intersticial. Factores tales como metabolismo periférico, tasa de depuración y síntesis extragonadal están también involucrados en la regulación de los niveles séricos de andrógenos.

La concentración de andrógenos en el tejido puede reflejar más acertadamente la producción de andrógenos testiculares.

La limitación fundamental en este tipo de determinaciones es la posibilidad de obtener valores para un grupo control normal, sin indicación de biopsia testicular. Por ese motivo los resultados presentados provienen exclusivamente de una población cuya indicación terapéutica principal incluía la orquidectomía y que en su mayoría era portadora de carcinoma de próstata (65 años de edad promedio). Al respecto debe remarcarse que la patología prostática sin tratamiento previo no se acompaña de cambios esenciales en la función testicular (Bartsh y col., 1977), aunque durante el envejecimiento se ha descrito una considerable disminución en el número de células de Leydig. Luego de alcanzar un máximo de 700×10^6 células intersticiales a los 20 años, dichas

células disminuyen con un ritmo aproximado de 8×10^6 células por gonada por cada década de vida (Kaler y col., 1978).

Algunos autores (Hammond y col., 1978) han indicado ciertas recomendaciones en la determinación de las concentraciones de esteroides tisulares, referentes a la recolección y conservación del material con el fin de evitar una actividad metabólica "in vitro". En nuestras condiciones de trabajo el enfriamiento a $0-4^{\circ}\text{C}$ y la posterior homogeneización en acetona fue suficiente para prevenir dichos cambios y únicamente observamos una pequeña modificación relativa en los niveles de testosterona y DHT cuando el tejido fue homogeneizado en buffer, aún a bajas temperaturas, sugiriendo cierta actividad de la enzima 5α -reductasa. Sin embargo, Hammond y col. (1978), detectaron aumentos importantes en la concentración de testosterona en muestras gonadales intactas mantenidas a temperatura ambiente durante 2 horas, sin cambios en la DHT. Estos últimos resultados sugieren por un lado actividad biosintética de testosterona y por otro baja actividad enzimática de la enzima 5α -reductasa en las condiciones "in vitro" mencionadas. Esta discrepancia, si es que verdaderamente puede considerarse como tal, podría ser atribuida a cambios inducidos durante la homogeneización, como por ejemplo la pérdida de la compartimentalización original de la enzima.

Cuando se utiliza este tipo de metodología resulta indispensable una adecuada extracción y purificación de las muestras para poder obtener datos que sean reproducibles. A partir de los resultados presentados se evidencia claramente que la combinación de particiones con solventes y cromatografía en microcolumnas de celita, constituye un procedimiento satisfactorio, que permite obtener buenas recuperaciones y blancos no detectables. Finalmente el paralelismo entre curvas estandars y muestras desconocidas demostró la validez del ensayo utilizado.

El "pool" de esteroides de cada tejido es el resultado del balance entre la velocidad de entrada y de salida al mismo; la primera involucra captación de la hormona por el tejido y síntesis local, y la segunda comprende metabolización de la misma y liberación a la circulación.

El valor medio obtenido para testosterona testicular (501 ± 41 ng/g), coincide con los niveles presentados por Ruokonen y col., (1972), Hammond y col. (1979) y Purvis y col. (1978), pese a que los dos primeros autores utilizaron metodologías tales como espectrometría de masa asociada a un cromatógrafo de gases y radiocompetición proteica respectivamente.

Dado que el testículo es un órgano complejo con dos

compartimientos anatómica y funcionalmente diferentes es lógico suponer que los andrógenos no estén uniformemente distribuidos. Por lo tanto, es razonable que la concentración elevada de testosterona sea fundamentalmente reflejo del contenido del tejido intersticial, donde es sintetizada.

El metabolito 5 α -reducido de la testosterona, la DHT, fué detectada en el tejido testicular en concentraciones variables en los distintos pacientes. No obstante, su valor promedio resultó casi 40 veces más bajo que el de testosterona. Estos datos concuerdan con los presentados por Leionen y col. (1980) y son algo más elevados que los informados por Purvis y col. (1978). Recientemente, en pacientes con pubertad precoz se han descrito niveles considerablemente más altos del andrógeno 5 α -reducido (Rivarola y col., 1983).

Resulta más difícil especular sobre la posible distribución compartamental de la DHT. En la rata, la localización de la 5 α -reductasa testicular es preferencialmente detectada en el túbulo o en el intersticio, dependiendo del estadio puberal del animal (Dorrington y col., 1975).

En el hombre, la 5 α -reductasa testicular ha sido escasamente estudiada, aunque hoy se acepta que su actividad es relativamente baja. Pese al limitado número de estudios realizados y a la imposibilidad de obtener muestras que puedan ser consideradas completamente normales, los resulta-

dos en la bibliografía también indican una cierta variación en la actividad de la enzima cuando se comparan pacientes con diferentes edades. Así, mientras no se ha logrado detectar actividad de la misma en el testículo fetal, se observa un aumento en la gónada juvenil y de adultos, con cierta tendencia a disminuir durante la senectud (Kelch y col., 1971; Rivarola y col., 1973; Nayfeh y col., 1975).

En relación a su localización, algunas evidencias indicarían que la actividad se focaliza fundamentalmente en el sector tubular (Rivarola y col., 1973; Payne y col., 1973).

Por otra parte, los niveles de $3\ \alpha$ -Diol testicular detectados en nuestras condiciones experimentales, resultaron sensiblemente menores que los de DHT, aunque ellos no fueron despreciables. Al respecto debe señalarse que otros autores utilizando metodologías semejantes no han logrado detectar dicho andrógeno en el testículo humano (Leionen y col., 1980; Purvis y col., 1978).

En apoyo de estos resultados, debe señalarse que estudiando el metabolismo, algunos grupos de trabajo presentaron evidencias a favor de una pequeña formación de $3\ \alpha$ -Diol y $3\ \beta$ -Diol en ambos compartimientos del testículo (Rivarola y col., 1973; Payne y col., 1973).

Cuando se comparan los resultados obtenidos en el testículo y epidídimo de cada paciente, se evidencia claramente

que la concentración de testosterona en el tejido epididimario es aproximadamente un 10% de la hallada en la gonada correspondiente, mientras que las concentraciones de DHT y 3 α -Diol detectadas en ambos órganos son muy similares.

Ha sido descrito por varios autores que el epidídimo de rata y ratón puede formar testosterona a partir de distintos precursores (Hamilton y col., 1969; Hamilton, 1975).

En el caso particular del epidídimo humano, los bajos niveles de testosterona que encontramos se hallan en amplio acuerdo con los descritos por Leionen y col., (1980), quienes a la vez también detectaron bajos niveles de sus precursores inmediatos. Nuestros datos, junto a estas últimas observaciones, parecieran indicar que probablemente la mayor parte del andrógeno no se originaría "in situ" sino que podría llegar al epidídimo por vía sanguínea y más probablemente desde la gonada vía rete testis.

La mayor proporción de andrógenos reducidos en el epidídimo, donde la relación T/DHT + 3 α -Diol disminuye 18 veces en relación a la gonada, es precisamente una consecuencia de la importante actividad de la 5 α -reductasa y en menor medida de la 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa detectadas en dicho tejido (Gloyna y col., 1969; Sulkova y col., 1973; de Larminat y col., 1981). Cierta contribución al aumento del "pool" epididimario de andrógenos reducidos es probablemente la retención de dichas hormonas por el receptor de andróge

nos presente en el epidídimo cuya afinidad por DHT es mayor que por testosterona.

Los presentes resultados apoyan entonces, previas demostraciones relacionadas al papel de la DHT como intermediario importante en la acción de los andrógenos en el epidídimo humano.

Las concentraciones de andrógenos epididimarios corresponden fundamentalmente a segmentos proximales del órgano (cabeza), sin embargo, los datos podrían considerarse representativos del epidídimo total, ya que al analizar los niveles de andrógenos en sus distintos segmentos (cabeza, cuerpo y cola), no se detectaron diferencias entre los mismos.

Estas observaciones y otras previas (Purvis y col., 1978; Leionen y col., 1980), remarcan una importante diferencia con el testículo de la rata, donde la DHT disminuye gradualmente desde la porción proximal hacia la distal del túbulo en correlación con los niveles de ABP (Purvis y col., 1978). La presencia de esta proteína en el epidídimo humano, ha sido cuestionada por algunos grupos de trabajo (Purvis y col., 1978), mientras que otros han presentado algunas evidencias a favor de su existencia (Hsu y col., 1978) (Vigersky y col., 1976; Burke y col., 1977; y Lipschultz, y col., 1977). Las características de dicha proteína parecen ser muy similares a la GLAE y no se ha descrito aún si existe, como en la rata, un gradiente de la misma a lo largo

del epidídimo.

El presente estudio muestra además las concentraciones tisulares de cinc en testículo y epidídimo humano. Como ya se ha mencionado, este metal se localiza preferencialmente en el tracto reproductivo de los mamíferos y sus niveles se relacionan estrechamente con la función sexual. En los vertebrados y especialmente en el hombre, el cinc se halla presente en la totalidad de los tejidos, oscilando su concentración entre 20 y 30 $\mu\text{g/gm}$ de peso húmedo (Vallee y col., 1949).

Los datos obtenidos en testículo y epidídimo, demuestran que las concentraciones de cinc en ambos tejidos son algo más de 2 veces superiores a dichos valores, semejantes al contenido hepático, óseo y muscular e inferiores a los más ricos del organismo como la próstata y los ganglios linfáticos (Vallee y col., 1949).

Al comparar las concentraciones de cinc en estos tejidos del tracto reproductivo humano y de la rata, se evidencia que mientras en los primeros el contenido de cinc en testículo y epidídimo es muy semejante, en la rata los niveles epididimarios del metal duplican prácticamente el valor testicular, pudiendo atribuirse la diferencia a una característica propia de cada especie (Parizek y col., 1956).

Como se mencionó anteriormente, el sector tubular y

los espermatozoides podrían constituir un importante aporte de cinc a dichos órganos, modificándose eventualmente durante la senectud cuando es frecuente encontrar alteraciones de la espermatogénesis.

El análisis conjunto de las concentraciones de andrógenos y cinc en cada tejido estudiado mostró una alta correlación positiva entre la testosterona, DHT y los niveles de cinc testicular. Aunque las evidencias fueron menos concluyentes, el caso inverso se presentó en el epidídimo, donde se observó una correlación negativa entre la testosterona y el cinc.

Posibles explicaciones para la aparente dependencia entre el "pool" tisular de andrógenos y el contenido de cinc, podrían ser, por un lado la influencia del metal sobre la actividad de ciertas enzimas involucradas precisamente en el metabolismo de los esteroides. Por otra parte, el cinc es capaz de estimular "in vitro" la unión de los andrógenos a sus receptores específicos (Douglas y col., 1984). Sin embargo, deberán realizarse estudios adicionales para lograr comprender el verdadero papel del cinc en la función sexual masculina.

Otro de los aspectos analizados en este trabajo fue la respuesta al tratamiento con estrógenos por períodos superiores a 2 meses, en términos de concentraciones tisulares

de andrógenos. De acuerdo a los resultados obtenidos se observó una clara inhibición en los niveles de testosterona y DHT tanto en testículo como en cada uno de los segmentos del epidídimo. Existen por lo menos 3 mecanismos propuestos para explicar dicho efecto: 1) una acción sobre la síntesis y secreción de gonadotrofinas hipofisarias (Sawing, 1978); 2) un efecto directo sobre enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides en el testículo y 3) una disminución en la capacidad de unión de LH a sus sitios receptores específicos en la gonada (Huhtaniemi, 1980).

Hammond y col., (1978) demostraron que la administración de estradiol durante 5 días, no modifica las concentraciones testiculares de esteroides y sí los niveles de los mismos en la vena espermática. Los presente resultados, en acuerdo con los de Purvis y col. (1978), indican que el tratamiento con estrógenos durante períodos de tiempo prolongados disminuye la concentración intratesticular de andrógenos. Como consecuencia de un menor aporte, también se observó una menor concentración de andrógenos en el tejido epididimario.

Pese a la importante diferencia observada en los andrógenos tisulares entre los pacientes tratados con estrógenos respecto a los no tratados, sólo pudimos detectar una pequeña disminución en los niveles promedio de cinc en ambos órganos. Sin embargo, debido al bajo número de pacientes estudiados

y a las diferencias individuales entre ellos, el efecto aunque estadísticamente no significativo, no se opone a la correlación encontrada entre los andrógenos y el cinc.

Otro aspecto interesante del presente estudio fueron las observaciones realizadas en pacientes con carcinoma de próstata en los que se indujo hipoprolactinemia por administración de bromocriptina. En dichos sujetos se evaluó la función hipófiso-gonadal en respuesta al descenso en la PRL circulante, mediante el dosaje de los niveles de hormonas periféricas y tisulares y el estudio de la morfología de la gonada.

Los niveles séricos promedio de PRL previos al tratamiento en este grupo de pacientes no fueron superiores al valor normal para la edad, sin embargo se pudo constatar que alrededor de un 25% de los mismos estaban levemente elevados. Estos resultados están de acuerdo con los demostrados previamente por Harper y col. (1976) y Bartsh y col. (1977).

Se observó una disminución importante póst-tratamiento en los niveles de PRL sérica en todos los casos estudiados. Este descenso se debe al efecto dopaminérgico de la bromocriptina, habiéndose demostrado previamente su efectividad tanto en pacientes normales como portadores de carcinoma de próstata (Jacobi y col., 1978; Martikainen y col., 1982).

Los niveles basales de LH no mostraron diferencias con los considerados normales para esa edad y no se modificaron durante la hipoprolactinemia, tal como describieron Jacobi y col. (1978). Demostramos también que una disminución en la PRL sérica durante un breve período de tiempo, ocasiona un descenso concomitante en la testosterona sérica total, sin cambios aparentes en los niveles de Δ_4 -Adiona y 3 α -Diol.

En la interpretación de estos resultados deben tenerse en cuenta algunas consideraciones. En primer lugar, la determinación de la testosterona periférica es en este caso la suma de testosterona + DHT circulantes, ya que las determinaciones en el suero se realizaron sin previa separación cromatográfica.

En el hombre, el principal andrógeno en la circulación, la testosterona, se sintetiza fundamentalmente en el testículo, mientras que la Δ_4 -Adiona se origina no sólo en la gonada sino que en parte es también secretada por la corteza suprarrenal (Gurpide y col., 1965). La DHT plasmática en el hombre proviene esencialmente de la conversión periférica de la testosterona (Saez, 1972); una pequeña fracción es secretada directamente por el testículo y alrededor de un 15% de la producida en sangre proviene de la Δ_4 -Adiona (Tremblay col., 1972). Este último andrógeno puede ser convertido a testoste-

rona reversiblemente por la enzima 17 α -hidroxiesteroide-deshidrogenasa. Además, se ha demostrado también una conversión reversible de DHT a 3 α y 3 β -Diol en el plasma periférico (Mahaudeau y col., 1971).

Existe cierta controversia en la literatura en relación al efecto del agonista dopaminérgico empleado en este estudio sobre los niveles circulantes de testosterona. Así, Jacobi y col. (1978) observaron un descenso, mientras otros autores como Nakagawa y col. (1982), describieron niveles más elevados de testosterona en individuos normales luego de la administración de bromocriptina (2.5 mg/día) durante 3 días. Sin embargo, Martikainen y col. (1982) no detectaron cambios en los distintos esteroides luego de un período breve de tratamiento antes y después de la administración de una única dosis de 5.000 mUI de hCG. Estos resultados contradictorios podrían ser en parte debidos a una diferencia en la respuesta testicular a la LH/hCG, según se trate de una hipoprolactinemia de evolución breve o prolongada (Martikainen y col., 1982; Martikainen y col., 1983). Ha sido descripto por diferentes grupos, que la bromocriptina reduce el número de sitios receptores para LH en las células de Leydig. Huhtaniemi y col. (1981) observaron que en la rata adulta dicho tratamiento afecta sólo la unión de LH al receptor y no la respuesta esteroidogénica. Los resultados obtenidos en el presente

trabajo en cuanto a la disminución de los niveles de testosterona sérica, podrían ser compatibles con una disminución en el número de sitios receptores para LH/hCG, aunque indudablemente muchos otros factores deben ser considerados.

La observación más remarcable en este estudio fué la modificación en la concentración de andrógenos tisulares, principalmente a nivel testicular. Las concentraciones de testosterona y DHT, así como el total de los andrógenos evaluados, aumentaron significativamente en el testículo luego de la hipoprolactinemia inducida por bromocriptina. Estos datos podrían sugerir un aumento en la biosíntesis local, aunque alternativamente también podrían ser explicados como resultado de una disminución en la liberación de andrógenos a la circulación. Cualquiera de las dos posibilidades son conciliables con las variaciones observadas en el epidídimo donde los cambios fueron muy semejantes a los hallados en el testículo. En el epidídimo el incremento más pronunciado se observó en la testosterona, resultado que concuerda con el hecho de que si bien este andrógeno puede originarse "in situ" el aporte más importante proviene de la gonada.

El aumento en la concentración de andrógenos intratisulares podría ser como se mencionó anteriormente reflejo de una mayor actividad esteroidogénica. Ya que la concentración de LH sérica se mantuvo dentro de valores normales, si existiera tal incremento en la actividad biosintética de testos-

terona, éste podría ser mediado por una disminución de los niveles de PRL séricos, un efecto directo de la bromocriptina en la gonada o una combinación de ambos efectos.

Con relación a la aparente discrepancia entre las concentraciones de andrógenos séricos y testiculares, cabe mencionarse que estos resultados serían compatibles por un lado con la disminución de la secreción de andrógenos testiculares y por el otro con un aumento en la metabolización periférica como describieron Jacobi y col. (1978). Estos autores comprobaron una disminución en la vida media biológica de la testoterona en pacientes normoprolactinémicos tratados con bromocriptina. A este respecto, es oportuno mencionar que la administración de bromocriptina es capaz de modificar las concentraciones de GLAE en el suero (Vermeulen y col., 1982). Dado que los niveles de GLAE influyen la tasa de depuración metabólica y por consiguiente la producción de testosterona, cambios en los niveles plasmáticos de esta hormona no reflejan modificaciones similares en la producción de la misma a menos que los niveles de GLAE permanezcan constantes (Vermeulen y col., 1969; Clark y col., 1971).

Por otra parte al evaluar el contenido de cinc en el tejido testicular y epididimario antes y durante la hipoprolactinemia no se detectaron modificaciones pese al aumento observado en los niveles tisulares de andrógenos luego de

la administración de bromocriptina.

Al analizar el aspecto histológico individual de las gonadas, en condiciones basales, resultó claro que en relación a las características del sector tubular, se trataba de una población heterogénea, observándose desde espermatogénesis normales a diferentes grados de alteraciones de la misma. Estas modificaciones no se correlacionaron con los niveles intratesticulares de andrógenos.

Al comparar en estos mismos pacientes el aspecto del intersticio testicular con las correspondientes concentraciones de testosterona se comprobó una correlación directa. La concentración intratesticular de testosterona depende no sólo de la actividad de las células de Leydig, sino también del número y volumen relativo de las mismas. En este estudio el valor de testosterona más elevado se halló en un paciente con pseudohiperplasia de las células de Leydig. Tejido intersticial de aspecto normal se asoció generalmente a concentraciones medias de testosterona y las escasas muestras con niveles descendidos de andrógenos, mostraron zonas del intersticio notablemente alteradas.

El estudio histológico no reveló cambios detectables por microscopía óptica en el aspecto de los túbulos seminíferos o el intersticio antes y durante la hipoprolactinemia.

En conclusión, estos resultados señalan de manera origi

nal que la administración de bromocriptina a pacientes normoprolactinémicos induce un considerable aumento en los andrógenos de la gonada masculina sin modificar los niveles de LH sérica.

Finalmente, debe mencionarse que en pacientes hiperprolactinémicos con alteraciones en la motilidad de los espermatozoides, se han observado mejorías ostensibles al ser tratados por cortos períodos de tiempo con bromocriptina (Lanfer y col., 1981). A pesar de que de manera casi unánime se asocia a la hiperprolactinemia con un descenso en los niveles de LH circulantes (Fossati y col., 1976), los aumentos observados en las concentraciones de testosterona y DHT testiculares y epididimarios en los casos estudiados en este trabajo, podrían en parte, explicar el rápido restablecimiento de la función gonadal en pacientes con PRL elevada.

SEGUNDA PARTE

MATERIALES Y METODOS II

M A T E R I A L E S.

REACTIVOS UTILIZADOS.

Los reactivos utilizados para la extracción y purificación de testosterona y 3 α -Diol en testículo y epidídimo de rata, fueron idénticos a los descritos previamente (Materiales y Métodos, la. Parte). Asimismo, las drogas y reactivos empleados en los RIE correspondientes para el dosaje de estas hormonas en tejido, suero o medios de incubación también coinciden con los detallados en la sección mencionada.

Los reactivos utilizados para la determinación de PRL y LH sérica en rata fueron provistos por NIAMDD (N.I.H., EE.UU)

La bromocriptina empleada para la inducción de hipoprolactinemia en la rata y en las incubaciones "in vitro", fue provista gentilmente por Sandoz (Basilea, Suiza). La PRL ovina (PRL_o) y de rata (PRL_r) utilizadas en las incubaciones "in vitro", fueron provistas por NIAMDD (EE.UU). Otros reactivos utilizados fueron: 2,8 ³H adenosina-3'5'-fosfatocíclico, sal de amonio, 42.5 Ci/mmol de New England Nuclear Corp. EE.UU l-metil-3 isobutilxantina (MIX), obtenido de Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WIS (EE.UU); Medio 199 de Difco Laboratories (Detroit, Mich. (EE.UU); colagenasa tipo I de Worthington; Permablend de New England Nuclear Corp.; gonadotropina coriónica humana (hCG, APL: actividad biológica 3000 UI/mg

de Ayerst Laboratories (Montreal, Canadá), teofilina, Adenosina 3',5' monofosfato cíclico (AMPc) y restantes drogas y reactivos fueron de grado analítico y provistos por Sigma Chemical Comp. (EE.UU).

ANIMALES Y TRATAMIENTOS.

- ANIMALES. Se utilizaron ratas entre 30 y 40 días de edad pertenecientes a (*Rathus norvegicus albinus*) variedad Wistar provenientes del criadero del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Las ratas fueron mantenidas con períodos de luz de 14 horas (de 6 a 20 hs), con temperatura controlada de $23^{\circ}\text{C} \pm 1.5$ y provisión de agua y alimento balanceado (puriad libitum).

- INDUCCION DE HIPOPROLACTINEMIA. La bromocriptina se preparó disolviendo cantidades iguales de bromocriptina y ácido tartárico en etanol absoluto-solución fisiológica (30:70 vol/vol) a las dosis de 0.75; 1.5 y 3.0 mg/kg de peso corporal/día en dos dosis diarias (8.00 y 18.00 hs) y por vía subcutánea. Los animales controles recibieron la misma cantidad de ácido tartárico disuelto en etanol absoluto-solución fisiológica. El tratamiento se extendió por espacio de diez días y los animales fueron sacrificados por decapitación aproximadamente quince horas después de la última inyección.

En diferentes grupos de animales sometidos al tratamiento anteriormente descrito se analizaron los siguientes parámetros:

1) En el momento de sacrificar por decapitación se recogió la sangre del cuello y se la dejó coagular a temperatura ambiente. Luego de la retracción del coágulo las muestras se centrifugaron y los sueros se almacenaron a -20°C hasta el momento de ser utilizados para la determinación de PRL, LH y esteroides por RIE; 2) Los testículos se disecaron rápidamente, se colocaron en acetona fría y congelaron a -20°C hasta la determinación de las concentraciones intratesticulares de andrógenos; 3) Los testículos provenientes de otros grupos de animales con idéntico tratamiento fueron decapsulados e incubados "in vitro" para evaluar la producción de andrógenos y AMPc en el medio de incubación; 4) En animales tratados también con vehículo o con distintas dosis de bromocriptina, se disecaron los testículos y luego se realizó colagenización para la obtención de una suspensión de células de Leydig que se incubaron "in vitro" para evaluar la producción de andrógenos.

- INYECCION INTRATESTICULAR DE BROMOCRIPTINA.

A un grupo de animales intactos se les inyectó por vía intratesticular 10 μl de solución de bromocriptina (8×10^{-5}

Molar) en el mismo vehículo descrito en el punto anterior. Como existía la posibilidad de que la bromocriptina pudiera ejercer sus efectos a través, de modificaciones en la liberación de PRL hipofisaria se procedió en la siguiente manera; las ratas fueron anestesiadas levemente con éter y la bromocriptina inyectada en el testículo derecho de cada animal mientras que el contralateral se inyectó con vehículo. Al cabo de 18 hs se sacrificaron los animales por decapitación y se evaluaron los niveles de andrógenos producidos "in vitro" por ambas gonadas. De esta forma, cada animal representa su propio control, habiéndose demostrado que con este diseño se evalúa únicamente el efecto local de la droga (Sharpe, 1984).

M E T O D O S.

DOSAJE DE HORMONAS EN SUERO.

- DETERMINACION DE PRL Y LH SERICAS.

Para la determinación de PRL y LH séricas se utilizó un RIE por doble anticuerpo. El primer antisuero contra PRL de rata fue obtenido en conejos (NIAMDD anti-rat prolactina suero 4-7). El mismo se diluyó en buffer (fosfato 0.01 M, ClNa 0.15 M, merthiolate 0.01%, pH 7,4) con 0.05 M de EDTA

y 2% de suero normal de conejo.

El estandar de referencia fué PRL de rata (NIAMDD rat P2) con 30 UI/mg de actividad biológica y el segundo anticuerpo fue obtenido en ovejas contra globulina de conejo.

Para la determinación de LH se utilizó un método heterólogo. Como primer antisuero se utilizó el obtenido por Niswender y col. (1968), inmunizando conejos con LH ovina emulsionada con adyuvante de Freund completo. Este antisuero reacciona con la LH ovina y de numerosas especies incluyendo la rata. La hormona trazadora fue en este caso LH purificada obtenida de hipófisis ovina. Como preparación de referencia se utilizó la LH purificada proveniente de hipófisis de rata (Rat LH RP1).

Las muestras se evaluaron por duplicado en alícuotas de 50 y 100 μ l respectivamente utilizándose los mismos protocolos para las dos hormonas. Luego se agregó el primer anticuerpo a los sueros e incubaron 24 hs a 4°C, se colocó la hormona marcada y el tercer día el segundo anticuerpo. Luego de 48 a 72 hs a 4°C, se separó la hormona unida de la libre mediante centrifugación. Se aspiró el sobrenadante de cada muestra y en los precipitados correspondientes a los complejos hormona-anticuerpo se contó la radioactividad en un Contador Gamma Automático Beckman modelo 4000.

Los resultados se expresaron en ng/ml.

- DETERMINACION DE TESTOSTERONA Y 3 α -DIOL SERICOS.

Para determinar la cantidad de andrógenos presentes en el suero, se descongelaron los sueros y se realizaron 2 extracciones con éter etílico. Se evaporó luego la fase orgánica y las muestras se resuspendieron en buffer de RIE.

La testosterona se evaluó sin separación previa y como el antisuero utilizado cruza con DHT el valor corresponde a testosterona + DHT.

Los ensayos empleados para los dosajes de testosterona y 3 α -Diol fueron idénticos a los descritos en la sección Materiales y Métodos la. Parte.

DOSAJE DE ANDROGENOS EN TEJIDO TESTICULAR Y EPIDIDIMARIO.

En 4 grupos de ratas (12 animales por grupo) tratados con vehículo o con 3 dosis diferentes de bromocriptina se determinaron los niveles de andrógenos en testículo y epidídimo. Para cada grupo se procedió en la siguiente forma: 1 testículo o 2 epidídimos de 4 animales diferentes se homogeneizaron conjuntamente en 10 ml de acetona, agregando al mismo tiempo 10.000 dpm de cada esteroide tritiado para evaluar las pérdidas durante el procesamiento. Luego de 10 min. los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. y en una fracción del sobrenadante equivalente a 200 mg de tejido se

realizó la extracción con éter y las diferentes particiones con solventes tal cual se describió en detalle para los tejidos humanos.

En otro caso se reiteraron los mismos tratamientos y se evaluaron los niveles de andrógenos testiculares procesando separadamente las gonadas de cada animal. En este caso se pesaron aproximadamente 200 mg de cada testículo y se homogeneizaron en 5 ml de acetona continuando luego con los mismos pasos descriptos anteriormente. Cada andrógeno fue separado mediante cromatografía en microcolumnas de celita y posteriormente evaluado por RIE específicos.

PRODUCCION DE ANDROGENOS Y AMPc "IN VITRO". EFECTO DE LA HIPO- PROLACTINEMIA.

- TESTICULOS ENTEROS DECAPSULADOS.

Se estudió la producción de andrógenos y AMP cíclico en incubaciones de testículos enteros provenientes de animales controles e hipoprolactinémicos. Los animales se mataron por decapitación, los testículos se decapsularon e inmediatamente se colocaron en viales de plástico de 20 ml, donde se realizaron las incubaciones. Cada vial contenía 3 ml de Medio 199 y 1-metil-3 isobutil xantina (MIX : 0,1 mM). En estas experiencias siempre se utilizó un testículo como control y se lo incubó en ausencia de hCG, mientras que el testículo contra-

lateral fué incubado en presencia de diferentes concentraciones de hCG para evaluar la sensibilidad y capacidad de respuesta a la hCG. Según el caso se agregó a cada vial 0.004, 0.01, 0.04, 0.1, 0.4, 1, 4, 10, 40 y 100 mUI de hCG en 50 μ l de medio y los controles fueron equilibrados con 50 μ l de medio 199.

Las incubaciones se realizaron en un incubador Dubnoff con agitación constante de 100 ciclos/min. bajo atmósfera de carbógeno (95% de O_2 y 5% de CO_2). Al cabo de este periodo de tiempo se detuvo la incubación introduciendo los viales en un baño de hielo, se separó el medio, se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min. y el sobrenadante se congeló a $-20^{\circ}C$ hasta el momento de la determinación de andrógenos.

Alicuotas de 500 μ l de cada muestra fueron previamente separadas, colocadas en tubos de vidrio y calentadas a ebullición durante 10 minutos. Luego de enfriar, se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 10 minutos y en alícuotas de 10 μ l se evaluó el AMPc.

- CELULAS DE LEYDIG DISPERSAS.

Para el aislamiento de células de Leyding se utilizó la técnica descrita por Catt y col. (1974), utilizando colagenasa para la dispersión del tejido testicular.

Los testículos fueron decapsulados y luego suspendidos

en tubos de plástico conteniendo Medio 199 con 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA). Las incubaciones se realizaron en la relación de 1 gr de testículo por ml de medio y se colagenizaron, según el caso, hasta un máximo de 10 testículos por vial, conteniendo 0.3 mg de colagenasa/ml de Medio.

Las incubaciones se realizaron a 34°C, durante 10-15 min. en un incubador Dubnoff con agitación constante, bajo atmósfera de carbógeno. Finalizada la incubación, la reacción se detuvo por dilución con Medio 199 frío (8 ml por cada ml de incubación).

Con el objeto de dispersar mejor el tejido, se agitó en forma rotatoria el tubo incubado, durante 3 min., dejándolo reposar otros 3 min. Cuando los túbulos decantaron el sobrenadante fué aspirado con una jeringa de plástico y filtrado a través de una malla Nitex recogién dose el líquido filtrado en otro tubo de plástico. La resuspensión se realizó una vez más y el líquido filtrado se colectó junto con el filtrado anterior. Este filtrado, conteniendo las células intersticiales, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. y el precipitado así obtenido, se resuspendió en Medio 199-0.1% BSA.

La determinación del número de células se realizó sobre 100 μ l de suspensión, determinándose la viabilidad de las mismas por el método de exclusión del Azul Tripán, que colorea específicamente las células muertas. La tinción se realizó

utilizando una solución de colorante 0.4% en buffer fosfato y las células se contaron en una cámara de conteo, comprobándose en todas las preparaciones una viabilidad mayor que el 95%.

Para determinar la proporción de células de Leydig se investigó en la suspensión celular obtenida la actividad de la enzima 3β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3β -HSD) según la técnica descrita por Levy y col. (1959). Para ello se incubó una suspensión celular en presencia de β NAD, nitro azul de tetrazolium y Δ_5 -androsteno-3 β -ol-17-one o etiocolanona en propilenglicol como sustrato de la reacción. Como se ha descrito la positividad de esta enzima se halla predominantemente en las células de Leydig.

Para evaluar la producción de andrógenos se incubaron alícuotas de 1ml de la suspensión de células de Leydig (1×10^6 células/ml) en viales de plástico (20 ml), en presencia de 1-metil-3-isobutil-xantina (MIX, 0.125 mM). Las incubaciones de células se realizaron siempre por triplicado en ausencia (basal) o en presencia de diferentes concentraciones de hCG (0.1, 0.2, 0.4, 1.0 or 10 mUI). Las incubaciones se realizaron durante tres horas a 34°C bajo carbógeno y con agitación constante de 100 ciclos/min. Al cabo de dicho período, la incubación se detuvo transfiriendo los viales a un baño con

hielo y las células más el medio de incubación, se transfirieron a tubos de plástico y se centrifugaron a 800 x g durante 10 min. El sobrenadante fue congelado a -20°C hasta la medición de andrógenos por RIE.

MEDICION DE ANDROGENOS EN LOS MEDIOS DE INCUBACION.

Para las determinaciones de andrógenos en los medios de incubación de testículos enteros, estos se diluyeron 1:10 en buffer fosfato y la testosterona y el 3 α -Diol se evaluaron en alícuotas de 100 y 50 μ l respectivamente sin separación previa mediante RIE.

En los medios de incubación de las células de Leydig la determinación de testosterona y 3 α -Diol se realizó directamente en 50 y 100 μ l respectivamente.

DETERMINACION DE AMPcíclico.

El AMPc fue determinado en el medio de incubación de los testículos enteros utilizando la técnica original de Brown y col. (1971)

- AISLAMIENTO DE QUINASA DE PROTEINAS DE LA ADRENAL BOVINA.

La quinasa de proteínas fue aislada de glándulas adrenales bovinas. Luego de la separación de la médula, las cortezas adrenales fueron homogeneizadas en un homogeneizador tipo

Polytron a 0°C, con 1.5 volúmenes de buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7.4 que contenía sacarosa 0.25 M; KCl 25 mM y MgCl₂ 5mM. Este homogenato se centrifugó a 2000 x g durante 5 min y el sobrenadante a 5000 x g durante 15 min. El sobrenadante de esta última centrifugación se fraccionó en alícuotas de 0.5 ml, que se almacenaron a -20°C. Esta preparación fue descongelada y diluída en el buffer de ensayo (Tris-ClH 50 mM, pH 7.4), que contenía teofilina 8 mM y 2-mercaptoetanol 6 mM en el momento de cada determinación. Este buffer se utilizó en todos los pasos posteriores.

- ENSAYO.

Cada tubo contenía 50 µl de la dilución apropiada de la enzima (1:8), 100 µl de una cantidad conocida de AMPc (entre 0.039 y 20 pmoles) o Medio de incubación y 50 µl de AMPc-³H (aproximadamente 5000 dpm). La cantidad de enzima era tal que unía aproximadamente el 40% del AMPc marcado.

La incubación se realizó a 4°C durante 90 min. y el AMPc libre se separó por el agregado de 200 µl de una suspensión de carbón-BSA (500 mg de carbón: 100 mg de BSA, para 10 ml de buffer de ensayo). La radiactividad se determinó en un Contador de Centelleo Líquido, utilizando tolueno centelleante con 30% de Triton X-100 (v/v).

PRODUCCION DE ANDROGENOS "IN VITRO".

- EFECTO DIRECTO DE LA BROMOCRIPTINA.

Testículos provenientes de ratas de 40 días de edad muertas por decapitación, fueron decapsulados e incubados en viales de plástico con 3 ml de Medio 199, 0.1 mM de Mix y 5 concentraciones diferentes de bromocriptina. En cada experimento se realizaron 4 incubaciones (1 testículo/incubación) para cada concentración de bromocriptina ($1,3 \times 10^{-9}$ a $1,3 \times 10^{-5}$ Molar) y los testículos contralaterales correspondientes se incubaron en ausencia de droga. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 3 horas a 34°C bajo carbógeno y con agitación constante de 100 ciclos por minuto. Otros dos grupos de testículos fueron incubados en idénticas condiciones (con y sin bromocriptina) pero en presencia de 0.5 y 50 mUI de hCG.

Células de Leydig aisladas de testículos de ratas de 40 días de edad se incubaron "in vitro" en presencia de diferentes concentraciones de bromocriptina. Suspensiones con 1×10^6 células en 1 ml de Medio, se incubaron por triplicado con 0.1 mM de Mix y en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones del neurofármaco ($6,5 \times 10^{-7}$ a $1,3 \times 10^{-5}$ Molar). En otras incubaciones, las células en presencia

de bromocriptina (1.3×10^{-5} M) fueron estimuladas con 0.25 y 100 mUI de hCG.

En los medios de incubación provenientes de testículos enteros y suspensión de células aisladas se dosaron los niveles de 3α -Diol y testosterona, por las técnicas previamente descriptas.

- EFEECTO DIRECTO DE LA PRL.

Testículos provenientes de ratas de 40 días de edad fueron decapsulados e incubados en 3 ml de Medio 199, 0.1 mM de Mix y 3 concentraciones diferentes de PRL ovina (PRL_o: 5×10^{-8} , 5×10^{-7} , y 5×10^{-6} Molar). En cada experimento se realizaron 6 incubaciones (1 testículo/incubación) para cada concentración de PRL y los testículos contralaterales correspondientes se incubaron en ausencia de la hormona.

Las incubaciones se llevaron a cabo durante 3 horas a 34°C bajo carbógeno y con agitación constante. Otros dos grupos de testículos fueron incubados en idénticas condiciones (con y sin PRL) pero en presencia de 0.5 y 100 mUI de hCG.

Se estudió la respuesta de células de Leydig a la PRL incubando por triplicado suspensiones de 1×10^6 células en 1 ml de Medio en ausencia y en presencia de 5 concentraciones (2.5×10^{-8} , 5×10^{-8} y 5×10^{-7} , 2.5×10^{-7} y 5×10^{-6} Molar) de dicha hormona.

En otros casos las células fueron incubadas con cada una de las tres concentraciones menores de PRL mencionadas y estimuladas con 0.25 y 100 mUI de hCG.

Finalmente, suspensiones de células de Leydig fueron incubadas con 5×10^{-7} Molar de PRL de rata (PRLr), en ausencia o presencia de 0.25 y 100 mUI de hCG.

En los medios de incubación provenientes de testículos enteros y suspensión de células de Leydig se determinaron los niveles de 3α -Diol y testosterona por RIE.

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

El análisis estadístico de los resultados fue realizado según los casos, mediante la aplicación de los tests de Student apareado y no apareado. En los casos en que se realizaron comparaciones múltiples se aplicaron los tests de Dunnett y Tukey (Tukey 1949; Snedecor y col., 1967)

RESULTADOS II

EFFECTO DE LA HIPOPROLACTINEMIA INDUCIDA SOBRE LA FUNCION
TESTICULAR DE LA RATA.

Como ya se ha mencionado la PRL participa en el control de la función reproductiva masculina no solo en el hombre, sino que también interviene activamente en diferentes especies de roedores tales como la rata, ratón y hamster (Bartke, 1971; Bartke, 1973 y Bex y col., 1977). Se ha descrito que la PRL ejerce sus efectos a distintos niveles del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, regulando la secreción de gonadotrofinas, modificando la respuesta del testículo a las gonadotrofinas y/o modulando la acción de los andrógenos en los órganos efectores.

Niveles circulantes de PRL en exceso o defecto pueden ocasionar alteraciones gonadales en diferentes especies.

Los efectos de esta hormona en una especie determinada parecen depender además del estadio en que se encuentre el animal considerado, así en la rata algunas evidencias indicarían su importancia durante el desarrollo sexual en el macho.

Con el propósito de esclarecer el rol de la PRL en el proceso madurativo de la rata en desarrollo, se investigó el efecto de la hiperprolactinemia inducida en el animal intacto. Se utilizó como modelo ratas prepúberes de 30 días de edad, a las que se les administró un agonista dopaminérgico, la bromocriptina, durante 10 días consecutivos, al cabo de

los cuales los animales fueron sacrificados realizándose los estudios detallados en la sección Materiales y Métodos y cuyos resultados se exponen a continuación.

PESO CORPORAL, TESTICULAR Y EPIDIDIMARIO.

A cuatro grupos diferentes de ratas se les administró durante 10 días (s.c.) bromocriptina a las dosis de 0.75, 1,5 y 3,0 mg/kg peso/día y evaluó al final del tratamiento el peso corporal, testicular y epididimario.

La Figura 28 muestra los resultados obtenidos en los parámetros determinados y como puede observarse no hubo diferencias en el peso corporal entre los 4 grupos de animales

Por el contrario, los pesos testiculares y epididimarios disminuyeron significativamente en los 3 grupos tratados con bromocriptina respecto del control ($p < 0.05$, test de Dunnet). El mantenimiento del mismo peso corporal pareciera indicar que no se trata de un retardo en el crecimiento general sino de un efecto específico sobre el testículo y epidídimo.

NIVELES DE LH Y PRL EN SUERO.

Los efectos del tratamiento con bromocriptina sobre los niveles séricos de PRL y LH se muestran en la Tabla 5. Puede observarse, que luego de 10 días de administración de dicho fármaco a 3 dosis diferentes (0,75, 1,5 y 3,0 mg/kg peso/día) la concentración media de PRL ha descendido a valores

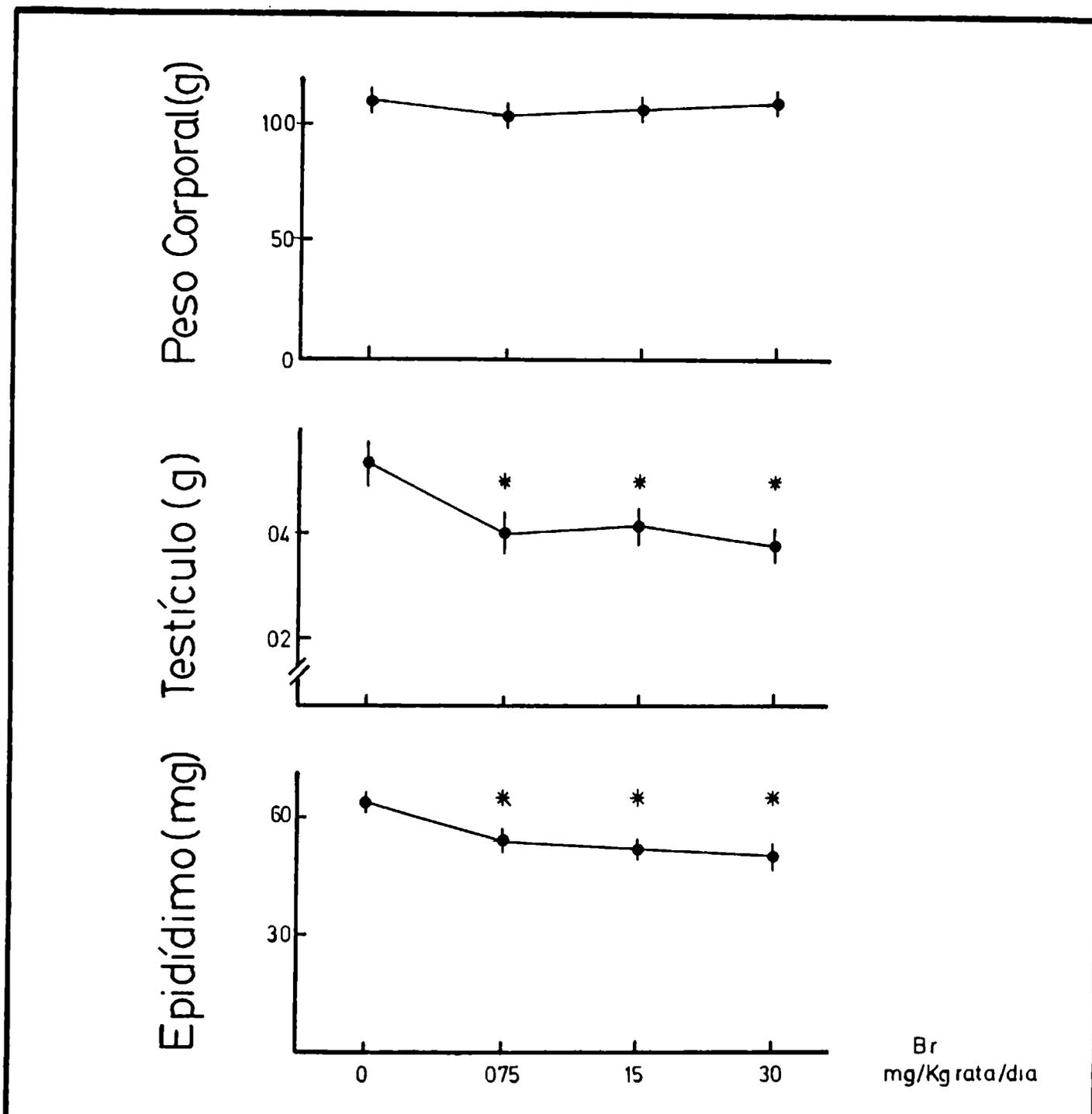


Figura 28

Efecto de diferentes dosis de Br en ratas tratadas entre los 30 y 40 días de edad sobre el peso corporal, epididimario y testicular. Cada valor representa la media \pm error estandar n= 6.

* Datos significativamente diferentes del control, test de Dunnett.

T a b l a 5.

| Tratamiento | n | PRL ng/ml | LH ng/ml |
|-------------|----|---------------|-------------|
| Control | 12 | 9,4 ± 1,9 | 11,8 ± 1,8 |
| Br | | | |
| 0,75 mg | 12 | no detectable | 10,8 ± 2,1 |
| 1,50 mg | 12 | no detectable | 11,5 ± 2,8 |
| 3,00 mg | 12 | no detectable | 10,6 ± 1,9 |

Efecto del tratamiento con distintas dosis de Br en ratas entre los 30 y 40 días de edad, sobre los niveles circulantes de PRL y LH.

n = número de animales.

Los datos representan el valor medio ± error estándar.

indetectables.

Por otra parte, los niveles de LH permanecieron constantes en todos los casos a lo largo del tratamiento.

NIVELES DE TESTOSTERONA Y 3 α -DIOL EN SUERO.

En la Figura 29 se muestran los resultados encontrados para los niveles circulantes de testosterona y 3 α -Diol en el grupo de animales tratados con vehículo o las diferentes dosis de bromocriptina. Cada barra representa el valor medio de 12 determinaciones y los niveles en el grupo control fueron ($\bar{X} \pm ES$): testosterona, 450 ± 70 pg/ml; 3 α -Diol, 1670 ± 200 pg/ml. Como consecuencia del tratamiento, ambos andrógenos séricos resultaron significativamente disminuidos correspondiendo a las distintas dosis de bromocriptina (Br₁: 0,75 mg/kg peso/día; Br₂: 1,5 mg/kg peso/día; Br₃: 3 mg/kg peso/día) los siguientes valores ($\bar{X} \pm ES$): 3 α -Diol, Br₁: 920 ± 90 ; Br₂: 830 ± 100 ; Br₃: 730 ± 80 pg/ml; testosterona: Br₁: 190 ± 30 ; 200 ± 30 y 190 ± 20 pg/ml. El análisis estadístico de los datos mediante el test de Tuckey no evidenció diferencias significativas en los niveles de andrógenos correspondientes a las 3 dosis utilizadas.

CONCENTRACIONES INTRATESTICULARES DE TESTOSTERONA, DHT Y 3 α -DIOL.

Con el propósito de investigar si las modificaciones

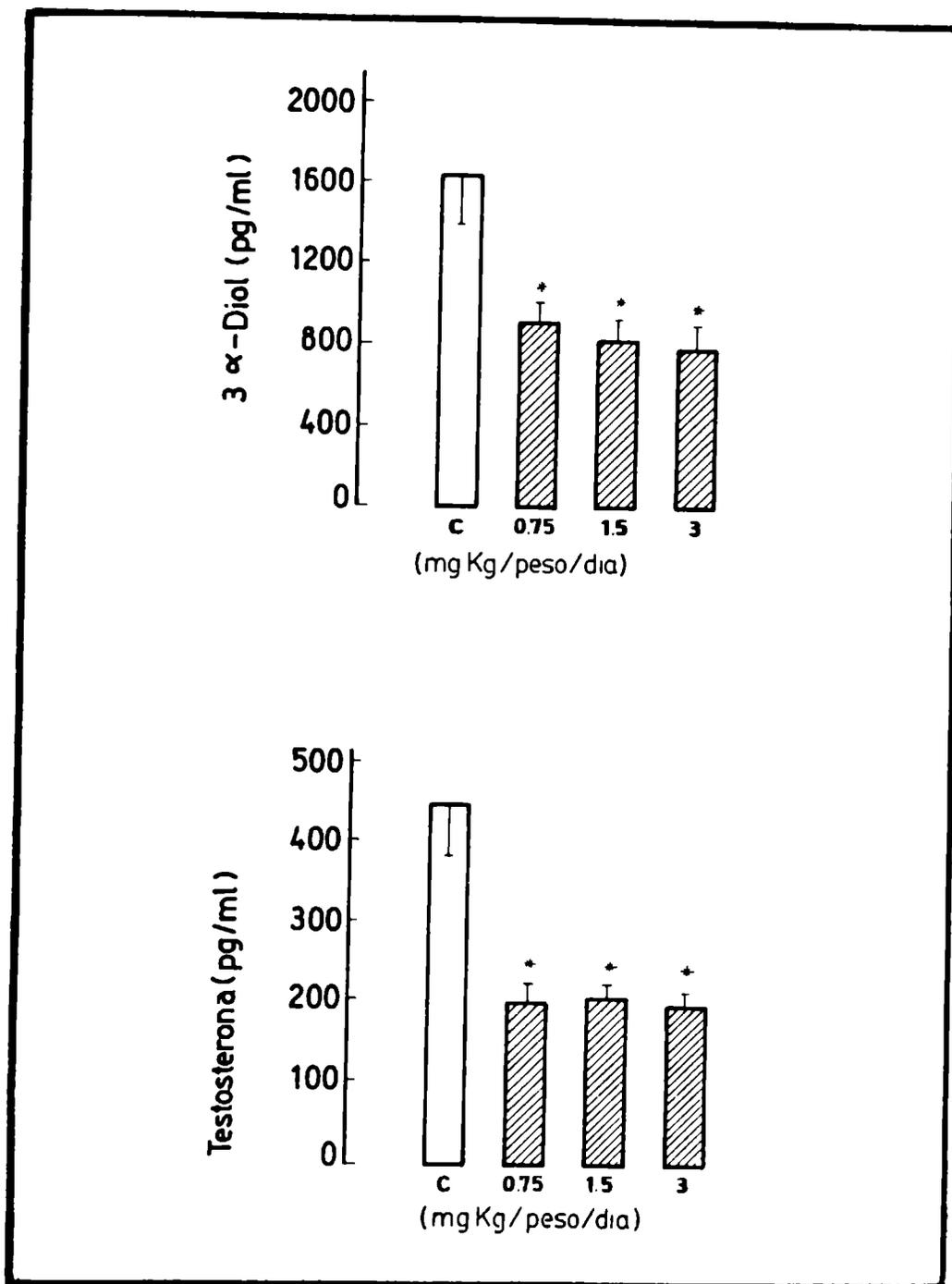


Figura 29.

Efecto del tratamiento con distintas dosis de Br en ratas entre los 30 y 40 días de edad, sobre los niveles de T y 3 α -Diol séricos. * Datos significativamente diferentes del grupo control (c) ($p < 0.05$, test de Dunnett).

en los andrógenos circulantes reflejaban también cambios en las concentraciones testiculares de las mismas hormonas , se determinaron dichos andrógenos en 3 pooles de testículo correspondientes a cada uno de los 4 grupos estudiados. Cada "pool" estuvo integrado por 4 testículos diferentes y los resultados obtenidos utilizando RIE específicos para el dosaje de testosterona y DHT fueron los que se detallan en la Tabla 6. Como puede observarse, el tratamiento con el agonista dopaminérgico, evidenció una tendencia a disminuir el contenido de andrógenos durante la hipoprolactinemia pero los cambios no resultaron estadísticamente significativos. Con relación a las concentraciones de andrógenos en el epidídimo, se emplearon "pooles" compuestos de 8 órganos correspondientes a 4 animales diferentes, y los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en los tres grupos con respecto al grupo control (Tabla 7).

Los datos anteriormente referidos y otros datos no mostrados señalaron sólo una tendencia a disminuir las concentraciones testiculares de testosterona, DHT y 3 α -Diol durante la inducción de una severa hipoprolactinemia.

Debido a que en algunos casos se observaron importantes variaciones individuales en los pesos testiculares, se decidió realizar la misma experiencia procesando los testículos

Tabla 6.

| Tratamiento | Testosterona | | DHT | |
|----------------|--------------|--------------|------------|--------------|
| | ng/g | ng/testículo | ng/g | ng/testículo |
| Control | 12,7 ± 1,5 | 6,9 ± 0,8 | 18,8 ± 1,8 | 10,1 ± 1,0 |
| bromocriptina | | | | |
| mg/kg peso/día | | | | |
| 0,75 | 17,2 ± 3,0 | 6,9 ± 1,2 | 21,9 ± 8,1 | 8,9 ± 3,3 |
| 1,5 | 13,4 ± 3,8 | 5,6 ± 1,6 | 23,5 ± 6,9 | 9,8 ± 2,8 |
| 3,0 | 11,4 ± 3,4 | 4,2 ± 1,3 | 30,3 ± 9,8 | 11,2 ± 3,6 |

Influencia del tratamiento con diferentes dosis de bromocriptina durante 10 días sobre las concentraciones (ng/g) y el contenido (ng/testículo) de testosterona y DHT en testículos de ratas de 40 días de edad.

T a b l a 7.

| Tratamiento | Testosterona | | DHT | |
|---------------------------------|--------------|--------------|------------|--------------|
| | ng/g | ng/epidídimo | ng/g | ng/epidídimo |
| Control | 1,9 ± 0,2 | 1,2 ± 0,1 | 6,4 ± 0,6 | 4,0 ± 0,4 |
| bromocriptina mg/kg peso/día | | | | |
| 0,75 | 2,9 ± 0,9 | 1,6 ± 0,4 | 8,9 ± 1,0 | 4,6 ± 0,5 |
| 1,5 | 1,4 ± 0,5 | 0,8 ± 0,3 | 11,2 ± 1,6 | 5,8 ± 0,8 |
| 3,0 | 2,8 ± 0,8 | 1,4 ± 0,4 | 8,4 ± 0,9 | 4,2 ± 0,5 |

Influencia del tratamiento con diferentes dosis de bromocriptina durante 10 días sobre las concentraciones (ng/g) y el contenido (ng/epidídimo) de testosterona y DHT en epidídimos de ratas de 40 días de edad.

individualmente y expresando las concentraciones por gramo de tejido o por peso de testículo (contenido). La Figura 30 ilustra los resultados obtenidos en ng/testículo (barras lisas) y ng/g (barras sombreadas). La disminución observada con respecto al control para el grupo tratado con 3 mg de bromocriptina resulta estadísticamente significativa para 3α -Diol cuando los resultados se expresan en ng/testículo ($\bar{X} \pm$ ES; 64 ± 15 versus $35,2 \pm 10,9$, $p < 0,02$) y para testosterona cuando ellos se expresan en ng/g de tejido ($\bar{X} \pm$ ES; $23,26 \pm 3,31$ versus $18,48 \pm 4,88$ ($p < 0,05$)).

PRODUCCION DE ANDROGENOS "IN VITRO" POR TESTICULO TOTAL.

Las modificaciones ocasionadas a través de la inducción de hipoprolactinemia en los niveles séricos y concentraciones intratesticulares de andrógenos, parecerían indicar cierto grado de alteración de la capacidad esteroidogénica del testículo. Se decidió entonces investigar la producción de andrógenos "in vitro" antes y después de la administración del agonista dopaminérgico.

En primer lugar se estudió en animales de 40 días de edad, la producción basal de andrógenos "in vitro" y la estimulada con distintas dosis de hCG. En el medio de incubación se midieron por RIE los niveles de 3α -Diol y testosterona producidos.

La Figura 31 muestra las curvas dosis-respuesta que

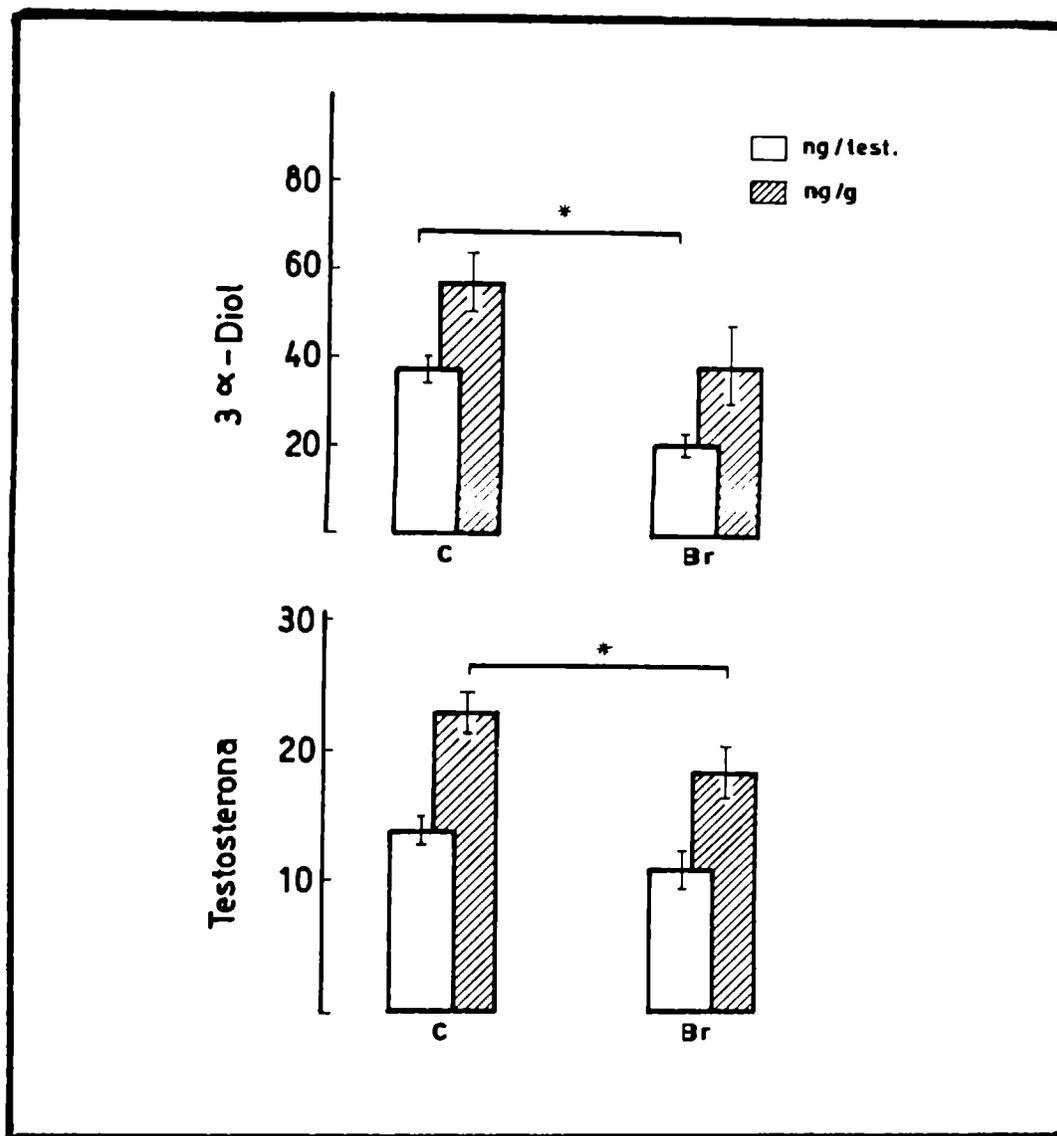


Figura 30.

Efecto del tratamiento con 3 mg de Br/kg peso/día en ratas entre los 30 y 40 días de edad sobre las concentraciones intratesticulares de T y 3α Diol. Ambos andrógenos fueron aislados por cromatografía en microcolumnas de celita como se describe en Materiales y Métodos. Cada barra representa el valor medio \pm error estandar (n = 6). * Datos significativamente diferentes del control (c) ($p < 0.05$), test de Student).

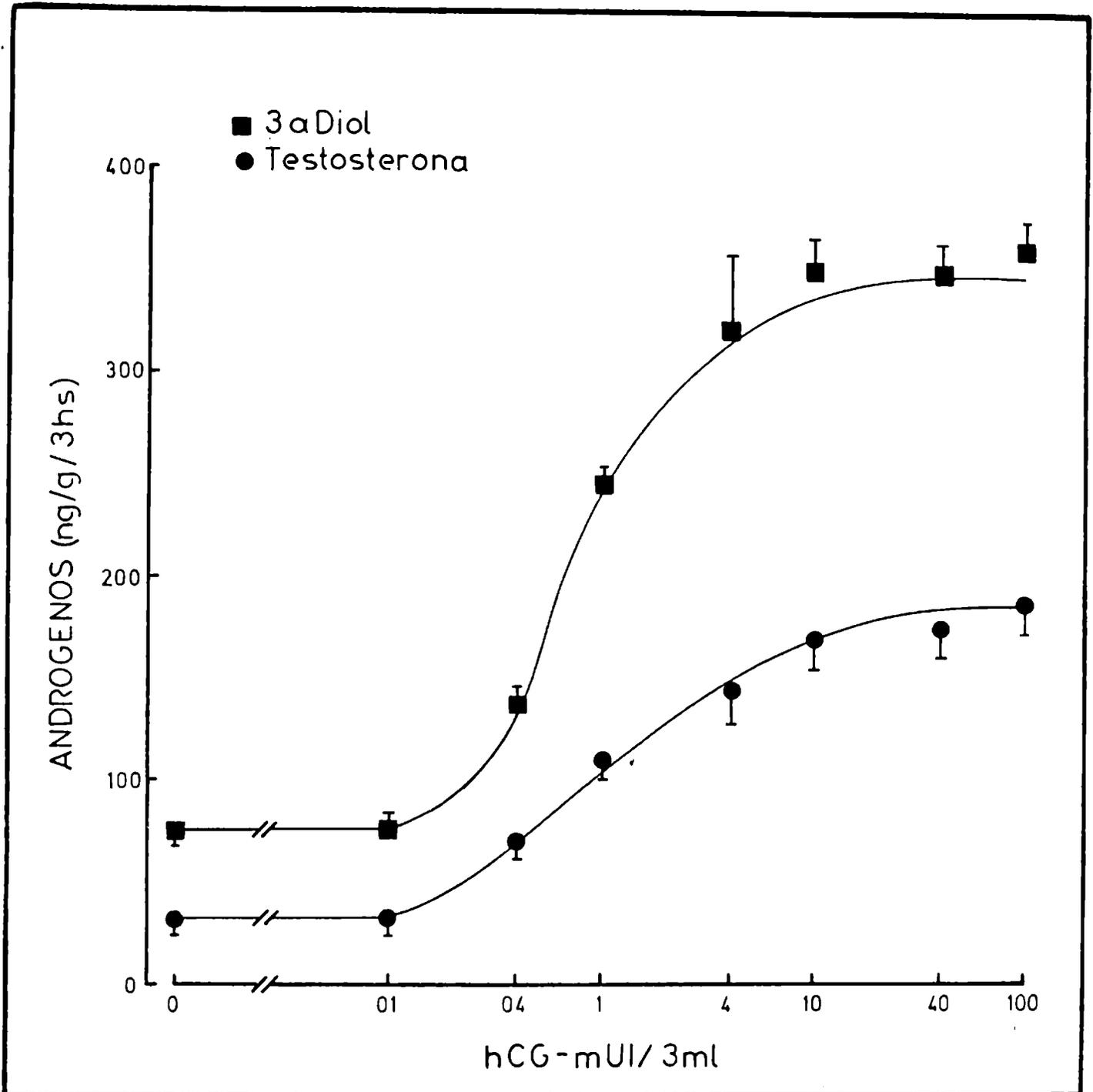


Figura 31.

Curvas dosis-respuesta a la hCG "in vitro" para la producción de 3 α -Diol y T por testículos enteros decapsulados de ratas de 40 días de edad. Cada punto representa el valor medio \pm error estandar (n= 6).

se obtuvieron para los dos andrógenos medidos. Los niveles basales de 3α -Diol y testosterona producidos fueron ($\bar{x} \pm ES$, n= 24), 75 ± 6 ng/g y 25 ± 3 ng/g respectivamente. La respuesta en la producción de andrógenos comenzó a evidenciarse en presencia de 0,1 mUI /hCG y se incrementó notablemente a partir de 0,4 mUI.

En las incubaciones realizadas en presencia de 4 mUI de hCG la producción de 3α -Diol y testosterona se elevó 5,6 y 5,2 veces respectivamente. No se logró incrementar la producción de andrógenos al aumentar las dosis de hCG utilizadas (10 y 100 mUI), y por consiguiente las incubaciones realizadas en presencia de 4 o más mUI de hCG se consideraron en condiciones de estímulo máximo.

Cuando se estudió la producción "in vitro" de andrógenos por testículos provenientes de ratas de 40 días de edad que habían sido tratadas con vehículo o con 0,75 y 1,5 mg de bromocriptina/kg peso/día durante 10 días consecutivos se obtuvieron los resultados que se grafican en la Figura 32. Como puede observarse, los testículos de animales hipoprolactinémicos mostraron menor producción basal de testosterona que el grupo control. También se observó una menor respuesta a estímulos submáximos con hCG en los testículos de animales tratados con la droga. Luego de un estímulo máximo no se observaron diferencias significativas en los niveles de testosterona

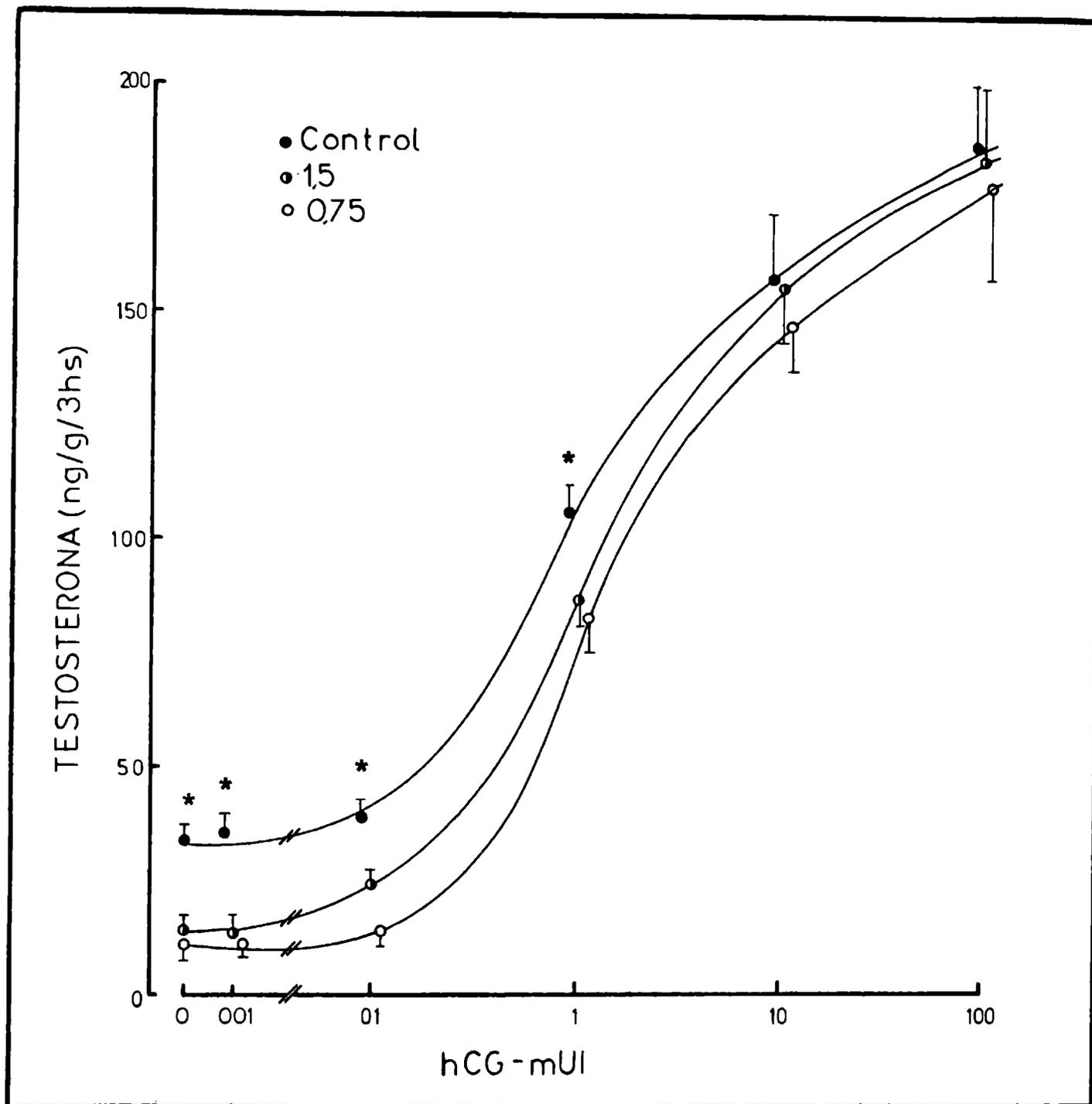


Figura 32.

Curvas dosis-respuesta a la hCG "in vitro" para la producción de T por testículos enteros decapsulados provenientes de ratas tratadas con: (●) vehículo; (◐) 1,5 y (○) 0.75 mg Br/kg peso/día entre los 30 y 40 días de edad. Cada punto representa el valor medio \pm error estándar (n = 3).

producidos por los distintos grupos de animales. Cuando se evaluó la producción de 3α -Diol se obtuvo una respuesta muy semejante.

Al estudiar la producción de andrógenos por testículos provenientes de animales que habían sido inyectados durante el mismo período de tiempo con 3 mg de bromocriptina se observó el mismo efecto. Así, en la Figura 33 se muestra como en el grupo hipoprolactinémico la producción de 3α -Diol y de testosterona resultó significativamente disminuida con respecto al grupo control ($p < 0.001$). En condiciones de estímulo submáximo también se observó esta tendencia, resultando significativos los descensos para 3α -Diol y testosterona luego del estímulo con 0,4 y 1 mUI respectivamente ($p < 0.05$).

Una aparente mayor respuesta, fué detectada en los testículos provenientes de animales hipoprolactinémicos cuando estos fueron sometidos a un estímulo máximo con hCG. Dicho incremento resultó estadísticamente significativo para el 3α -Diol producido en respuesta a 4 mUI de hCG ($p < 0.05$).

Teniendo en cuenta que la administración del agonista dopaminérgico disminuyó el peso de los testículos sin afectar el peso corporal, es probable que la expresión de los resultados en ng/testículo refleje más ciertamente el verdadero efecto causado por la droga. Expresados de esta manera, los resultados se muestran en las Figuras 34 y 35 y puede observarse una menor producción basal de andrógenos en los animales hipo-

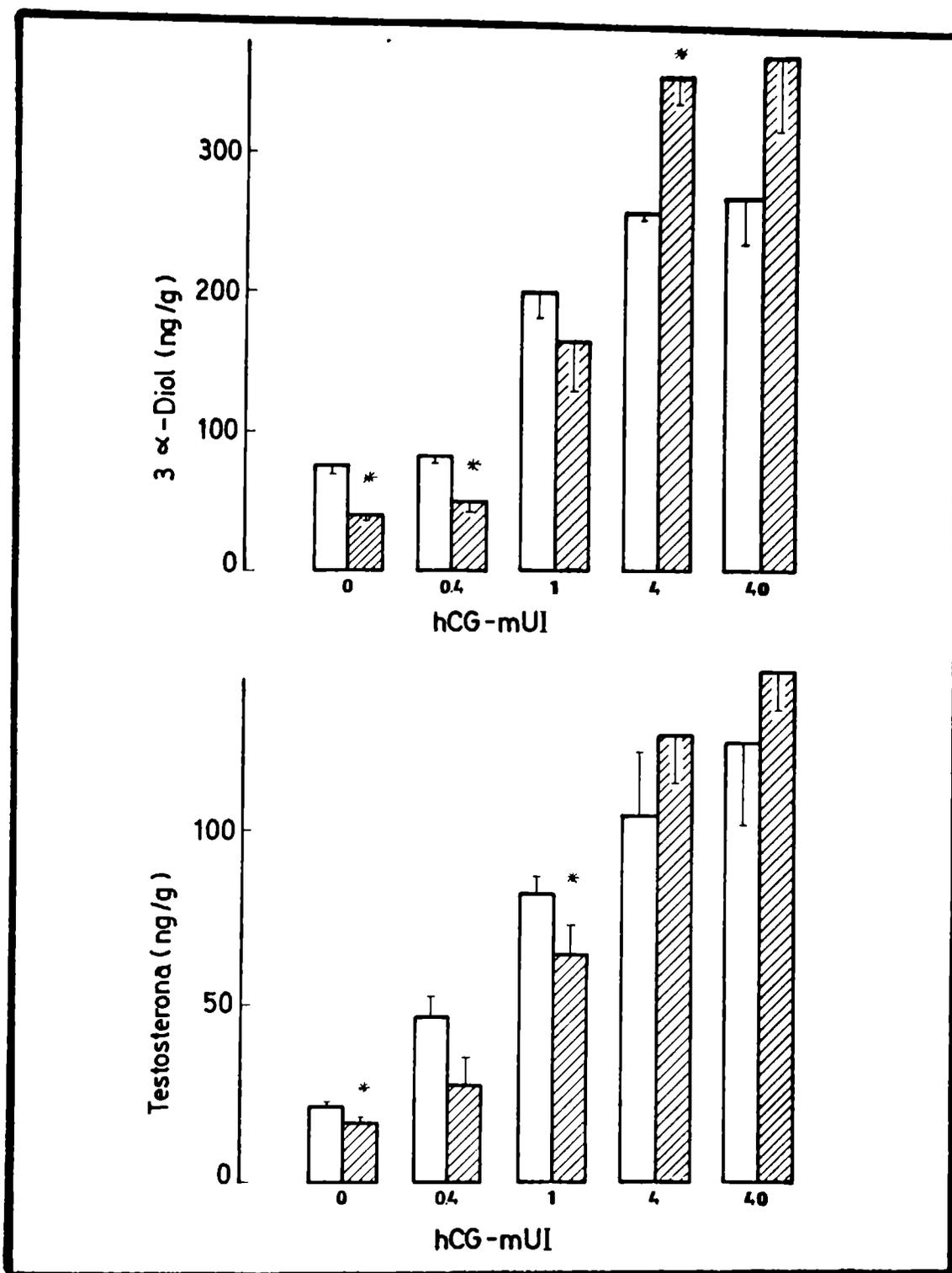


Figura 33.

Respuesta a la hCG "in vitro" para la producción de andrógenos por testículos enteros decapsulados provenientes de ratas tratadas con Br (3 mg/kg/peso/día) entre los 30 y 40 días de edad. Las barras abiertas corresponden al grupo control y las sombreadas al grupo tratado. Cada barra representa el valor medio \pm error estandar ($n = 3$). * Datos significativamente diferentes del control. ($p < 0.001$, en niveles basales para ambos andrógenos, y $p < 0.05$ para 0.4 y 1.0 mUI de hCG, test de Student).

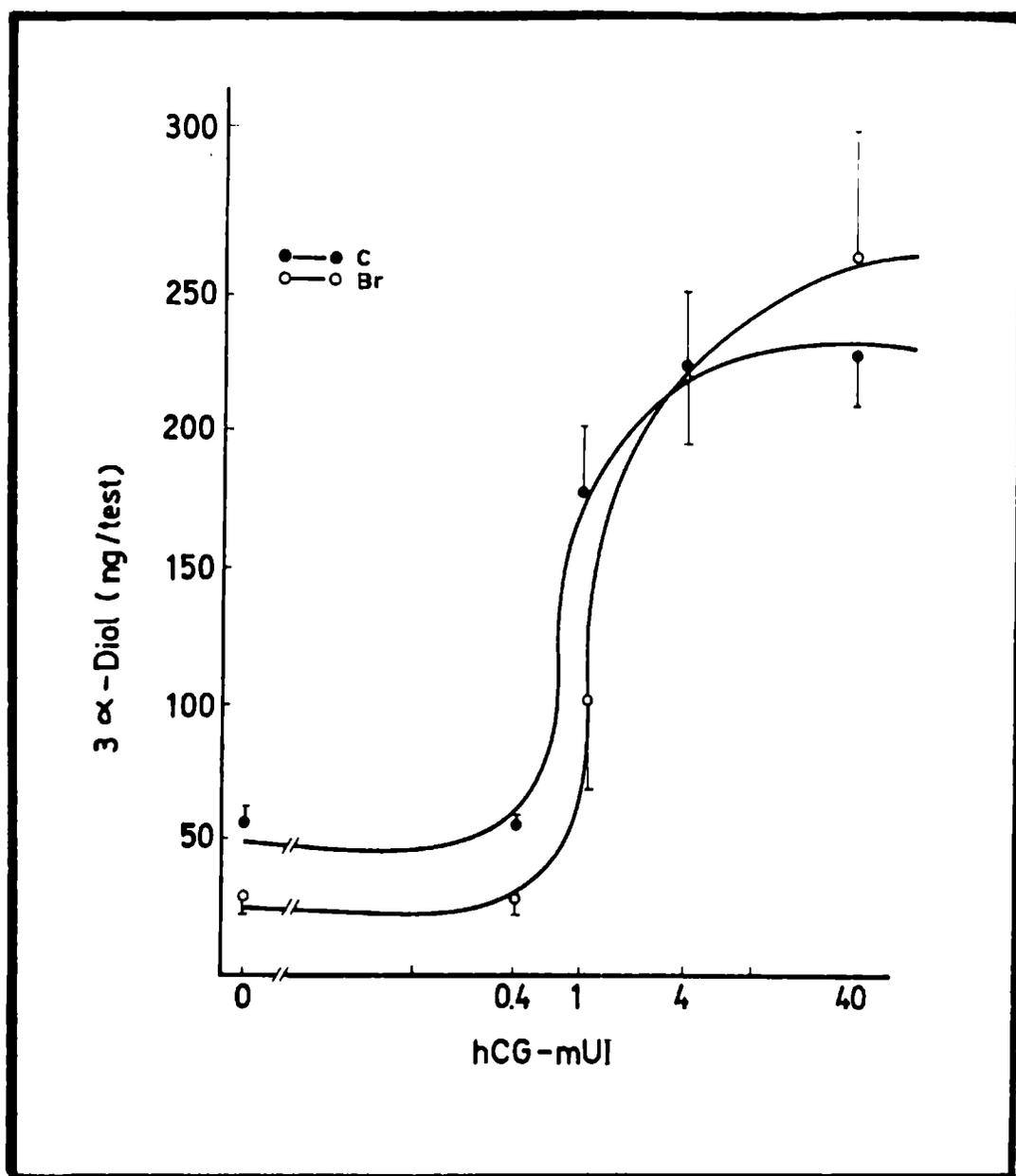


Figura 34.

Curva dosis-respuesta a la hCG "in vitro" para la producción de 3 α -Diol por testículos enteros decapsulados provenientes de ratas entre los 30 y 40 días de edad tratadas con: (●) vehículo; (○) 3 mg Br/kg peso/día. Cada punto representa el valor medio \pm error estandar (n = 3). La dosis efectiva 50 % (ED₅₀) para C resultó ser 0.7 mUI y para Br 1.4 mUI.

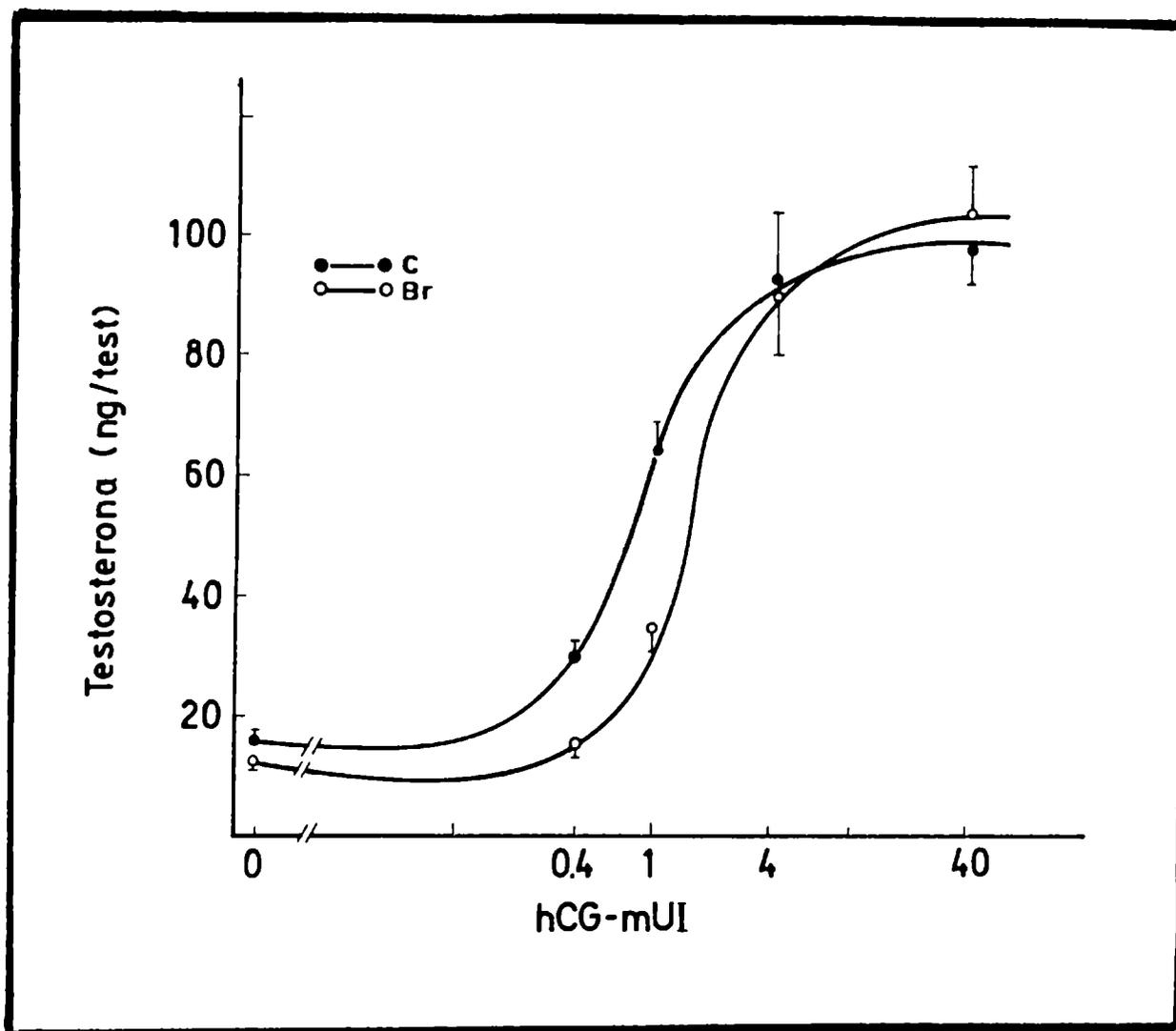


Figura 35.

Curva dosis-respuesta a la hCG "in vitro" para la producción de T por testículos decapsulados provenientes de ratas tratadas con: (●) vehículo; (○) 3 mg/Br/kg peso/día entre los 30 y 40 días de edad. Cada punto representa el valor medio \pm error estandar (n = 3).

prolactinémicos, los que producen también menor cantidad de andrógenos luego del estímulo con 0,4 y 1 mUI de hCG.

En condiciones de estímulo máximo (4 y 40 mUI de hCG) no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el hipoprolactinémico tanto en términos de producción de 3 α -Diol como de testosterona.

Al analizar la curva dosis respuesta para el 3 α -Diol (Figura 34) se pudo determinar que durante la hipoprolactinemia, si bien pudo alcanzarse una respuesta máxima, la dosis efectiva 50 (ED_{50}) se elevó 2,07 veces (157%) con respecto al control. La Figura 35 muestra la curva dosis respuesta para la testosterona, en este caso la ED_{50} aumentó 2,54 veces (154,7%). Los cambios observados indican una menor sensibilidad a la hCG en el grupo tratado con bromocriptina con respecto al control.

AMP CICLICO LIBERADO AL MEDIO DE INCUBACION.

En los mismos experimentos que fueron recientemente descritos, se estudió también la producción de AMPc "in vitro" basal y luego del estímulo con dosis crecientes de gonadotrofinas. La Figura 36 presenta la respuesta del AMPc en presencia de 0; 0.01; 1; 10 y 100 mUI de hCG cuando se incubaron testículos de animales controles y tratados con 3 mg/kg peso/día de bromocriptina durante 10 días. Como se puede observar los niveles de AMPc únicamente se estimularon con concentra-

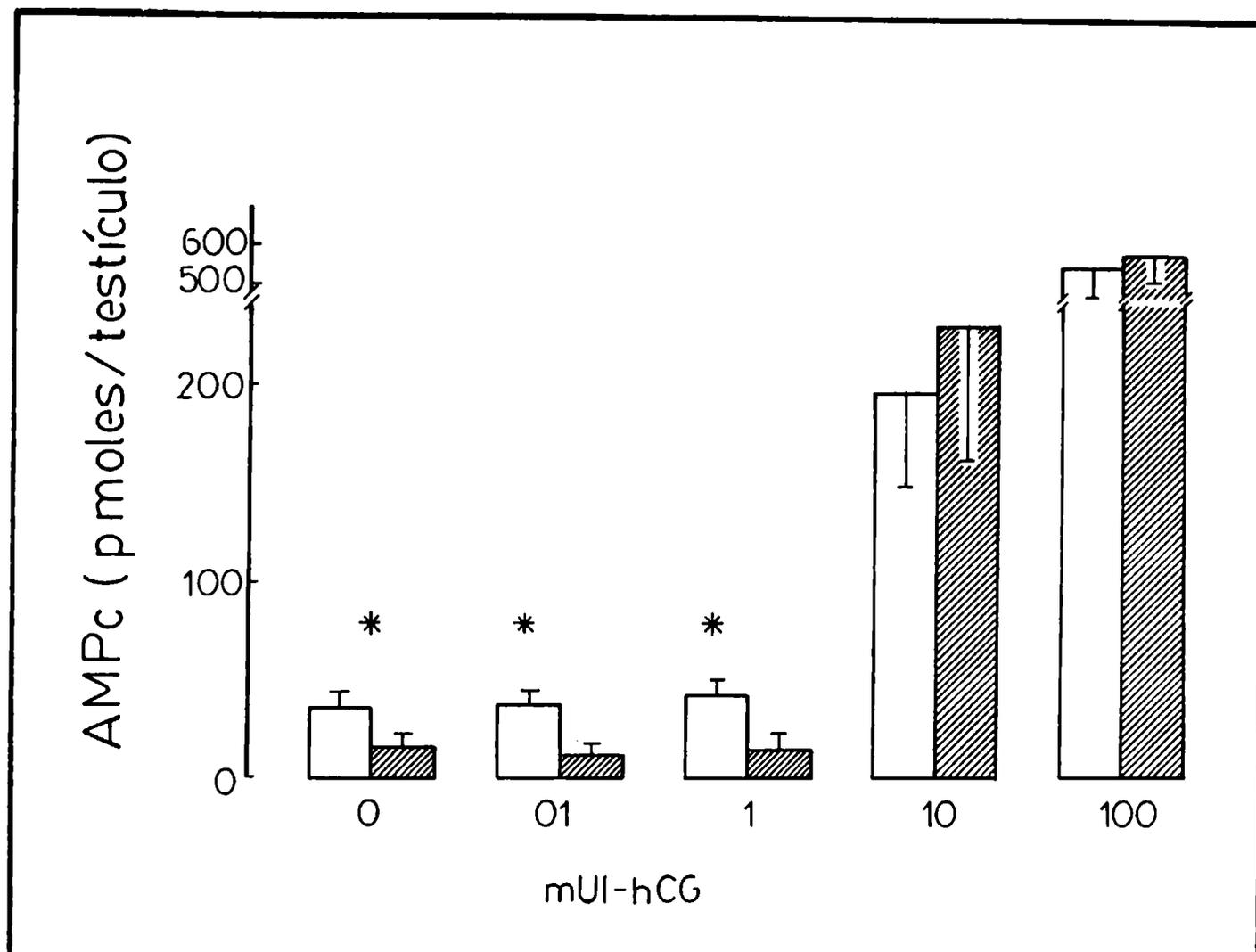


Figura 36.

Respuesta a la hCG "in vitro" para la producción de AMPc por testículos enteros decapsulados provenientes de ratas tratadas con Br (3 mg/kg peso/día) entre los 30 y 40 días de edad. Las barras abiertas corresponden al grupo control y las sombreadas al grupo tratado. Cada barra representa el valor medio \pm error standard (n = 3). * Datos significativamente diferentes del control ($p < 0.05$, test de Student).

ciones supramáximas de hCG.

Luego de 10 días de tratamiento, se observó una disminución en la producción basal de AMPc del 48%. Al incubar los testículos en presencia de 0,01; 0,1 y 1 mUI de hCG se observaron resultados muy semejantes a los obtenidos en condiciones basales. En presencia de 10 y 100 mUI de hCG pudo notarse un claro incremento en los niveles de AMPc liberado pero en ese caso no hubo diferencias estadísticamente significativas en el efecto observado para los dos grupos de animales en estudio.

Resultados muy similares fueron obtenidos al incubar testículos provenientes de animales tratados con las dos dosis menores de bromocriptina.

PRODUCCION DE ANDROGENOS "IN VITRO" POR CELULAS DE LEYDIG AISLADAS.

Todos los resultados expuestos en esta sección, obtenidos mediante la evaluación de diferentes parámetros, coinciden en sugerir una menor capacidad esteroidogénica durante la hipoprolactinemia inducida luego del tratamiento con bromocriptina. Con el propósito de investigar si dicha alteración expresaba un efecto particular en el sector intersticial del testículo, y teniendo en cuenta que Sharpe y col. (1980), describieron importantes diferencias funcionales en la respuesta a la hCG "in vitro" por testículos intactos o suspensiones de

células de Leydig aisladas, se decidió estudiar la producción de andrógenos "in vitro" por células de Leydig aisladas.

A partir de testículos de ratas controles e hipoprolactinémicas se obtuvo una preparación cruda de células de Leydig, mediante la digestión con colagenasa según se detalló en la sección de Materiales y Métodos.

En primer término se comprobó que en células obtenidas luego de la inducción de hipoprolactinemia no se modificaba la viabilidad de las células siendo, la misma siempre superior al 95% (técnica de exclusión por azul tripan).

En preparados celulares obtenidos a partir de ambos grupos de animales se investigó además la actividad de la enzima 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, que como ya se ha mencionado se halla predominantemente localizada en las células de Leydig. El porcentaje de células (3 β HSD) positivas obtenidas para varias colagenizaciones de testículos en ambos grupos de animales resultó entre 20 y 25%, no evidenciándose efectos especiales de la droga sobre el número de células teñidas.

Finalmente se estudió la producción de 3 α -Diol y testosterona "in vitro", basal y post-hCG en suspensiones de 10^6 células de Leydig.

En la Figura 37 se muestran los resultados obtenidos y cada barra representa el valor promedio de triplicados de

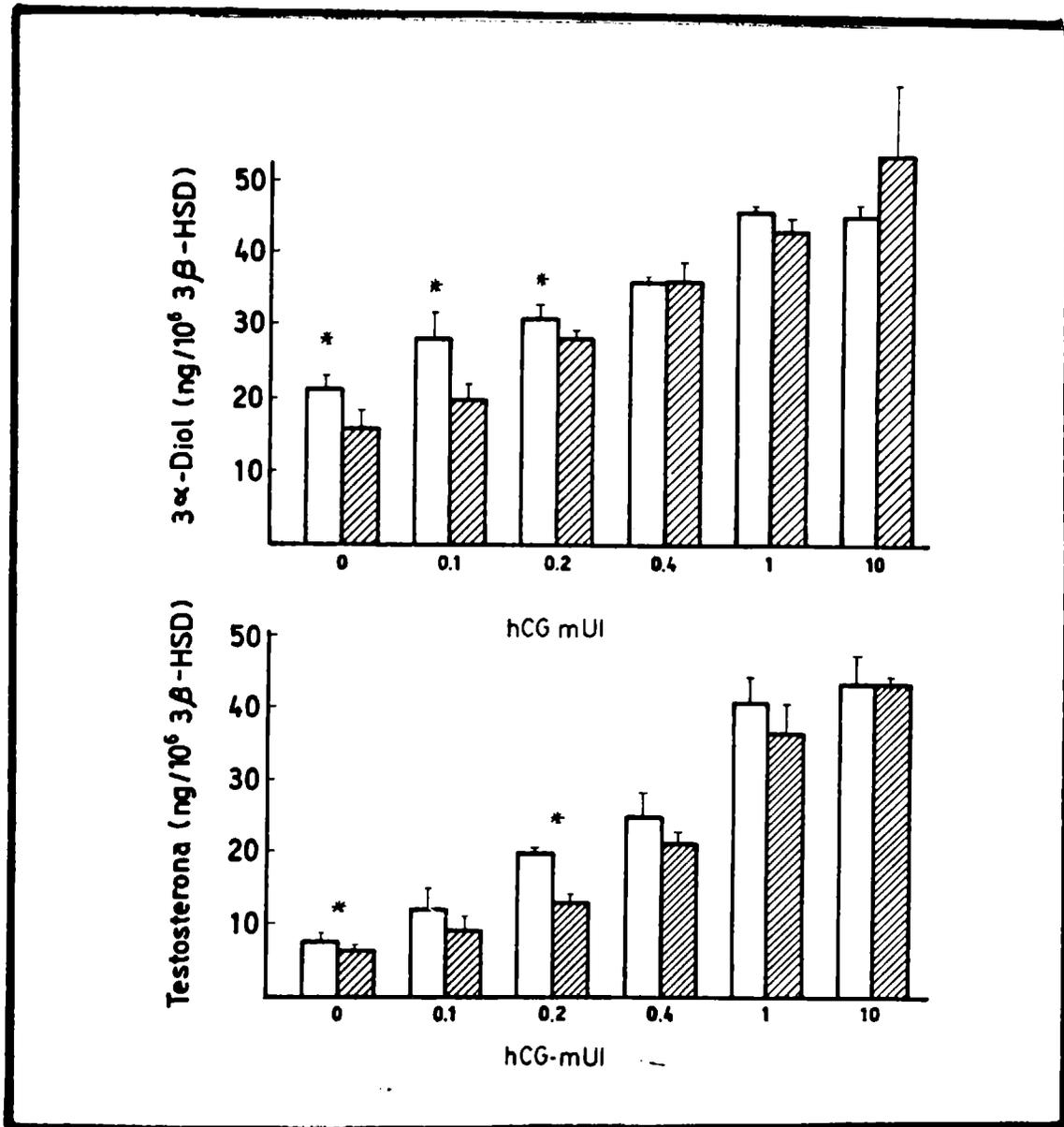


Figura 37.

Respuesta a la hCG "in vitro" para la producción de andrógenos por células intersticiales provenientes de ratas tratadas con Br (3 mg/kg peso/día) entre los 30 y 40 días de edad. Las barras abiertas corresponden al grupo control y las sombreadas al grupo tratado. Cada barra representa el valor medio \pm error estandar (n = 3). * Datos significativamente diferentes del control (p < 0.05, test de Student).

incubaciones de 2 pooles diferentes. La producción basal de 3α -Diol disminuyó significativamente en los animales hipoprolactinémicos con respecto a los controles, $21,9 \pm 3,1$ ng/ 10^6 cel. versus $16,1 \pm 2,35$ ng/ 10^6 células 3β HSD/3 hs, ($p < 0,05$). El mismo efecto fué observado para la testosterona producida, Grupo control: $7,5 \pm 0,55$ ng/ 10^6 cel.; grupo hipoprolactinémico: $5,5 \pm 0,7$ ng/ 10^6 cel. 3β HSD/3 hs de incubación ($p < 0.02$).

De manera semejante a lo observado para testículos enteros en este caso también se obtuvo una menor producción en ambos andrógenos en células provenientes de animales hipoprolactinémicos en presencia de concentraciones submáximas de hCG, mientras la capacidad esteroideogénica máxima no se alteró durante la hipoprolactinemia. Las ED_{50} calculadas para 3α -Diol y testosterona resultaron 2,48 (147%) y 1,73 (73,8) veces mas altas en el grupo hipoprolactinémico, lo que indicaría una menor sensibilidad a la gonadotrofina.

POSIBLES EFECTOS DIRECTOS DE
BROMOCRIPTINA Y PROLACTINA.

El conjunto de resultados descriptos indican que la inducción de una hipoprolactinemia, a través de la administración de bromocriptina durante un período de 10 días, a ratas macho en desarrollo (estadio juvenil a puberal temprano, Ojeda, 1980), es capaz de alterar la capacidad esteroidogénica en la gonada.

Los mecanismos a través de los cuales ocurre esta modificación podrían ser: 1) una modificación en los niveles de LH circulante; 2) un descenso en los niveles de PRL y 3) una acción directa de esta última hormona en el testículo. Resultados en relación a los puntos 1 y 2 se han presentado en las secciones previas. En relación al punto 3 pese a la existencia de sitios receptores específicos para PRL en la célula de Leydig un efecto directo de la hormona no ha podido ser determinado. Por otra parte, los resultados anteriormente presentados no permiten descartar una acción directa de bromocriptina sobre el testículo. Se decidió entonces en base a lo anteriormente expuesto, investigar la posibilidad de efectos directos de PRL y bromocriptina sobre el testículo, utilizando modelos que descarten una acción simultánea de manera sistémica.

EFEECTO LOCAL DE BROMOCRIPTINA.

Como ya se ha mencionado, la administración intratesticular de bromocriptina ($8 \times 10^{-5} \text{M}$) se realizó regularmente en el testículo derecho, mientras que en el contralateral se inyectó el vehículo en igual volumen (20 μl). Al cabo de 18 horas los animales se sacrificaron, los testículos se disecaron, y se determinó la producción "in vitro" de andrógenos en condiciones basales y luego del estímulo con hCG.

Tal como se muestra en la Figura 38, pudo observarse un significativo descenso en la producción basal de testosterona ($p < 0.05$) y en la respuesta a dosis submáximas de hCG (0.4 mUI, $p < 0.05$), mientras que la respuesta esteroideogénica máxima (10 mUI) no mostró diferencias entre el testículo inyectado con bromocriptina y su contralateral con vehículo.

Cuando se estudió el efecto de la incubación simultánea de suspensiones de células de Leydig aisladas y concentraciones crecientes de bromocriptina ($1 \times 10^{-9} - 10^{-5} \text{M}$), durante 3 horas a 34°C , sobre la producción de andrógenos basal y post-estímulo con hCG, se obtuvieron los resultados que representa la Figura 39. Como puede observarse, la bromocriptina en contacto con células de Leydig en las condiciones expuestas origina una disminución progresiva en la pro-

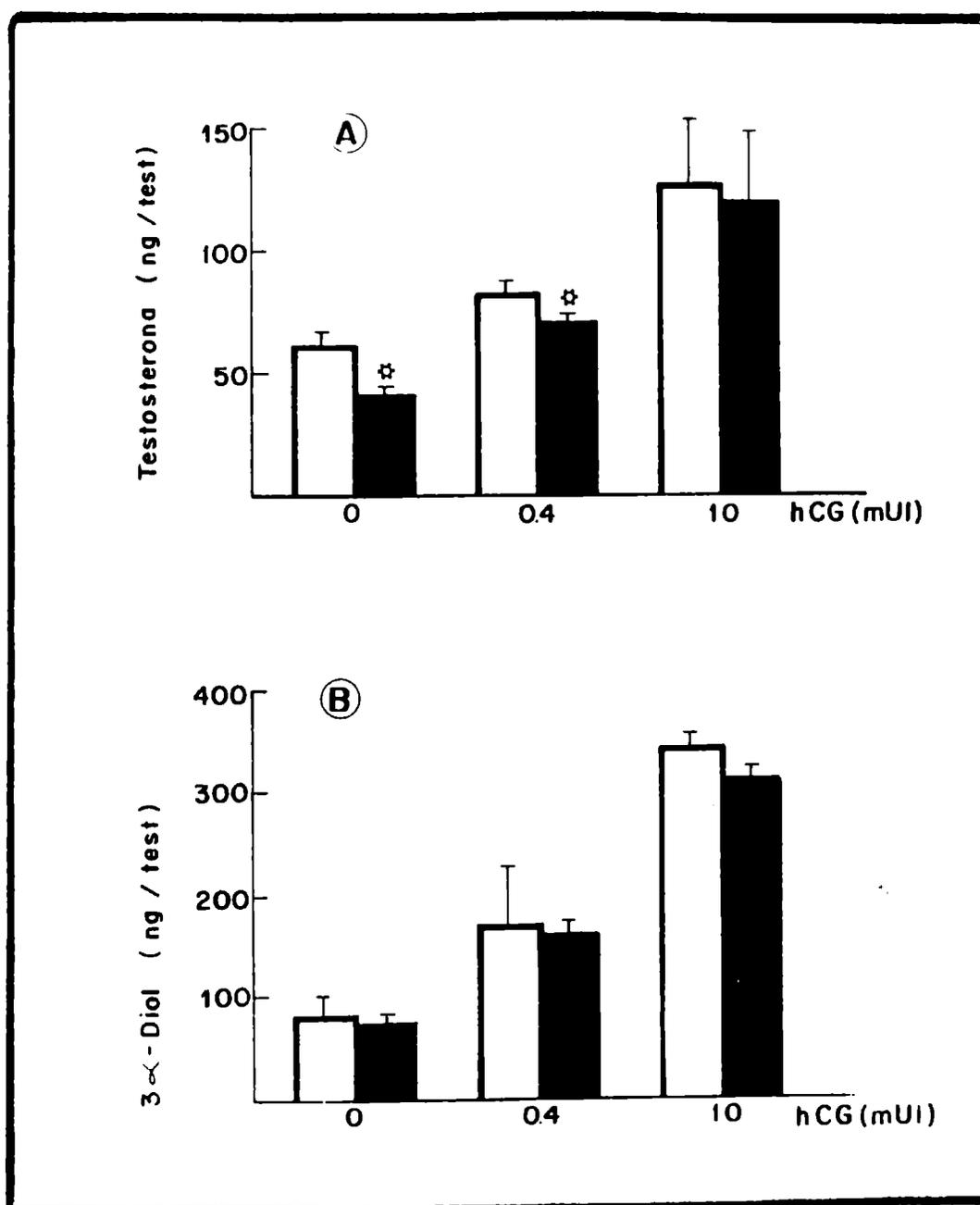


Figura 38.

Éfecto de la administración intratesticular de Br (10^{-5} M) sobre la respuesta a la hCG "in vitro" para la producción de (A): T; (B): 3 α -Diol por testículos enteros decapsulados (40 días de edad). Las barras abiertas corresponden a testículos controles inyectados con vehículo y las sombreadas a los contralaterales inyectados con Br. Cada barra representa el valor medio \pm error standard (n = 3). * Datos significativamente diferentes del control ($p < 0,05$, test de Student).

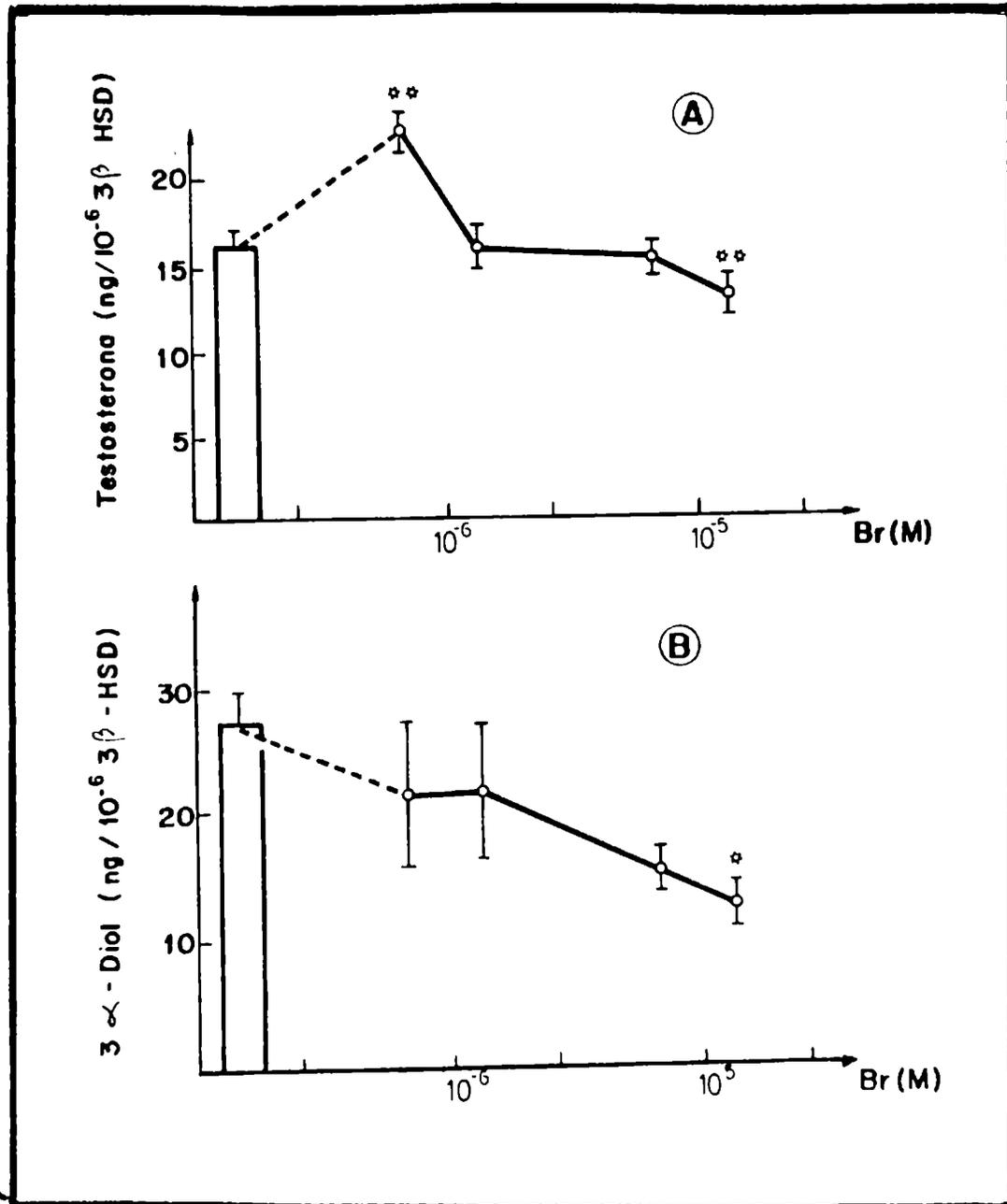


Figura 39.

Respuesta a distintas dosis de Br "in vitro" para la producción basal de (A): T y (B): 3α-Diol por células intersticiales provenientes de ratas de 40 días de edad. Cada punto representa el valor medio \pm error estandar (n = 6). Datos significativamente diferentes del control: *: p < 0.05; **: p < 0.02, test de Student).

ducción basal tanto de testosterona como de 3α -Diol. El efecto resultó estadísticamente significativo en presencia de $1,3 \times 10^{-5}$ M de la droga y los resultados obtenidos de triplicados de incubación fueron: 3α -Diol $5,43 \pm 1,24$ ng/ 10^6 células versus $2,57 \pm 0,1$ ng/ 10^6 3β -HSD/3 horas ($p < 0.05$) testosterona, $3,25 \pm 0,13$ versus $2,71 \pm 0,36$ ng/ 10^6 3β -HSD/3 horas ($p < 0,05$).

Cuando se evaluó la capacidad de respuesta de las células de Leydig, en presencia de dos concentraciones diferentes de bromocriptina ($2,5$ y 5×10^{-5} M), se observó una menor tendencia en la respuesta de ambos andrógenos al estímulo con $0,25$ y 100 mUI de hCG, resultando significativa estadísticamente la de 3α -Diol post-estímulo máximo con hCG (Figura 40).

Los resultados presentados hasta aquí, indican que tanto en experiencias "in vivo" como "in vitro", la bromocriptina disminuye la producción de andrógenos testiculares. Sin embargo, al incubar testículos decapsulados con concentraciones crecientes de bromocriptina ($1,3 \times 10^{-9}$ a 10^{-5} M) se observó un efecto algo diferente que se ilustra en las Figuras 41 y 42. Como se puede observar, la producción basal de ambos andrógenos resultó incrementada en presencia del neurofármaco. El análisis de los datos mediante el test de Student apareado mostró que los cambios eran significati-

vos para 3 α -Diol en presencia de $1,3 \times 10^{-7}$ M de bromocriptina ($p < 0.05$) y para testosterona con $1,3 \times 10^{-5}$ M de la droga ($p < 0,05$).

Cuando los testículos fueron estimulados con dosis submáximas de hCG y coincubados con bromocriptina el incremento resultó significativo para 3 α -Diol y testosterona en presencia de $1,3 \times 10^{-5}$, $1,3 \times 10^{-6}$ y $1,3 \times 10^{-7}$ M de la droga ($p < 0.05$).

Por el contrario, luego de un estímulo máximo con hCG, se observó como en el caso de las suspensiones celulares, una inhibición en la producción de ambos andrógenos gonadales, que resultaron entre 15 y 20 % más bajas. El descenso resultó estadísticamente significativo para testosterona y 3 α -Diol en presencia de $1,3 \times 10^{-7}$ M y $1,3 \times 10^{-6}$ M de bromocriptina.

EFEECTO LOCAL DE LA PRL.

La incubación de testículos decapsulados en presencia de distintas concentraciones de PRL (5×10^{-7} y 5×10^{-6} M) durante 3 hs a 34°C, originó un incremento estadísticamente significativo en la producción basal de ambos andrógenos estudiados. En presencia de 5×10^{-6} M de PRL este aumento también resultó ser significativo para 3 α -Diol al estimularse con 0.5 y 100 mUI de hCG (Figura 43 y 44).

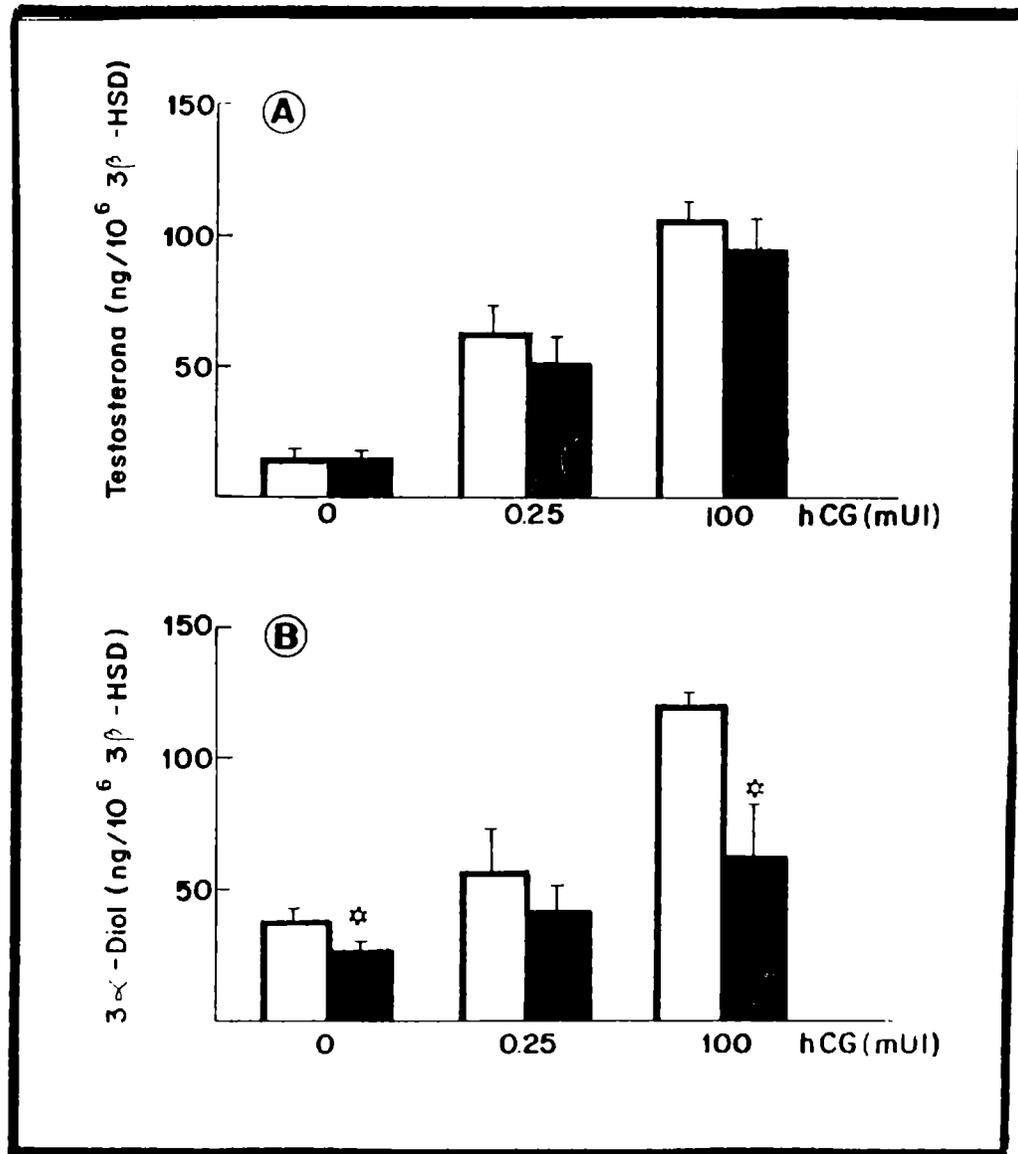


Figura 40.

Respuesta a Br (5×10^{-5} M) "in vitro" para la producción de (A): T; (B): 3 α -Diol, basal y estimulada con hCG por células intersticiales provenientes de ratas de 40 días de edad. Las barras abiertas corresponden a las suspensiones celulares controles y las sombreadas a los incubados con Br. Cada barra representa el valor medio \pm error estandar (n = 6). *Datos significativamente diferentes del control (p < 0.02, test de Student).

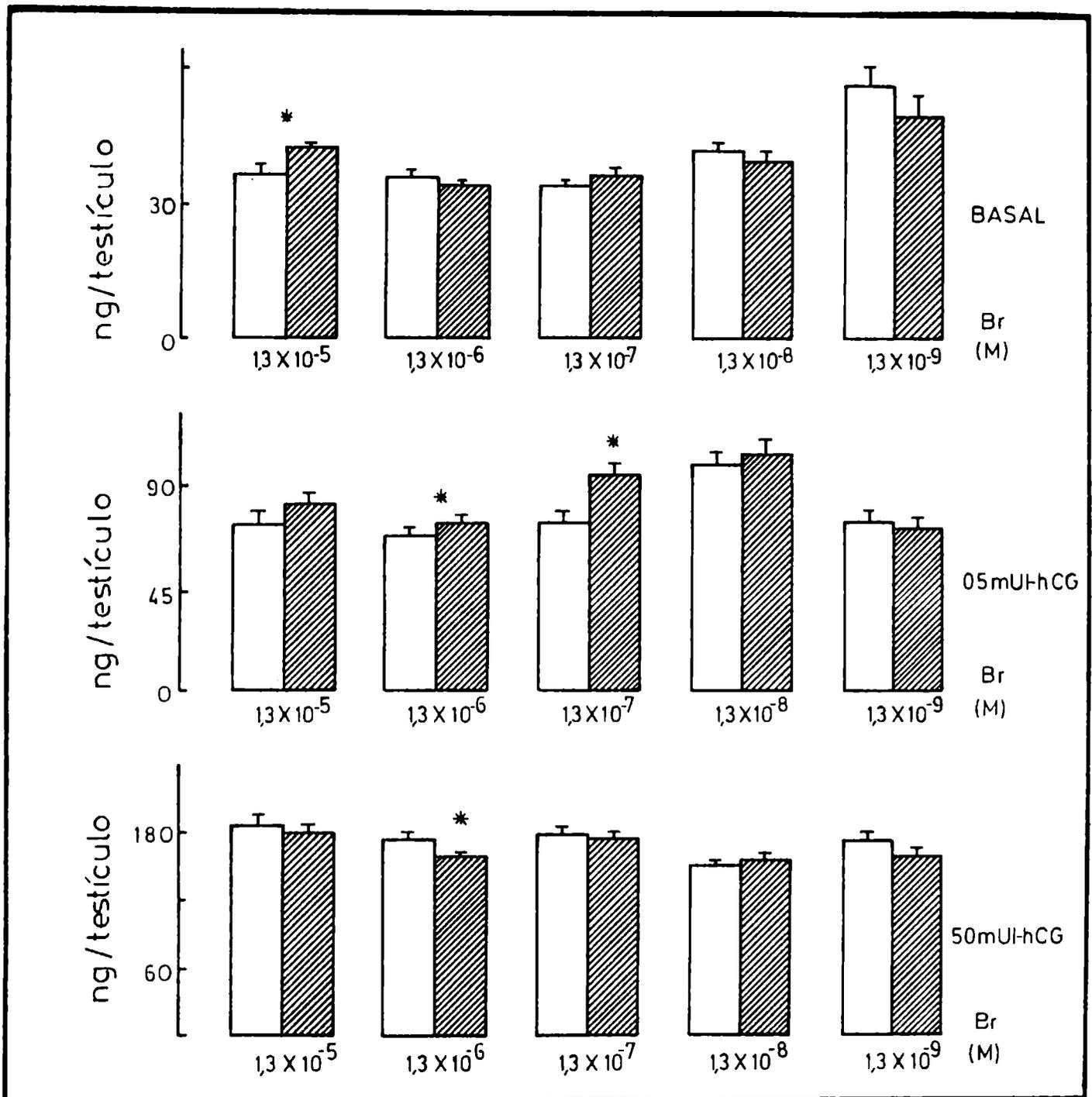


Figura 41.

Respuesta a distintas dosis de Br "in vitro" para la producción de T basal y estimulada con hCG por testículos enteros decapsulados provenientes de ratas de 40 días de edad. Las barras abiertas corresponden a los testículos controles y las sombreadas a los incubados con Br. Cada barra representa el valor medio \pm error estandar (n = 4). * Datos significativamente diferentes del control ($p < 0.05$, test de Student apareado).

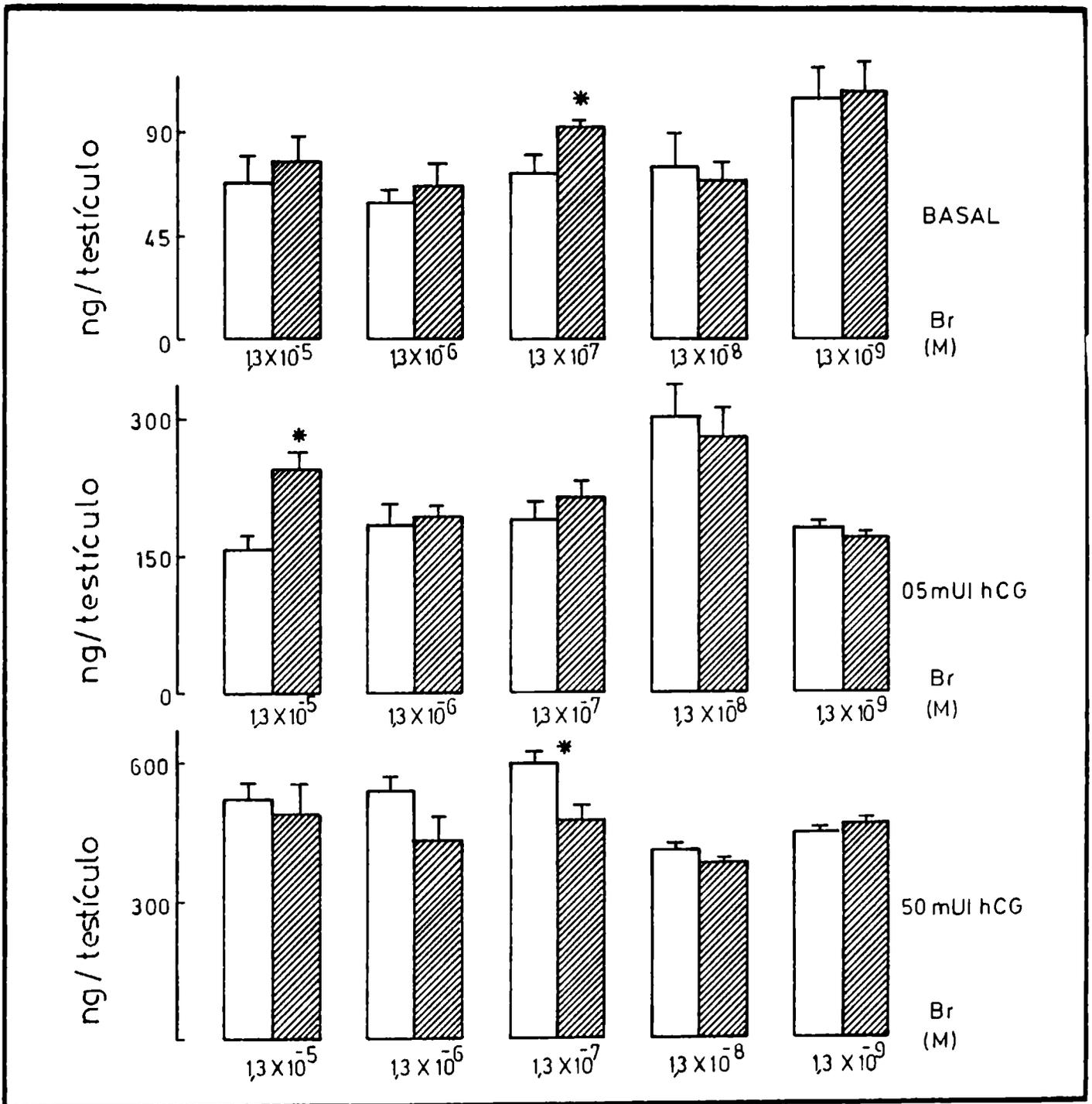


Figura 42.

Respuesta a distintas dosis de Br "in vitro" para la producción de 3α -Diol basal y estimulada con hCG por testículos enteros decapsulados provenientes de ratas de 40 días de edad. Las barras abiertas corresponden a los testículos controles y las sombreadas a los incubados con Br. Cada barra representa el valor medio \pm error estandar (n = 4). *Datos significativamente diferentes del control (p < 0.05, test de Student apareado).

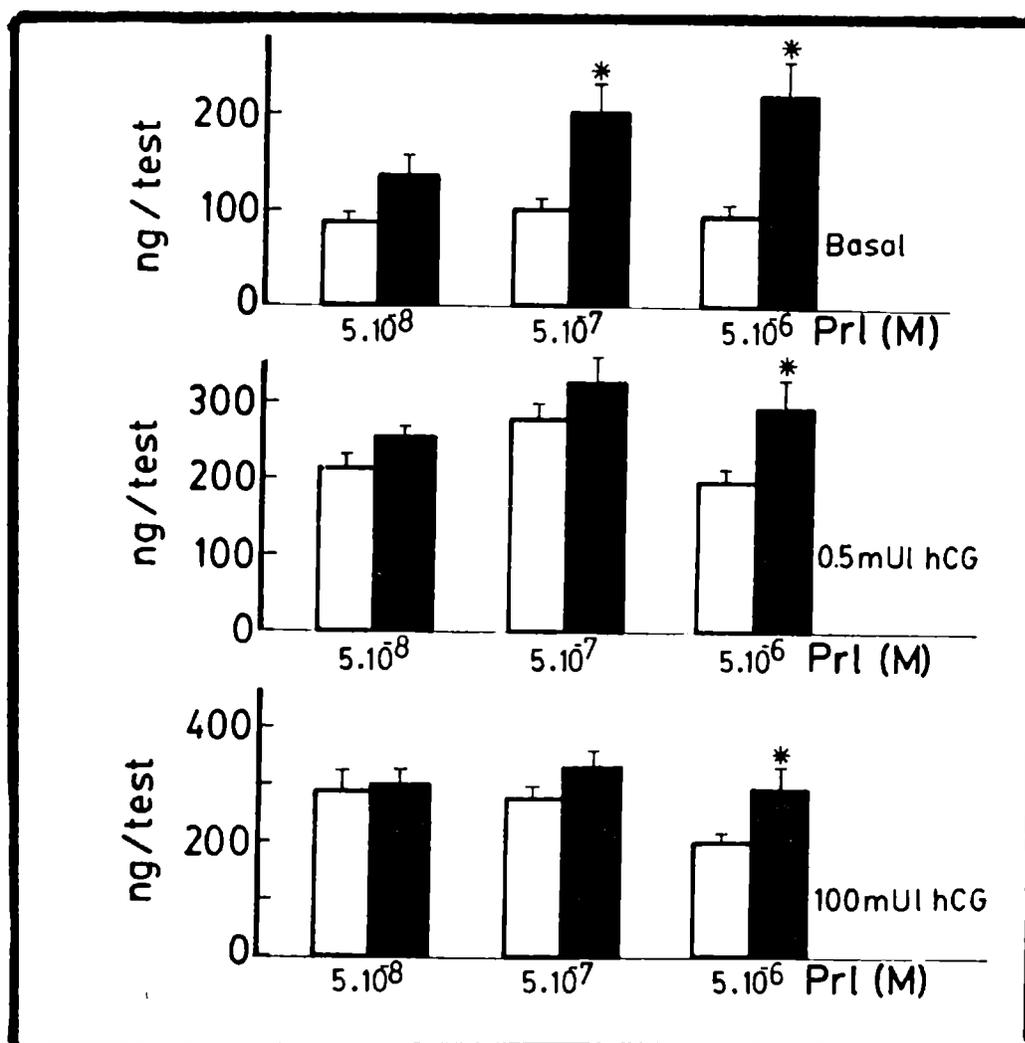


Figura 43.

Respuesta a distintas dosis de PRL "in vitro" para la producción de 3α -Diol basal y estimulada con hCG por testículos enteros decapsulados provenientes de ratas con 40 días de edad. Las barras abiertas corresponden a los testículos controles y las sombreadas a los incubados con PRL. Cada barra representa el valor medio \pm error estandar (n = 6). * Datos significativamente diferentes del control (p < 0.05, test de Student).

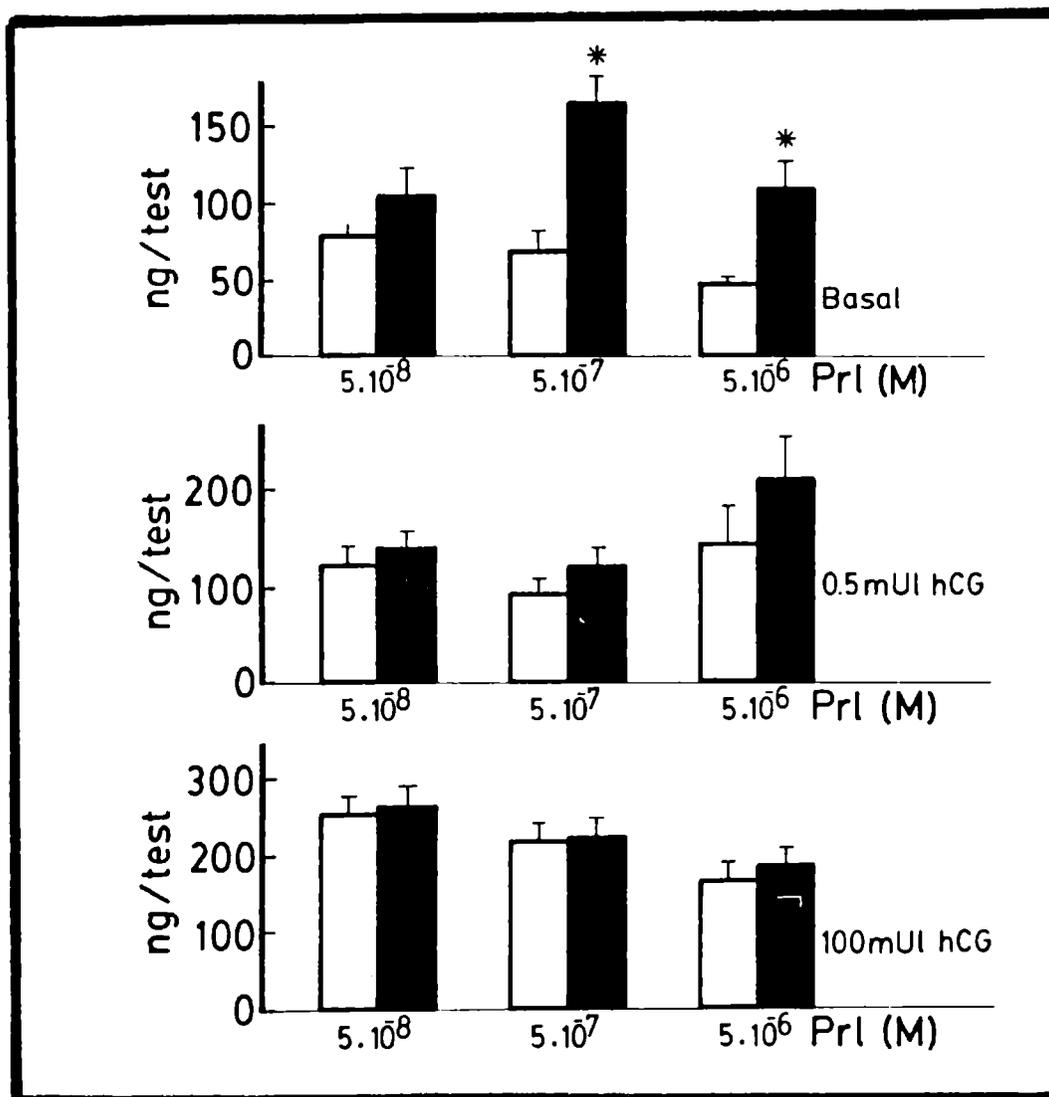


Figura 44.

Respuesta a distintas dosis de PRL "in vitro" para la producción de T basal y estimulada con hCG por testículos enteros decapsulados provenientes de ratas de 40 días de edad. Las barras abiertas corresponden a los testículos controles y las sombreadas a los incubados con PRL. Cada barra representa el valor medio \pm error estandar (n = 6). * Datos significativamente diferentes del control (p < 0.05, test de Student).

Cuando se estudió el efecto de la incubación simultánea de suspensiones de células de Leydig aisladas y concentraciones crecientes de PRL (5×10^{-8} - 5×10^{-6} M), durante 3 hs. a 34°C sobre la producción de andrógenos basal y post-estímulo con hCG, se obtuvieron los resultados que representa la Figura 45. Como puede observarse, la PRL originó un incremento tipo dosis-respuesta en la producción basal de 3α -Diol y testosterona, con una dosis efectiva 50% (ED₅₀) igual a 3×10^{-8} M.

Al analizar la capacidad de respuesta de las células de Leydig a dosis submáximas de hCG (0.25 mUI) luego de coincubar con la concentración mínima de PRL capaz de incrementar la producción basal de andrógenos, se halló un aumento en la producción de 3α -Diol y testosterona del orden de 80 y 90 % respectivamente (Figura 46).

La utilización de PRL-r en incubaciones de células de Leydig aisladas, mostró resultados muy similares.

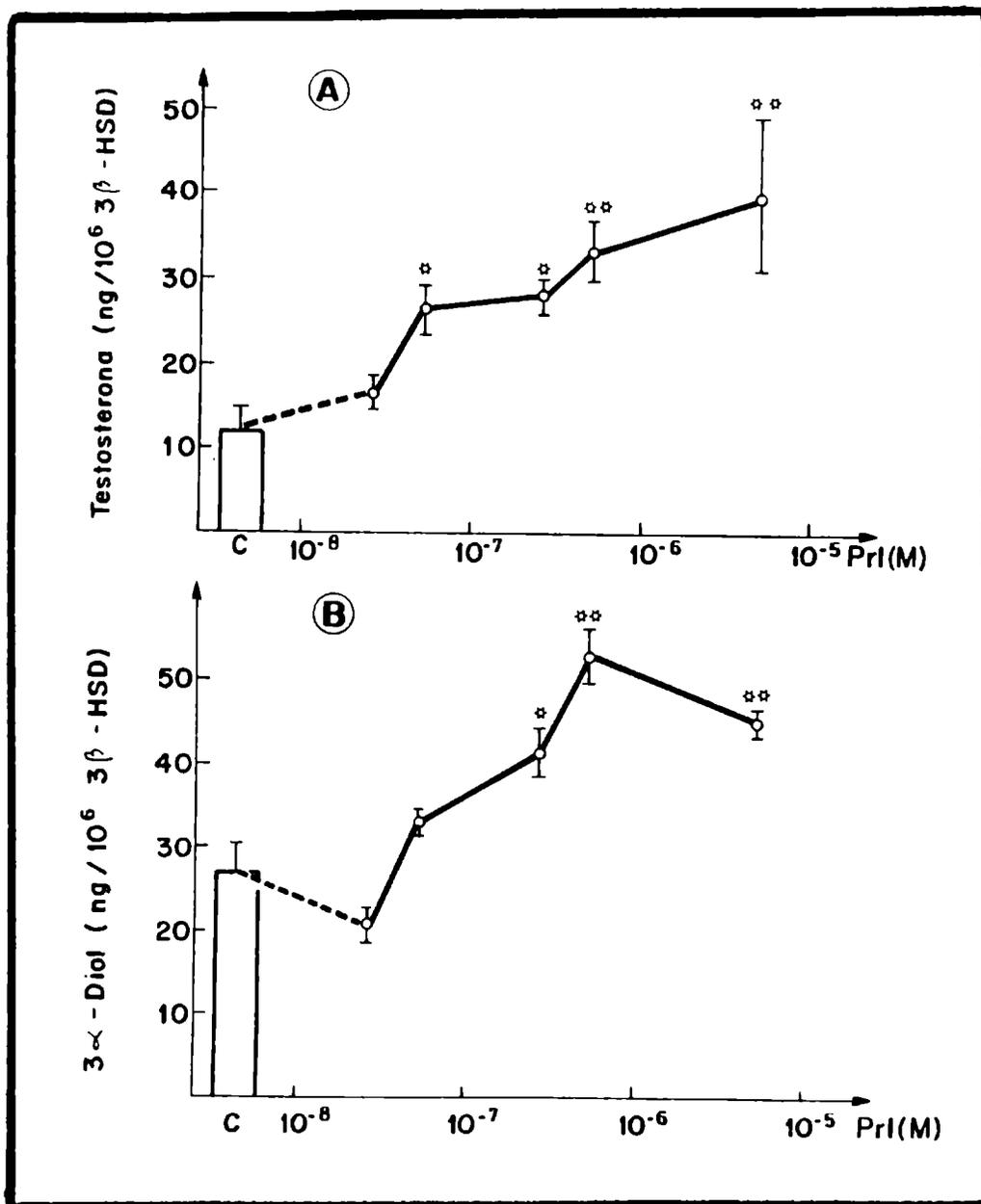


Figura 45.

Respuesta a distintas dosis de PRL "in vitro" para la producción basal de (A): T y (B): 3 α -Diol, por células intersticiales provenientes de ratas de 40 días de edad. Cada punto representa el valor medio \pm error estandar (n = 3). Datos significativamente diferentes del control: *: p < 0.05; **: p < 0.02, test de Student.

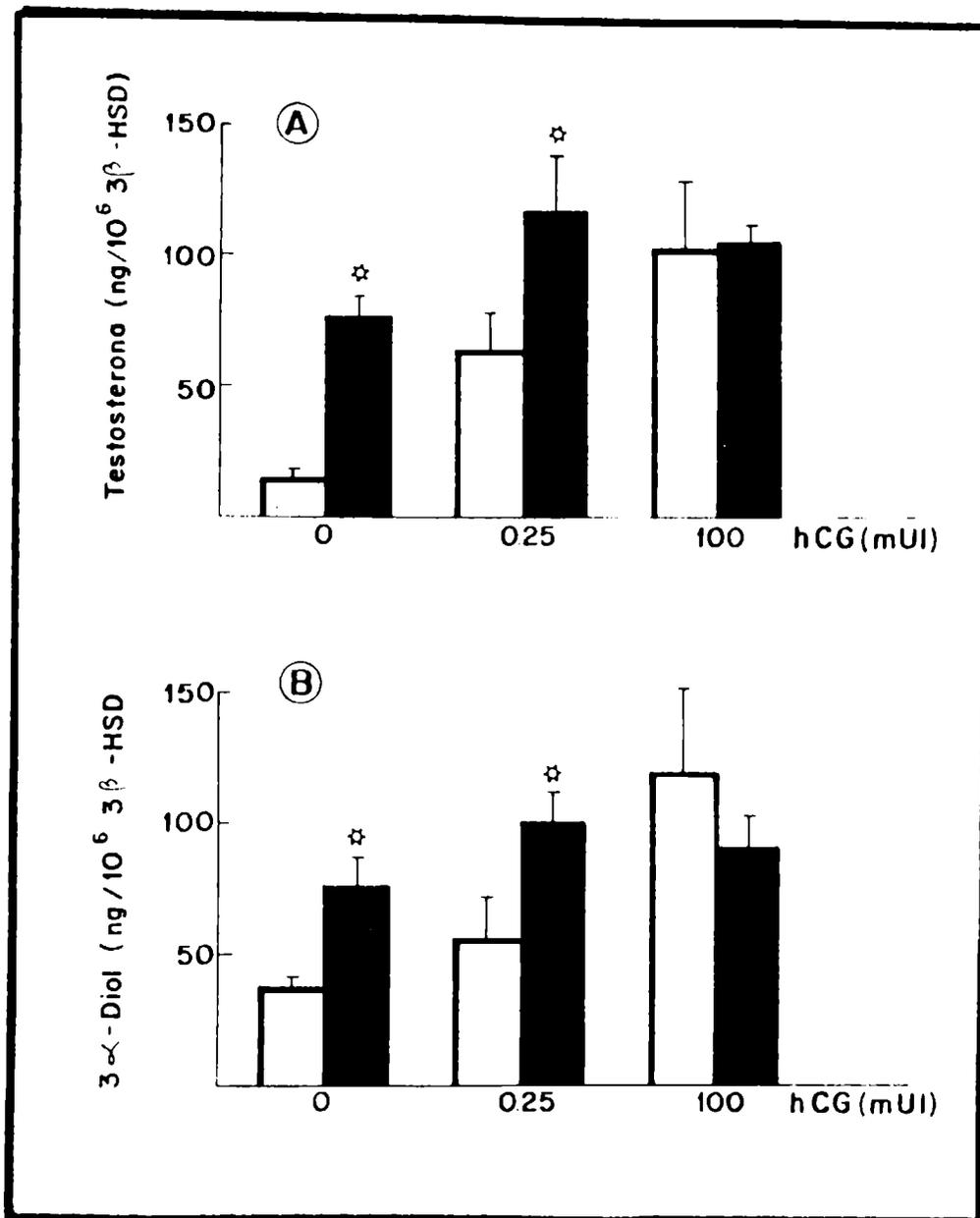


Figura 46.

Respuesta a PRL (5×10^{-8} M) "in vitro" para la producción de (A): T y (B): 3 α -Diol basal y estimulada con hCG por células intersticiales provenientes de ratas de 40 días de edad. Las barras abiertas corresponden a las suspensiones celulares controles y las sombreadas a las incubadas con PRL. Cada barra representa el valor medio \pm error estandar (n = 3). * Datos significativamente diferentes del control.

DISCUSSION II

En esta segunda sección se discutirán los efectos de un descenso en los niveles de PRL sobre el eje hipófiso gonadal durante la maduración sexual en la rata. Se ha establecido que el sistema dopaminérgico hipotalámico ejerce un control inhibitorio sobre la liberación de PRL (Meites y col., 1972) y que este sistema además se halla presente desde la vida fetal (Gluckman y col., 1979).

Con el propósito de inducir un descenso marcado en la PRL circulante se utilizó un neurofármaco con reconocida actividad dopaminérgica. Así, se decidió estudiar la importancia de la prolactina sobre la función sexual, inhibiendo de manera selectiva la síntesis y secreción de esta hormona durante un período crítico del desarrollo.

Las tres diferentes dosis de bromocriptina utilizadas, llevaron los niveles de PRL sérica a valores por debajo del límite de detección del ensayo. Esta hipoprolactinemia no se acompañó en ningún caso de un cambio paralelo en los niveles de LH sérica. Previamente, diferentes grupos de investigadores habían documentado respuestas similares a la bromocriptina en relación a modificaciones en las concentraciones de PRL y LH (Purvis y col., 1979; Waeber y col., 1983).

Cabe destacar además que si bien en este estudio no se midieron los niveles de FSH séricos, de acuerdo a Gil-

Ad y col. (1980) y Doherty y col. (1980), el descenso en la PRL sérica inducida por bromocriptina no modifica los niveles circulantes de FSH.

Por otra parte, la involución en el peso de los testículos y epidídimos originada en los animales por la administración de las diferentes dosis de la droga, concuerda con lo obtenido por Barañao y col. (1981) utilizando sólo la dosis más elevada. Harper y col. (1976) trabajando con ratas adultas no hallaron cambio alguno en el peso gonadal y prostático luego de la administración de bromocriptina. Debe sin embargo señalarse, que a esta edad ha sido demostrado que los animales son menos sensible a variaciones en los niveles de PRL(Negro Vilar y col., 1977).

Se observó además que el tratamiento de ratas normales con 3 mg de bromocriptina/kg día, durante 10 días reduce los niveles plasmáticos de 3 α -Diol y de testosterona + DHT, y que dicho efecto es también observado al disminuir la dosis a la mitad o a la cuarta parte. Debe señalarse que existe controversia con respecto al efecto de la hipoprolactinemia sobre los niveles séricos de andrógenos. Por un lado Bartke y col. (1973) y Barañao y col. (1981), coinciden en referir una disminución en los niveles de andrógenos séricos post-tratamiento con bromocriptina, mientras que Huthaniemi y col. (1981) y Waeber y col. (1983) no encuen-

tran cambios en la concentración de testosterona sérica durante la caída de la PRL circulante. Es oportuno recordar al respecto, que Kovacevic y col. (1982) en un mismo trabajo mostraron estimulación, no variación y aún disminución de la concentración de testosterona + DHT sérica, como respuesta a la administración de bromocriptina (3 mg/kg peso/día) dependiendo de la edad de la rata en el momento en que se realiza el estudio.

Se analizaron también las concentraciones tisulares de andrógenos y de estos estudios surgió primeramente que en ratas normales de 40 días de edad, la concentración intratesticular de 3α -Diol supera a la de DHT y testosterona e incluso a la suma de ambas. Los valores presentados son semejantes a los publicados previamente por Corpechot y col. (1980). No obstante, algunas diferencias observadas en las concentraciones de testosterona podrían adjudicarse a características propias de la cepa de ratas utilizadas.

El tratamiento con bromocriptina mostró una disminución en la concentración (ng/g) intratesticular de testosterona, DHT y 3α -Diol, así como también en su contenido (ng/testículo). Estos cambios fueron más importantes al evaluar las concentraciones en cada uno de los testículos por separado y expresar los resultados en función del peso real de cada uno. El descenso observado en los niveles séri-

cos de andrógenos luego de la hipoprolactinemia fué probablemente en parte reflejo de cambios similares aunque mucho más discretos en las concentraciones intratesticulares de andrógeno.

En relación al epidídimo, únicamente se evaluaron las concentraciones de testosterona y DHT y los resultados obtenidos mostraron que en la rata de 40 días predominan los niveles de DHT sobre los de testosterona, hecho que coincide con observaciones previas de Pujol y col. (1976), Purvis y col. (1978) y Larminat y col. (1981). Orgebin Crist, y col. (1976) describieron la presencia de sitios receptores para PRL en el epidídimo del conejo. En la rata el epidídimo no ha sido considerado como órgano blanco para dicha hormona. En apoyo de esta idea no se detectaron diferencias en la concentración o el contenido de andrógenos en el tejido epididimario, como consecuencia de la inducción de hipoprolactinemia por bromocriptina. Este hecho sugiere que si existiera un efecto de prolactina en el epidídimo este no estaría involucrado en la regulación del contenido de andrógenos.

Al examinar los andrógenos producidos en incubaciones de testículos decapsulados se observó un neto predominio del 3 α -Diol. Estos hallazgos son consistentes con trabajos previos que muestran que el 3 α -Diol es el mayor producto liberado durante la incubación de testículos provenientes

de animales inmaduros (Lacroix y col., 1975).

Cuando se compararon los diferentes grupos experimentales se observó una disminución en la respuesta "in vitro" basal de 3α -Diol y testosterona por testículos enteros provenientes de animales hipoprolactinémicos con respecto al control. Al estimular los testículos con dosis submáximas de hCG se puso de manifiesto un efecto muy similar. No obstante, en presencia de cantidades supramáximas de la gonadotrofina, las respuestas fueron levemente aumentadas en el grupo hipoprolactinémico cuando los resultados se expresaron en ng/g de testículo, y más aún en el caso de considerar los resultados en términos de porcentajes de estímulo.

Debido a la involución observada en el peso de la gonada como consecuencia del tratamiento, los resultados se expresaron también en función del peso de cada testículo y en este caso no se detectaron diferencias entre los grupos en la capacidad esteroidogénica máxima.

El incremento observado en el grupo hipoprolactinémico al expresar los resultados como porcentaje de estímulo podría estar influenciado por los niveles basales de los diferentes grupos experimentales. En este caso en particular, la baja producción basal observada luego del tratamiento puede en forma aparente exagerar la respuesta del testículo

"in vitro". Por consiguiente, consideramos que cuando se utilizan este tipo de tratamientos que modifica el peso de la gonada, la expresión de los resultados por órgano es la más adecuada para evaluar la función testicular.

La sensibilidad de la célula de Leydig y por lo tanto del órgano a la estimulación con hCG está determinada por la probabilidad de la interacción LH/hCG-receptor, que a su vez depende de la concentración de LH y del número de receptores específicos para la hormona. En la célula de Leydig hay un exceso de receptores para LH en función del número requerido para producir una respuesta esteroidogénica máxima (Catt y col., 1973). Esta última puede ser inducida con la ocupación de un número de sitios receptores menor del 1%. Una de las explicaciones posibles referentes a la existencia de este número de receptores en exceso sería proveer una mayor sensibilidad de la célula intersticial a la LH ya que la presencia de este gran exceso de sitios receptores favorecería la formación del complejo hormona-receptor.

Como se mencionó anteriormente la producción basal de andrógenos "in vitro" en el grupo de animales hipoprolactinémicos estuvo descendida; estos resultados son consistentes con los andrógenos séricos bajos observados en dicho grupo. Considerando además que los niveles circulantes de LH permanecieron normales, podría entonces concluirse que

la disminución observada en los niveles de andrógenos circulantes y en la producción basal "in vitro" post hipoprolactinemia se deben a un menor grado de estímulo del órgano por disminución del número de sitios receptores para LH/hCG. En concordancia con esta última postulación, se ha descrito que la hipoprolactinemia por administración de bromocriptina origina un descenso en el número de receptores para LH (Mc Neilly col., 1979; Calandra y col., 1982; Kolena y col., 1983) en las células intersticiales.

Paralelamente, en el presente trabajo demostramos una menor liberación de AMPc al medio de incubación en condiciones basales y bajo estímulo submáximo con hCG luego de la inducción de hipoprolactinemia.

Al analizar las diferentes curvas dosis respuesta de andrógenos a la hCG en incubaciones de testículo total y células aisladas provenientes de los diferentes grupos experimentales, se pudo comprobar una sensibilidad a la gonadotropina entre 2 y 3 veces menor como respuesta al tratamiento con bromocriptina.

La producción esteroideogénica máxima en respuesta a la hCG no se modificó, hecho que es compatible con el descenso en los receptores de LH/hCG, ya que como se mencionó en párrafos anteriores, sólo es necesaria una mínima ocupación de los mismos para producir dicha respuesta.

En este estudio se halló además que la inducción de hipoprolactinemia no afecta la proporción de células de Leydig viables obtenidas por digestión con colagenasa. Cabe destacar, que a partir de esta suspensión de células se detectó un tipo de respuesta que coincidió plenamente con la observada en incubaciones de testículos enteros. Con relación a estas últimas observaciones existen algunas discrepancias entre los datos presentes y los obtenidos por diferentes autores utilizando sistemas de estudio semejantes.

Así, en ratas adultas tratadas con bromocriptina durante 2 u 8 días, Huthaniemi y col. (1981), no observaron cambios relacionados al descenso en la PRL sérica con la producción basal y luego de un estímulo máximo con hCG en células de Leydig en suspensión. Por otra parte, Waeber y col. (1983) usando células intersticiales purificadas (población II), mostraron que testículos de ratas adultas tratadas con el agonista dopaminérgico durante 4 días o 4 semanas, presentaban una secreción basal de testosterona y post-estímulo con hCG similar a la de ratas controles. Es posible que las discrepancias entre nuestros resultados y aquellos citados en la literatura puedan ser debidas a las diferentes edades de los animales utilizados, dado que la PRL, al menos en ratas, parece, ejercer un cierto papel durante el desarrollo sexual. En apoyo de esta hipótesis, se ha descripto

que el tratamiento con bromocriptina induce en ratas de 30 días de edad una reducción significativa en la respuesta a la hCG de los andrógenos 17 β -hidroxilados (Purvis y col., 1979) y en la actividad de la enzima Δ_4 -5 α -reductasa en túbulos seminíferos (Baraño y col., 1981).

En conclusión todos estos resultados tomados en conjunto indican que la administración de bromocriptina "in vivo" origina alteraciones significativas en la esteroidogénesis testicular en ratas prepuberales.

Además de los efectos observados como consecuencia de la hipoprolactinemia, la bromocriptina fué capaz de afectar la esteroidogénesis testicular directamente, evidenciándose un efecto inhibitorio de la droga cuando se inyectó por vía intratesticular.

Asimismo, este agonista dopaminérgico ($1,5 \times 10^{-5} M$) fué capaz de modificar la producción "in vitro" de testosterona por células de Leydig dispersas, reduciendo la liberación de andrógenos al medio de incubación tanto en ausencia como en presencia de hCG. Estos hallazgos están en acuerdo con observaciones previas de Vermes y col. (1978) y Grizard y col. (1983), quienes obtuvieron resultados similares a partir de preparaciones de células intersticiales de rata. Sin embargo, difieren de las observaciones de Bartke y col.

(1981), que utilizando testículos totales de ratón y con concentraciones tan bajas como 1 ng/ml, la bromocriptina estimuló la producción de testosterona en ausencia o en presencia de dosis bajas de hCG.

Hasta el presente estudio, las discrepancias habían sido atribuidas a posibles diferencias en los procedimientos de los Laboratorios y especialmente a la utilización de distintas especies de animales. Como resultado de las actuales experiencias realizadas, se observó que la incubación de testículos enteros provenientes de ratas de 40 días en presencia de bromocriptina en diferentes concentraciones, resulta en un incremento en la producción de andrógenos. El efecto es más pronunciado en ausencia de hCG, pero también se evidencia con cantidades submáximas de la hormona.

Resulta sumamente difícil tratar de interpretar las diferencias observadas al intentar comparar los datos obtenidos a partir de células en suspensión o testículos descapsulados.

La acción vasoactiva de los alcaloides de la ergotamina (Fluckinger y col., 1976) no parece ser relevante en estas incubaciones, por cuanto la mayoría de los vasos sanguíneos se descartan al decapsular los testículos. Sin embargo, algún posible efecto en otros sectores testiculares no puede ser descartado.

Poca atención se ha prestado hasta el presente a las acciones de la dopamina sobre la célula de Leydig. No obstante es necesario considerar los efectos dopaminérgicos de la bromocriptina, dado que la acción periférica de la dopamina es mediada a través de receptores específicos (Bogaert y col., 1981).

Ante la evidencia experimental discutida en párrafos anteriores de la participación de la PRL en el normal funcionamiento de la función gonadal en la rata durante la maduración sexual, surgió entonces la hipótesis relacionada a una posible acción directa de la hormona en la gonada. La presencia de receptores específicos para PRL en el testículo (Charreau y col., 1978) constituye un aval en tal sentido.

Con el objeto de corroborar dicha hipótesis, se analizó el efecto del agregado "in vitro" de PRL, tanto a testículos enteros decapsulados como a suspensiones de células de Leydig. Ambos tipos de diseños experimentales exhibieron características casi idénticas, mostrando que la PRL es capaz de estimular la producción de andrógenos "in vitro" a partir de concentraciones de 5×10^{-8} M.

Shiu y col. (1978), describieron un número de receptores para PRL por célula de Leydig considerablemente menor que los correspondientes para LH. Esta observación podría ofrecer una posible explicación para las elevadas concentra-

ciones de PRL necesarias para estimular la esteroidogénesis "in vitro" con respecto a las de LH (Odell y col., 1976).

Los presentes resultados podrían también ser atribuidos a una contaminación de la PRL_o con LH. Al respecto, Menon y col. (1985) empleando células luteales, no lograron detectar una inhibición en el ensayo de actividad del receptor de LH/hCG.

En este sentido, es de esperar que estudios adicionales en realización en el Laboratorio, con técnicas de cultivo de células de Leydig y utilización de un anticuerpo anti-LH, permitan dilucidar completamente el efecto de la PRL, y de esa manera poder establecer una mejor correspondencia entre las observaciones obtenidas de experiencias "in vivo" e "in vitro".

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis ponen de manifiesto una vez más la importancia de realizar de manera conjunta, estudios en el hombre y a nivel experimental. Si bien estos últimos permiten ahondar más en el conocimiento sobre el tema, se debe ser cauteloso en la extrapolación al ser humano de las observaciones realizadas en animales de experimentación.

Basándose en los resultados obtenidos a partir del análisis de muestras testiculares y epididimarias humanas es posible extraer ciertas conclusiones que se enumeran a continuación:

- La testosterona testicular es el principal andrógeno presente en el testículo humano (edad promedio = 65 años), encontrándose en una concentración casi 40 veces más alta que su metabolito 5α -reducido la DHT.

- La concentración de testosterona epididimaria es aproximadamente un 10% de la presente en la gonada, mientras que la DHT se halla en concentraciones muy semejantes en ambos órganos.

- En cada uno de los tejidos estudiados el 3α -Diol fue detectado en concentraciones que resultaron 6 veces menores

que las correspondientes a DHT.

- La concentración de cinc hallada en testículo y epidídimo humano es 2 veces más elevada que la descrita en la mayoría de los tejidos del organismo.

- Se comprobó una correlación directa entre las concentraciones de cinc testicular y cada andrógeno (testosterona y DHT); mientras que en epidídimo las concentraciones de testosterona se correlacionaron inversamente con el metal.

- Las concentraciones de los diferentes andrógenos analizados resultaron uniformemente distribuidas en cada uno de los segmentos del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola).

- En los pacientes tratados con estrógenos durante dos o más meses, las concentraciones intratesticulares de testosterona y DHT fueron significativamente inferiores a las del grupo no tratado, observándose el mismo efecto en los tres segmentos epididimarios.

- La inducción de hipoprolactinemia en pacientes con carcinoma de próstata por administración del agonista dopaminérgico bromocriptina, redujo significativamente los niveles

de PRL séricos sin modificar los correspondientes a LH.

- Al cabo de 7 días de tratamiento con bromocriptina se observó un descenso en los niveles de la testosterona circulante mientras los correspondientes a Δ_4 Adiona y 3α -Diol permanecieron constantes.

- La observación más importante durante la hipoprolactinemia fué el marcado aumento en las concentraciones intratesticulares de testosterona y DHT, en tanto que el contenido de cinc resultó constante a lo largo del tratamiento.

- Se observó una correlación positiva entre la testosterona testicular y la cantidad relativa de células de Leydig en cada paciente. Las diferentes alteraciones observadas en los túbulos seminíferos no se correlacionaron con el nivel de andrógenos. El estudio histológico testicular por microscopía óptica no reveló cambios detectables en ningún sector del órgano como consecuencia de la hipoprolactinemia.

Los estudios realizados en la segunda parte de este trabajo permitieron establecer la importancia de la PRL durante la maduración sexual de la rata macho evidencián-

dose en los siguientes puntos:

- La inducción de hipoprolactinemia (niveles séricos de PRL no detectables por RIE) en ratas de 30 días de edad por administración de 3 dosis diferentes de bromocriptina (0.75, 1,5 y 3 mg/kg peso/día) no modificó los niveles séricos de LH, ocasionando un descenso significativo en el peso testicular y epididimario.

- Como consecuencia del tratamiento se produjo una significativa disminución en las concentraciones séricas e intratesticulares de testosterona, DHT y 3 α -Diol.

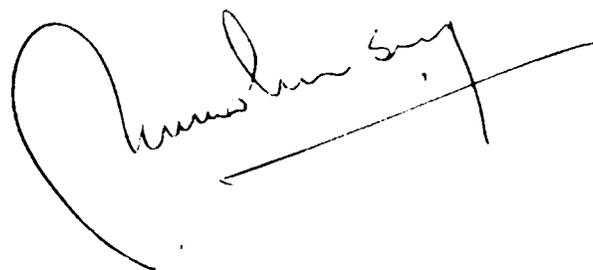
- En los testículos decapsulados provenientes de los animales hipoprolactinémicos, la liberación de AMPc basal al medio de incubación disminuyó aproximadamente un 50% con respecto a los controles.

- La producción de andrógenos "in vitro" en testículos decapsulados y células de Leydig aisladas de ratas hipoprolactinémicas, resultó sensiblemente menor que los controles en condiciones basales y luego de un estímulo submáximo con hCG. La capacidad esteroidogénica máxima no fué diferente entre ambos grupos.

- No se observaron modificaciones en la proporción de células de Leydig viables obtenidas por colagenización antes y durante el tratamiento con el mencionado agonista dopaminérgico.

- Bromocriptina en concentraciones de 5×10^{-5} M ejerce un efecto inhibitorio directo sobre la producción de andrógenos "in vitro". Dicho efecto se evidencia luego de una inyección intratesticular con el neurofármaco o bien agregando el mismo a suspensiones de células de Leydig provenientes de ratas de 40 días de edad.

- El agregado de PRL α (5×10^{-8} M) a testículos decapsulados y suspensiones de células de Leydig provenientes de ratas de 40 días de edad, en incubaciones durante 3 horas, originó un aumento en la producción de andrógenos basal y post-estímulo submáximo con hCG.



| | |
|------------------------------|-----------|
| FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS | |
| MESA DE ENTRADAS | |
| * - 6 MAR. 1986 * | |
| ENTRADA | |
| LETRA | 100-76274 |

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

Aafjes, J. H.; Vreeburg, J. Th. M. (1972). *J. Endocr.*, 53; 85.

Abbasi, A. A.; Prasad, A. S.; Rabbani, P. y Du Mouchelle, E. (1980). *J. Lab. Clin. Med.* 96 (3): 544.

Alder, A.; Burger, H.; Davis, J.; Dulmanis, A.; Hudson, B.; Sarfaty, G. y Straffon, W. (1968). *British Medical Journal*, i: 28.

Ambrosi, B.; Travaglini, P.; Beck-Peccoz, P.; Elli, R.; Paracchi, A.; Faglia, G. (1976). *J. Clin. Endocr. Metab.*, 43: 700.

Anderson y Liao (1968). *Nature* 219: 277.

Antoniou, L. D.; Shalhoub, R. J.; Telechery, S.; Smith, J. C. Jr. (1977). *Lancet* II: 895.

Aragona, C.; Friesen, H. G. (1975). *Endocrinology*, 97: 677.

Armstrong, D. T.; Moon, Y. S.; Fritz, I. B.; Dorrington, J. H. (1975). En: "Hormonal regulation of spermatogenesis" (Eds., F. S. French y col.), 85. Plenum, N.Y.

Ascoli, M.; Puett, D. (1977). *FEBS Lett*, 75: 77.

Astwood, E. B. (1941). *Endocrinology*, 29: 309.

Axelrod, L. R. (1965). *Biochem. biophys. Acta* 97: 551.

- Baraño, J.L.S.; Legnani, B.; Chiauzzi, V. A.; Bertini, L. M.; Suescun, M. O.; Calvo, J. C.; Charreau, E. H.; Calandra, R. S. (1981). *Endocrinology*. 109: 2188.
- Bartke, A. (1965). *J. Reprod. Fert.* 10: 93.
- Bartke, A. (1971). *J. Endocr.* 49: 311.
- Bartke, A. (1973). 9th Acta Endocrinológica Congress. Abstract Nº 22 Acta endocr. (Kbh) Suppl. 177: 22.
- Bartke, A. (1980). *Fed. Proc.* 39: 2577.
- Bartke, A. y Lackritz, E. M. (1981). *Fertil Steril* 35: 473.
- Bartke, A.; Smith, M. S. y Dalterio, S. (1979). *Int. J. Androl.* 2: 257.
- Bartsh, W.; Horst, H. J.; Becker, H. y Nehse, G. (1977). *Acta Endocrinol.* 85: 650.
- Belanger, A.; Auclair, C.; Séguin, C.; Caron, S. y Labrie, F. (1981). *J. Androl.* 2: 80.
- Bergh, A. (1982). *Int. J. Androl.* 5: 325.
- Bergh, A.; Damber, J. E. (1984). *Int. J. Androl.* 7: 409.
- Bertrand, G. y Vladesco. R. (1921). *Comp. rend. Acad. d. sc.*, 173; 176.
- Bex, F. J. y Bartke, A. (1977). *Endocrinology*. 100; 1223.

Bex, F. J.; Bartke, A.; Goldman, B. D. y Dalterio, S. (1978).
Endocrinology 103: 2069.

Blanchard, M.; Josso, M. (1974). Pediatr. Res. 8: 968.

Blank, M. S.; Panerai, A. E.; Friesen, H. G. (1979). Science,
203: 1129.

Blaquier, J. A. (1971). Biochem. Biophys. Res. Commun.
45: 1076.

Blaquier, J. A. y Calandra, R. (1973). Endocrinology 93:
51.

Blaquier, J. A.; Cameo, M. S.; Burgos, M. H. (1972).
Endocrinology 90: 839.

Bogaert, M.; Buylaert, W.; Lefebvre, R. y Willems, J. (1981).
Actual Pharmacol (Paris) 33: 57.

Brown, D. A.; Albano, J.; Ekins, R.; Sgherzi, A. y Tampion,
W. (1971). Biochem. J. 121: 561.

Brown, G. M.; Seeman, P.; Lee, T. (1976). Endocrinology
99: 1407.

Brown, M. S. y Goldstein, J. L. (1976). Science 191: 150.

Bruchovsky J. y Wilson M. (1968). J. Biol. Chem. 243: 2012.

Burke, W. R.; Aten, R. F.; Eisenfeld, A. J. and Lytton,
B. (1977). J. Urol. 118: 52.

Calandra, R.S.; Barañao, J.L.; Bertini, L.; Calvo, J.C.; Charreau, E.H.; Chiauzzi, V.A.; Suescun, M.O.; Tesone, M. (1982) .En: "Physiopathology of Hypophysial Disturbances and Diseases of Reproduction", (Eds. De Nicola, A. F.; Blaquier, J.; Soto, R.) Alan R. Liss. Inc. N. Y. 87.

Campo, S.; Nicolau, G.; Pellizari, E.; Rivarola, M. A.(1979). Journal of Steroid Biochem. 10: 195.

Catt, K.J. y Dufau, M.L. (1973).Nature New Biol., 244: 219.

Catt, K.J.; Tsuruhara, T.; Mendelson,C.; Ketelslegers,J.M.; Dufau, M.L.(1974). En:"Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis".(Eds.Dufau,M.L.;Means,A.)1,Plenum.NY

Ciccarese, S.; Ohno, S. (1978). Cell., 13: 643.

Cigorruga,S.B.;Dufau,M.L. y Catt,K.J.(1978)J.B.C.253:4297.

Cigorruga,S.B.; Sorrel,S.; Bator,J.; Catt,K.J. y Dufau,M.L. (1980). J.Clin. Invest. 65:699.

Clark,A.F.; Calandra,R.S.; Bird,C.E.(1971)Clin.Biochem.4:89.

Clermont, Y. (1958) .Exp. Cell. Res.15: 435.

Conti, M.; Toscano,M.V.; Campo,D.; Geremia,R.; Stefanini,M. (1982)Prog. 2nd Eur. Workshop on Cell and Mol. Endocrin. of the Testis. Abst. C-25.

Coune,A. y Smith, P. (1975).Cancer Chemother Rep. 59:209.

Corpéchet, C.; Baulieu, E. y Robel, P. (1981) .Acta Endocr. 96: 127.

Chan, W. Y.; Chung, K. W.; Bates, J.; Blomberg, L. y Rennert O.M.(1981). Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, 630.

Charreau, E.H.; Attramadal, A.; Torjesen, P.A.; Purvis, K.; Calandra, R.S.; Hansson, V. (1977) Mol. Cell. Endocrinol. 6:303.

Charreau, E.H.; Dufau, M.L.; Catt, K.J. (1974) J. Biol. Chem. 249:4189

Charreau, E.H. y Calvo, J.C. (1985). En: "Endocrinología Molecular". (Eds. Calandra, R.S. y de Nicola, A.F.) 104, "El Ateneo" Bs. As

Chemes, H.E.; Gottlieb, S.E.; Pasqualini, T.; Domenichini, R.; Rivarola, M.A.; Bergada, C. (1985). J. of Andrology, 6: 102.

Christensen, A.K. (1975). Handb. Physiol. Endocrinol. 5:57.

Chowdhury, M.; Tcholakian, R.K. y Steinberger, E. (1974), J. Endocr. 60: 375.

de Larminat, M.A., (1981). Tesis doctoral.

Doherty, P.C.; Smith, M.S.; Bartke, A. (1980). Program and Abstracts of the 62th Annual Meeting of the Endocrine Society (Abstract 704) Washington D.C.

Dohler, K. D. y Wuttke, W. (1974). Endocrinology 94:1003.

Dorrington, T.; Fritz, I. y Amstrong, D. (1978). Biol. Reprod., 18: 55.

Dorrington, J. H.; Roller, N. F.; Fritz, I. B. (1975). Mol. Cell. Endocrinol. 3: 57.

Douglas, S.; Colvard, A. y Elizabeth M. Wilson (1984).
Biochemistry 23: 3471.

Dufau, M. L.; Tusuruhara, T.; Horner, K. A.; Podestá, E.
y Catt, K. J. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74:
3419.

Dym, M. y Fawcett, D. W. (1970). Biol. Reprod. 3: 308.

Evans, H. M.; Simpson, M. E.; Lyons, W. R. Turpeinen, K.
(1941). Endocrinology 28: 933.

Ewing, L. L. y Zirkin (1983). Recent Progress in Hormone
Research, 39: 559.

Faglia, G.; Ambrosi, B.; Giovine, C.; Gaggini, M.; Moriando,
P.; Scaperrotta, R. C. (1983). En: "Recent Advances in Male
Reproduction: Molecular Basis and Clinical Implications",
(Eds. D'Agata, R.; Lipsett, M. B.; Polosa, P.; Van der Molen,
H. J.) 313, Raven Press, N. Y.

Folman, Y.; Sowell, J. G.; Eik-Nes, K. B. (1972). Endocrinology
91: 702.

Forest, M. G.; Rivarola, M. A.; Migeon, C. J. (1968). Steroids
12: 323.

Fossati, P.; Strauch, G.; Tourniaire (1976): Nouv Presse
Med. 5: 1687.

Frankel, A. I.; Eik-Nes K. B. (1970). Endocrinology, 87:
646.

Franchimont, P.; Demoulin, A.; Verstraelen-Proyard, J.; Hazeer-Hagelstein, M. T.; Walton, J. S. y Waites, G. M. H. (1978): Int. J. Androl. (suppl.) 2: 69.

French, F. S.; Ritzén, E. M. (1973). Endocrinology, 95: 88.

Fluckinger, E.; Doepfner, W.; Markó, M.; Niederer, W. (1976). Postgraduate Med. Journal 52: (Suppl. 1) 57.

Gier, H. T. y Marion, G. B. (1970). En: "The Testis", Eds. Johnson, A. D.; Gomez, W. R. y Vandermark, N. L. Academic Press N. Y. y Londres, 2.

Gil-Ad, I. Locatelli, V.; Cocchi, D.; Carminati, R.; Arezzini, C.; Müller, E. E. (1978). Life Sci. 23: 2245.

Gloyna, R. E. ; Wilson, J. D. (1969). J. Clin. Endocr. 2: 970.

Gluckman, P. D.; Marti-Hemmenberg, C.; Thomsett, M. J.; Kaplan, S. L.; Rudolph, A. M. y Grumbach, M. M. (1979). Endocrinology, 105: 1173.

Gondos, B.; Renston, R. H.; Goldstein, D. A. (1976). Am. J. Anat. 145: 167.

Gorski, J.; Welshons, W. y Sakai, D. (1984). Mol. Cell. Endocrinol. 36: 11.

Grizard, G.; Andre, M.; Jarrige, J. F.; Chambon, M. y Boucher, D. (1983). Int. Journal of Andrology 6: 563.

- Grotjan, H. E.; Heindel, J. J. (1982). Ann. N.Y. Acad. Sci., 383: 456.
- Gunn, S. A. y Gould, T. C. (1958). Am. J. Physiol. 193, 505.
- Gunn, S. A.; Gould, T. C. y Anderson, A. D. (1961). J. Endocrin. 23: 37.
- Gunsalus, G. L.; Musto, N. A.; Bardin, C. W. (1980). En: "Testicular development, structure and function", (Eds. Steinberger, A.; Steinberger, E.) Raven. Press, N. Y., 291.
- Gurpide, E.; Mac Donald, P. C.; Chapdelaine, A.; Vande Wiele, R. L. y Lieberman, S. (1965). J. Clin. Endocr. Metab. 25, 1537.
- Habib, F. K.; Hammond, G. L.; Lee, I. R.; Dawson, J. B.; Mason, M. K.; Smith, P. H.; Stinch, S. R. (1976). J. Endocrinol., 71: 133.
- Habib, F. K. (1978). J. Steroid. Biochem. 9: 403.
- Hafiez, A. A.; Bartke, A. y Lloyd, O. W. (1972). J. Endocrinol., 52: 223.
- Hall, P. F. (1970). en: The Testis, Vol. II. Eds. Johnson, D.; Gomes, W. R. y Von Demark, N. L. 1, Academic Pres. N. Y.
- Hammond, G. L.; Ahonen, V.; Vihko, R. (1978). International Journal of Andrology, Suppl. 2: 1.

Hamilton, D. W.; Jones, A. L. y Fawcett. (1969). Biol. Reprod. 1, 167.

Hamilton, D. W. (1975). En: Handbook of Physiology, Section 7, Volumen V. Eds.: Hamilton, D. W.; Greep, R. O. 259, American Physiological Society, Washington.

Hansson, V.; Calandra, R. S.; Purvis, K.; Ritzen, M.; French, F.S.(1976).en: "Vitamins and Hormones". Eds.: Munson, P. L.; Diczfalusy, C.; Glover, J.; Olson, R. E. 187. Acad. Press. N. Y.

Hansson, V.; Ritzen, E. M.; French, F. S. y Nayfeh, S. N. (1975). En Handbook of Physiology, Endocrinology V, 173. Eds. Greep, R. O.; Hamilton, D. W. American Physiological Society, Washington.

Hansson, V.; Purvis, K.; Calandra, R. S. (1977). Proc. IV Intern. Congr. y Endocr., Hamburg, W. G. Vol. I, 410 (Eds. French, F. S.; Kotite, N. y Nayfeh, S. N.).

Harper, M. E.; Danutra, V.; Chandler, J. A. y Griffiths, K. (1976). Acta Endocr. 83: 211.

Hartoma, T. R.; Nahoul, K.; Netter, A. (1977). Lancet II; 1125.

Hsu, A. F. y Troen, P. J. (1978). Clin. Invest. 61: 1611.

Høisaeter, P. Å, Haukaas, S.; Bakke, A.; Hoiem, L.; Segadal, E.; Thorsenit A. (1982). The Prostate 3: 375.

Hooker, C.W. (1970). En: "The Testis" (eds.: Johnson, A. D.; Gomes, W. R., Van Demark, N. L.), Vol. I, 483. Acad. Press, N. Y.

Horton, R. (1978). *Andrologia*, 10: 183.

Horton, R.; Hsieh, P.; Barberia, J.; Pages, L.; Cosgrove, M. (1975). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41: 793.

Huggins, C.; Russel, P. S. (1946). *Endocrinology*, 39: 1.

Huhtaniemi, P.; Leionen, C.; Hammond, G. L. and Vihko, R. (1980). *Clin. Endocrinol.* 13, 561.

Huhtaniemi, I. T. y Catt, K. J. (1981). *Endocrinology* 109: 483.

Jacobi, G. H.; Sinterhauf, K.; Kurth, K. H.; Altwein, J. E. (1978). *J. Urol.* 119: 240

Jahnsen, T.; Gordeladze, J. O.; Torjesen, P. T.; Hansson, V. (1980). *Arch. Androl.* 5: 169.

Jensen, K. (1984). *Lab. Invest.*, 51: 487.

Josso, N. (1974). *Pediatr. Res.* 8: 755.

Juneja, H. S.; Motta, M.; Vasconi, F.; Martini, L. (1977). n: "Androgen and Antiandrogens". Eds.: Martini, L.; Motta, M. 127, Raven Press, N. Y.

Jutte, N. H. P. M.; Grootegoed, J. A. .; Rommerts, F. F. G., Van der Molen, H. J. (1981). *J. Reprod. Fertil.* 62: 399.

- Kaler, L. W. and Neaves, W. B. (1978). *Anat. Rec.* 192, 513.
- Kan, K. W. y Ungar, F. (1973). *J. Biol. Chem.* 248: 2868.
- Kaplan, S. L.; Grumbach, M. M.; Aubert, M. L. (1976). *Recent. Prog. Horm. Res.* 32: 161.
- Kelch, R. P.; Lindholm, U. B. y Jaffe, R. B. (1971). *J. Clin. Endocr.* 32: 449.
- Ketelslegers, J. M.; Hetzel, W. D.; Sherins, R. J.; Catt, K. J. (1978). *Endocrinology* 103: 212.
- King, W., Greene, G. L. (1984). *Nature* 307: 745.
- Koenig, M. P.; Zuppinger, K.; Liechti, B. (1977). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45: 825.
- Kolena, J.; Seboková, E. (1983). *Exp. Clin. Endocrinol.* 82: 1.
- Kovacević, R.; Krsmanović, L.; Stojilković, S.; Simonović, I.; Marić, D.; Andjus, R. K. (1982). *Int. J. Androl.* 5: 437.
- Lacroix, E.; Eechaute, W. y Leusen, I. (1975). *Steroids* 25, 649.
- Lanfer, N.; Yaffee, H.; Margalioth, E. J.; Livshin, J.; Ben David, M. y Schenker, J. G. (1981). *Arch. Androl* 6: 343.

LeFebvre, F. A.; Reeves, J. J.; Seguin, C.; Massicotte, J.; Labrie, F. (1980). *Mol. Cell. Endocrinol.* 20: 127.

Le Gac, F.; Attramadal, H.; Horn, R.; Tvermyr, M.; Frøysa, A.; Hansson, V. (1982). en: *Progr. 2nd. Eur. Workshop Mol. Cell. Endocrin. of the Testis*, Rotterdam, 11-14 May, Abst. C-16.

Lei, K. Y.; Abbasi, A. y Prasad, A. S. (1976). *Am. J. Physiol.* 235: 2396.

Leionen, F.; Hammond, G. R.; Vihko, R. (1980). *J. Clin. Endocr. Metab.* 51: 423.

Levy, H.; Deane, H. W. y Rubin, B. L. (1959). *Endocrinology* 65: 932.

Lipschultz, L. I.; Tsai, Y. H.; Sanborn, B. M. y Steinberger, E. (1977). *Fertil Steril* 28: 947.

Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr A, Randal, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.*, 193: 265.

Libertun, C.; Arakelian, M. C.; Larrea, G. A.; Gorriño, L. R. y Becú, D. (1980). *Acta physiol. latinoam.*, 30: 275.

Maan T. (1964) En: *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*, Segunda Editor New York, John Wiley and Sons Inc. 37.

Magrini, G.; Gasperi, M.; Martin Dupan, R.; Bauman, P. y Felber, J. P. (1981). *Arch. of Andrology* 6: 219.

Mahoudeau, J. A.; Bardin, C. W. y Lipsett, M. B. (1971).
J. Clin. Invest. 50: 133 8.

Martikainen, H.; Vihko, R. (1982). Clin. Endocrinol. 16:
227.

Martikainen, H.; Huhtaniemi, I.; Myllyla, V.; Sotaniemi,
K.; Nummi, K.; Vihko, R. (1983). J. Androl. 4: 192.

Mawson, C. A. y Fisher, M. I. (1951). Nature (London) 167:
859.

Mawson, C. A. y Fisher, M. I. (1953). Biochem. J. 55, 696.

Mc Cann, M. d.; Lumpkin, H.; Mizunuma, O.; Khorram, A.
Ottlecz, A. y Samson, W. K. (1984). Trends Neurosci. Vol
7 Nº 4, 127.

Mc Neilly, A. S.; de Kretser, D. M.; Sharpe, R. M. (1979).
Biol. Reprod. 21: 141.

Means, A. R. (1975). En: Handbook of Physiology, Volumen
V. Eds. Hamilton, D.W.; Greep, R.O. American Physiological
Society, Washington, 203.

Meites, J.K.H. Lu,; Wuttke, W.; Welsch, C. W.; Nagasawa,
H.; Quadri, S.K. (1972). Recent. Prog. Horm. Res., 28: 471.

Mendelson, C.; Dufau, M.L. y Katt, K. J. (1975). J. Biol.
Chem. 250: 8818.

Menon, M.; Peegel, H. y Menon, K. M. J. (1984). J. Steroid.
Biochem. 22 (1): 79.

Mercier-Bodard, C.; Baulieu, E. E. (1968). C. R. Acad. Sci. (Paris) 262: 804.

Midgley, A. R. (1966). Endocrinology 79: 10.

Midgley, A. R. (1967). J. Clin. Endocrinol. Metab. 27: 295.

Millar, M. J.; Elcoate, P. V.; Fisher, M. I. y Mawson, C. A. (1960). Canad. J. Biochem. Physiol. 38, 1457.

Millar, M. J.; Vicent, N. R. y Mawson, C. A. (1961). J. Histochem. Cytochem. 9: 111.

Monsalve, A. y Blaquier, J. A. (1977). Steroids 30: 41.

Moger, W. H. (1979). J. Endocr. 80: 321.

Moore, Ch y Price, D. (1932). Am. J. Anat. 50: 13.

Mori, H. y Christensen, A. K. (1980). J. Cell. Biol. 84: 340.

Morse, H. C.; Horike, N.; Rowley, M. J.; Heller, C. G. (1973). J. Clin. Endocrinol. Metab. 37: 882.

Morris, P. L.; Saxena, B. A. (1980). Endocrinology, 107: 1639.

Moyle, W. R.; Bahl, O. P.; Marz, L. (1975). J. Biol. Chem. 250: 9163.

Mulder, E.; Brinkman, A. O.; Lamers- Stahlhofen, G., Van der Molen, H. J. (1973).FEBS Lett. 31: 131.

Murphy, B. E. P. (1968).Canad. J. Biochem. 46: 299.

Musto, N. A.; Larrea, F.; Cheng, S. L.; Kotite, N.; Gunsalus, G. L. y Bardin, C. W. (1982).Ann. N. Y. Acad. Sci.,

Nakagawa, K.; Obara, T.; Matsubara, M.; Kubo, M. (1982). Clin. Endocrinol. 17: 345.

Nayfeh, S. N.; Coffey, J. C.; Hansson, V. y French Franck. (1975).J. of Steroid Biochemistry 6: 329.

Niswender, G. D.; Midgley, A. R.; Monroe, S. E.; Reichert, L. E. (1968).Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128: 807.

Negro Vilar, A.; Krulich, L.; Mc Cann, S. M. (1973). Endocrinology, 93: 660.

Negro Vilar, A.; Saad, W. A.; Mc Cann, S. M. (1977). Endocrinology, 100: 729.

Nicoll, C. S. y Bern, H. A. (1971) .En: Wolstenholme, G. E. W. Knight,. J. (Eds): Ciba Foundation Symposium on Lactogenic Hormones. London: Churchill Livingstone, 299.

O'Brien, T. J.; Higashi, M.; Kanasugi, H.; Gibbons, W. E.; Morrow, C. P. (1982).J. Clin. Endocrinol. Metab. 54: 793.

Odell, W. D.; Swerdloff, R. S. (1976).Recent. Prog. Horm. Res. 32: 245.

Odell, W. D. y Larsen, J. L. (1984). Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 177: 459.

Ojeda, S.; Andrews, W.; Advis, J.; Smith-White, S. (1980). Endocrine Reviews, 3: 228.

Orgebin-Crist, M. C. y Djiane, J. (1979). Biol. Reprod. 21: 135.

Parizek, J. y Zahor, Z. (1956). Nature, London, 177: 1036.

Parvinen, M.; Nikula, H.; Huhtaniemi, I. (1984). Mol. Cell. Endocrinol. 37: 331.

Payne, A. H.; Kalch, R. P.; Muroso, E. P.; Kerlan, J. T. (1977). J. Endocrinol. 72: 17.

Payne, A.; Kawano, A. y Jaffe, R. (1973). J. Clin. Endocrinol. Metab. 37: 448.

Pelliniemi, L. J.; Dym, M.; Crigler, J. F.; Retik, A. B.; Fawcett, D. W. (1980). En "Testicular Development Structure and Function", Eds. Steinberger, A.; Steinberger, E.; Raven Press, N. Y., 49.

Perryman, R. L.; Thorner, M. O. (1981). J. Androl. 2: 233.

Piacsek, B. E.; Goodspeed, M. P. (1978). J. Reprod. Fertil. 52: 29.

Pirke, K. M.; Doerr, P. (1975). Acta Endocrinol. 80: 171.

Pirke, K. M.; Doerr, P. (1973). *Acta Endocrinol.* 74: 792.

Pirke, K. M.; Doerr, P. (1977). *Acta Endocrinol.* 193: 57.

Prasad, A. S. (1976). En: *Trace Elements in Human Health and Disease* (Ed. Prasad, A.) S. 1, Academic Press, N. Y.

Prasad, A. (1983). En: *Biological Aspects of Metals and Metal-Related Diseases*(Ed. Bibudhendra Sarkar), Raven Press, N.Y.

Prasad, A. S.; Oberleas, D.; Wolf, P. y Horwitz, J. P. (1967). *J. Clin. Invest.* 46: 549.

Preslock, J. P. (1984). En: *Steroid Converting Enzymes and Diseases.* (Eds.: Fortherly, K. y Pal, S. B.). Walter de Gruyter y Comp. Berlin. N.Y. 73.

Pujol, A.; Bayard, F.; Louvet, J. P. y Boulard, C. (1976). *Endocrinology* 98: 111.

Purvis, K.; Calandra, R. S.; Hansson, V.(1977). En: "Androgens and Antiandrogens". (Eds. Martini, L.; Motta, L.) 37, Raven Press, N. Y.

Purvis, K.; Calandra, R. S.; Sander, S.; Hansson, V. (1978). *Int. J.Androl.* 1: 531.

Purvis, K.; Clausen, O. P. F. y Hansson, V. (1979). *Biology of Reproduction*, 20, 304.

Purvis, K.; Clausen, O. P. F.; Olsen, A.; Haug, E.; Hansson, V. (1979). Arch. Androl. 3: 219.

Purvis, K. y Hansson, V. (1978). J. Reprod. Fert. 52: 59.

Reventos, J.; Benahmed, M.; Tabone, E.; Saez, J. M. (1983). Acad. C. R. Sci. 296: 123.

Rivarola, M. A.; Forest, M. G.; Migeon, C. J. (1968). J. Clin. Endocrinol. Metab. 28: 34.

Rivarola, M. A.; Podestá, E. J.; Chemes, H. E. y Aguilar, D. (1973). J. Clin. Endocrinol. Metab. 37: 454.

Rivarola, M. A.; Podestá, E. J.; Chemes, H. E.; Calandra, R. S. (1975). J. Ster. Biochem. 6: 365.

Rivarola, M. A.; Pasqualini, T. y Chemes, H. E. (1983). J. Steroid. Biochem. 19: (1) 961.

Ritzen, E. M.; Dobbins, M. C.; Tindall, D. J.; French, F. S. y Nayfeh, S. N. (1973). Steroids 21: 593.

Ritzen, E. M.; French, F. S.; Weddington, S. C.; Nayfeh, S. N. y Hansson, V. (1974). J. Biol. Chem. 249: 6597.

Rodbard, D.; Hutt, D. M. (1974). Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine (Proc. Symp. Istambul, 1973). 1, IAEA, Viena 165.

Rosoff, B. y Martin, C. R. (1968). Gen. Comp. Endocrinol 10: 75.

Rubens, R.; Dhont, M.; Vermeulen, A. (1974). J. Clin. Endocrinol. Metab., 39: 40.

Ruokonen, A.; Laatikainen, T.; Laitinen, E. A.; Vihko, R. (1972). Biochemistry, 11: 1411.

Saez, J. M.; Forest, M. G.; Moreau, A. M. y Bertrand, J. (1972). J. Clin. Invest. 51: 1226.

Saidi, K. Wem, R. V. and Sarif, V. (1977). Bromocriptine for Male infertility. Lancet I, 250.

Samuels, L. T.; Bussman, L.; Matsumoto, K. y Huseby, R. A. (1975). J. Steroid. Biochem. 6: 291.

Sar, M.; Stumpf, N. E.; Mc Lean, N. S.; Smith, A. A.; Hansson, V.; Nayfeh, S. N.; French, F. S. (1975). En: "Hormonal regulation of spermatogenesis" (Eds. French, F. S. y col.) 311, Plenum, N. Y.

Sawing, C. t.; Ryan, R. J.; Longcope, C. y Fisher, L. E. (1978). Journal of Clinical Endocr. Metab. 46: 911.

Schanbacher, B. D. (1979). J. Anim. Sci. 48: 591.

Setchell, B. P. (1980). J. of Andrology 1: 3.

Sharpe, R. M. (1979). J. Reprod. Fertil 55: 365.

Sharpe, R. M. y Mc Neilly (1980). Mol. Cell. Endocrinol. 18: 75.

Sharpe, R. M.; Fraser, H. M.; Cooper, I. y Rommers, F. G. (1981). *Nature* 290: 785.

Sharpe, R. (1984). *Biol. Reprod.* 30: 29.

Sheth, A. R.; Mugatvala, P. P.; Shah, G. V.; Rao, S. S. (1975). *Fertil. Steril* 26: 905.

Shiu, R. P. C.; Paz, G. y Faiman, C. (1982). *Int. J. of Androl.* 5: 525.

Snedecor, G. W. y Cochran, W. G. (1967). *Statistical Methods*. Iowa State University Press.

Stearns, E. L.; Mac Donnell, J. A.; Kaufman, B. J.; Padva, R.; Lucntan, T. S.; Winter, J. S. D.; Faiman, C. (1974). *Amer. J. Med.*, 57: 761.

Steinberger, A. (1979). *J. Reprod. Fertil.*, 26: 31.

Steinberger, A.; Dighe, R. R. y Díaz, J. (1984). *Arch. Biol. Med. Exp.* 17: 267.

Steinberger, E.; Smith, K. D.; Tcholakian, R. K.; Chowdhury, M.; Steinberger, A.; Ficher, M.; Paulsen, C. A. (1974). en: "Male Fertility and Sterility" (Eds. Mancini, R. E.; Martini, L.) Acad. Press, London, 149.

Stumpf, W. E. (1969). *Endocrinology*, 85: 31.

Sueldo, C. E.; Berger, T.; Kletzky, O.; Marrs, R. P. (1985). *Fertil. Steril.* 43: 632.

Sulcova, J.; Starka, L. (1973). *Endocr. Exp.* 7: 113.

Sundby, A.; Torjesen, P.; Hansson, V. (1982). *Arch. of Andrology*, 9: 233.

Susuki, Y. y Sinohara, H. (1981). *Steroids*. 38: 263.

Tindall, D. I.; French, F. S.; Nayfeh, S. N. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49: 1391.

Tremblay, R. R.; Kowarski, A.; Park, I. J. y Migeon, C. J. (1972). *J. Clin. Endocr.* 35: 101.

Turek, F. W.; Elliott, J. A.; Alvis, J. D. y Menaker, M. (1975). *Biol. Reprod.* 13: 475.

Tukey, O. (1949). *Biometrics*, 5: 89.

Turkington, R. W. (1972). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34: 247.

Vale, W.; Rivier, C.; Brown, M. (1977). *A. Rev. Physiol.* 39: 473.

Vallee, B. L. y Altschule, M. D. (1949). *Physiological Reviews* 29: 370.

Van der Vusse, G. C.; Kalkman, M. L.; Van der Molen, J. H. (1975). *Biochim. Biophys. Acta*, 380: 473.

Verhoeven, G.; Cailleau, J.; de Moor, P. (1981). *Mol. Cell. Endocrinol.* 24: 41.

Verhoeven, G.: Franchimont, T. P. (1983). Acta Endocrinol. (Copenh) 102: 136.

Verjans, H.L.; de Jong, F. H.; Cooke, B.A.; Van der Molen, H. J. y Eik-Ness, K.B. (1974). Acta Endocr. (Kbh) 77: 636.

Vermes, I.; Telegdy, G. (1978). Int. J. Androl, 1: 523.

Vermeulen, A.; Andó, S.; Verdonck, L. (1982). 54: 409.

Vermeulen, A.; Rubens, R.; Verdonck, L. (1972). J. Clin.

Endocrinol. Metab., 34: 730.

Vermeulen, A.; Stoica, T.; Verdonck, L. (1971). J. Clin. Endocrinol. Metab., 33: 759.

Vermeulen, A.; Verdonck, L.; Van der Straeten, M. y Orie, N. (1969). J. Clin. Endocr. 29: 1470.

Vigersky, R. A.; Loriaux, D. L.; Howards, S. S.; Howards, G. B.; Hodgen, M. B.; Lipsett J. y Chrambach, A. (1976). J. Clin. Invest. 58: 1061.

Waeber, C.; Reymond, M.; Lemarchand-Beraud, T. (1983). Biol. Reprod. 28: 167.

Weisz, J.; Ward, I. L. (1980). *Endocrinology*, 106: 306.

Welshons, W. V.; Lieberman, M. E.; Gorski, J. (1984). *Nature* 307: 747.

Wetterdal, B. (1958). *Acta radiol.*, Stockh, Suppl. 156.

Wilson, J. D. (1978). *A. Rev. Physiol.* 40: 279.

Wilson, E. M.; Smith, A. A. (1975). En: "Hormonal regulation of spermatogenesis" (Eds. French, F. S.; Hansson, V.; Ritzen, E. M.; Nayfeh, S. N.) 281, Plenum. Press, N. Y.

Winter, J. S.D.; Faiman, C. (1972). *Pediatr. Res.* 6: 126.

Woods, M. C.; Simpson, M. E. (1961). *Endocrinology*, 69: 61.

Zipf, W. B.; Payne, A. H.; Kelch, R. P. (1978). *Endocrinology* 103: 595.