

Tesis de Posgrado

Regulación periférica del mecanismo de acción androgénica

Barañao, José Lino S.

1980

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

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

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

Cita tipo APA:

Barañao, José Lino S.. (1980). Regulación periférica del mecanismo de acción androgénica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1646_Baranao.pdf

Cita tipo Chicago:

Barañao, José Lino S.. "Regulación periférica del mecanismo de acción androgénica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1646_Baranao.pdf

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

REGULACION PERIFERICA DEL MECANISMO
DE ACCION ANDROGENICA

Autor : Lic. José Lino S. Barañao

Director : Prof. Dr. Eduardo H. Charreau

Tesis presentada para optar por el título de :

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

REGULACION PERIFERICA DEL MECANISMO
DE ACCION ANDROGENICA

Autor Lic. José Lino S. Barañao

Director : Prof. Dr. Eduardo H. Charreau

Tesis presentada para optar por el título de :

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

-1980-

1646
!

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. Eduardo H. Charreau, quien además de haberme formado científicamente, ha constituido un constante ejemplo de conducta.

A la Dra. Marta Tesone, Lic. Beatriz Legnani, Dr. Luiz Biella de Souza Valle, Bioq. Violeta A. Chiauzzi, Lic. Liliana M. Bertini, Lic. Jorge G. Tezón, Dr. Juan Carlos Calvo, Dr. Ricardo M. de Oliveira-Filho y Lic. Isabel Luthy, por su colaboración en la realización de los trabajos experimentales.

Al Dr. Ricardo S. Calandra, a cuyo constante estímulo se debe gran parte de este trabajo.

A la Sra. Ana Rosa de la Cámara de Charreau y a la Srta. Diana Bas, por la eficiencia de su asistencia técnica.

Al Dr. Virgilio G. Foglia, por los animales hipofisectomizados.

A los Dres. Pablo Scacchi y Jaime Moguilevsky, por los animales androgenizados.

Finalmente, a todos quienes constituyen el Instituto de Biología y Medicina Experimental, por lo excepcional de su calidad humana.

A mis padres

INDICE

	Página
INTRODUCCION GENERAL	1
Biosíntesis de andrógenos	6
Transporte en plasma y fluído testicular	8
Importancia fisiológica de la ABP y regulación de su síntesis	10
Metabolismo de andrógenos en tejidos efectores	14
Importancia fisiológica del metabolismo de la T	18
Regulación hormonal del metabolismo de andró- genos	21
Receptores para andrógenos	23
Regulación del receptor citoplasmático para andrógenos	26
OBJETIVOS DE LA PRESENTE INVESTIGACION	28
MATERIALES Y METODOS	
Animales	29
Obtención de animales diabéticos	29
Tratamiento con insulina de los animales dia- béticos	30

	Página
Tratamiento con testosterona de los animales diabéticos	30
Tratamiento con prolactina	31
Tratamiento con drogas que modifican la secreción de prolactina	31
Obtención de animales androgenizados	32
Determinación de la concentración de la proteína transportadora de andrógenos (ABP)	32
Preparación de las muestras	33
Electroforesis en geles de poliacrilamida	34
Cálculo de los resultados	35
Metabolismo de andrógenos	
Obtención de 3α -diol ^{14}C	38
Obtención de 3β -diol ^{14}C	40
Aislamiento de los túbulos seminíferos por tratamiento con colagenasa	41
Determinación de la actividad de la 5α -reductasa en homogenato total	42
Determinación de la actividad de la 3β -HDH en homogenato total	41

	Página
Actividad de la 5α - reductasa en la fracción microsomal	44
Actividad de la 3α -HDH en la fracción soluble	45
Estudios enzimáticos en hipófisis e hipotálamo	45
Cálculo de las actividades	46
Radioinmunoensayo	46
T tisular	48
Estudios de la unión de andrógenos a sus receptores específicos	49
Remoción de la hormona libre endógena	50
Medición de sitios libres de unión en citosol	50
Medición de los sitios totales de unión por in- tercambio	51
Estudios de unión a la fracción nuclear	52
Cálculo de resultados	53
Obtención de PRL marcada con ^{125}I	53
Unión de PRL- ^{125}I a membranas de próstata	54
Otros métodos	55
I.EFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE EL MECANIS- MO DE ACCION DE ANDROGENOS	57

	Página
RESULTADOS	
Efectos de la PRLo	64
Peso de órganos	64
Niveles séricos de andrógenos y de LH	64
Receptores para andrógenos	67
Actividades enzimáticas	72
Efectos de la administración de agonistas y antagonistas de la dopamina	78
Niveles de LH y de andrógenos	78
Peso de órganos	82
Actividades enzimáticas	82
DISCUSION	95
II. INSULINA Y MECANISMO DE ACCION ANDROGENI CA. ALTERACIONES EN LA DIABETES EXPERIMEN TAL.	116
RESULTADOS	
Tratamiento con PT	122
Niveles de ABP	124
Efecto del tratamiento con PT sobre los órga- no sexuales accesorios	127

	Página
Actividad de la 5 α -reductasa prostática	130
Actividad de las 3 α y 3 β -HDH	132
Actividad de la 5 α -reductasa en epidídimo	134
Niveles plasmáticos de andrógenos	137
Receptores para andrógenos en próstata	
Determinación de sitios citoplasmáticos	
totales	137
Determinación de los sitios libres de unión	141
Unión de R1881- ³ H al extracto nuclear	141
Comparación entre ratas normales y dia-	
béticas	144
Receptores para PRL en próstata	144
Metabolismo de andrógenos y receptores en	
hipófisis e hipotálamo	149
DISCUSION	152
III. EFECTOS DE LA ANDROGENIZACION NEONATAL	166
RESULTADOS	
Niveles séricos de andrógenos y de estradiol	170
Niveles de ABP	173

	Página
Actividades enzimáticas	173
Receptores para andrógenos en próstata	179
Alteraciones en hipófisis e hipotálamo	179
Receptores para andrógenos y para estradiol	182
DISCUSION	184
IV. MECANISMOS INTRACELULARES DE REGULACION	193
RESULTADOS	196
DISCUSION	203
CONCLUSIONES	207
REFERENCIAS	219

ABREVIATURAS

ABP	proteína transportadora de andrógenos
ADN	ácido desoxiribonucleico
AMPc	3',5'-adenosina monofosfato cíclico
Δ^4 -androstenediona	4 androsteno 3,17 diona
ARN	ácido ribonucleico
bromocriptina	2-Br- α -ergocriptina
BSA	albúmina sérica bovina
^{14}C	carbono 14
Ci	curie
cpm	cuentas por minuto
DHT	dihidrotestosterona, 5 α -androstano 17 β -ol 3-ona.
3 α -diol	5 α -androstano 3 α ,17 β -diol
3 β -diol	5 α -androstano 3 β ,17 β -diol
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
Estradiol	1,3,(5-10)-estratrien-3,17 β -diol
fmol	femto mol
FSH	hormona folículo estimulante
^3H	tritio
hCG	gonadotropina coriónica humana

3 α -HDH	3 α -hidroxiesteroide oxidoreductasa
3 β -HDH	3 β -hidroxiesteroide oxidoreductasa
LH	hormona luteinizante
M	molar
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato forma reducida
ng	nanogramo
nM	nanomolar
PBS	buffer fosfo-salino (Dulbecco)
pimocida	(1-[1-[4,4-bis(p-fluorofenil)butil]-4-pipiri-- dil]-2-benzimidazolinona)
pg	picogramo
pmol	picomol
PRL	prolactina
PRL _o	prolactina ovina
progesterona	4-pregnen-3,20-diona
R1881	metiltrienuolona, 17 β -hidroxi-17 α -metil- 4,9,11-estratrien-3-ona.
rpm	revoluciones por minuto
sulpirida	(N-(etil-1-pirrolidimil-2)metilmetoxi-sul- famoil-5-benzamida)
T	testosterona, 4-androsten 17 β -ol-3 ona
ug	microgramo
U.I.	unidad internacional

INTRODUCCION

La esencia de las cosas es
perseverar en su ser.
Spinoza

La existencia de los seres vivos, como sistemas semi-abiertos, en continuo intercambio de materia y energía con el medio ambiente, sólo es posible gracias a los eficaces mecanismos de autocontrol que los caracterizan. La complejidad y sutileza de estos mecanismos es tanto mayor cuanto mayor es la complejidad de la forma de vida considerada.

En los seres pluricelulares, es posible establecer distintos niveles de organización o jerarquías estructurales, dotados cada uno de sus propios mecanismos autoregulatorios pero sometido a su vez a un control integrativo que lo subordina al nivel superior.

Así por ejemplo, en los vertebrados, si bien cada célula posee mecanismos autónomos de regulación, su actividad se ve condicionada por la interacción intercelular que garantiza la coordinación de la función del tejido del cual forma parte. A su vez, el tejido ó órgano en su conjunto, se halla bajo la influencia de

controles de tipo nervioso y endócrino que adecuan su función al estado general del organismo.

De este modo, el sistema nervioso y las secreciones hormonales, diferentes en sus mecanismos de acción, pero estrechamente relacionados entre sí, otorgan la coherencia funcional necesaria para que el organismo responda como un todo ante los estímulos externos.

Existe, no obstante, un tipo particular de hormonas cuya función trasciende la de la mera adaptación individual al medio ambiente. Se trata de los esteroides gonadales, que actúan sobre el organismo en su conjunto integrándolo al nivel organizativo superior : la especie.

En este sentido, y aún prescindiendo de las hipótesis finalistas o teleonómicas sobre la existencia de una "meta" en la supervivencia de la especie, resulta evidente que la diferenciación sexual y el impulso asociativo resultante, ejercen su influencia sobre un número considerable de funciones vitales.

Así, los andrógenos, definidos tradicionalmente como las sustancias capaces de estimular las características sexuales secundarias masculinas, actúan no sólo sobre la espermatogénesis

y el aparato reproductor, sino que afectan a distintos niveles la fisiología del organismo, desde la estimulación del anabolismo en el músculo, hasta el desencadenamiento de esquemas de comportamiento característicos, por acción sobre la corteza cerebral.

Esta acción generalizada de los andrógenos implica una estrecha interrelación tanto con el sistema nervioso como con las hormonas encargadas de regular las distintas actividades metabólicas, que se manifiesta a través de complejos mecanismos de control recíproco.

La existencia de estas interacciones, que no es privativa de los andrógenos, hacen que, en el campo particular de la química biológica que se ocupa de los mecanismos de regulación de la acción hormonal, sea necesario trasponer los límites del tubo de ensayo y pasar a considerar al organismo en su totalidad como sistema, analizando las variaciones de los distintos parámetros bioquímicos bajo diferentes condiciones experimentales.

En el presente trabajo se presentarán los resultados de las investigaciones realizadas con el objeto de establecer el papel de distintos factores hormonales en la regulación de la acción androgénica y de determinar nuevas posibilidades para sus mecanismos de control.

Aproximadamente 300 años antes de Cristo, Aristóteles, en su *Historia Animalium* describe en forma concisa la influencia de la castración en las aves y su diferente efecto según la edad del animal. Su extraordinaria percepción lo lleva a relacionar estos cambios con los observados en los hombres castrados en edad temprana. Transcurrirían si embargo casi dos mil años hasta que, a mediados del siglo XIX, los hallazgos de Berthold (1) y Leydig (2) dieran comienzo al estudio sistemático del origen y acción de los andrógenos. Este experimenta un considerable desarrollo gracias al perfeccionamiento de las técnicas de química orgánica, que posibilitan a Butenandt, en 1931, la obtención del primer andrógeno en forma cristalina, la androsterona, y a David, cuatro años más tarde, el aislamiento del andrógeno testicular más potente, al que da el nombre de testosterona (3).

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

La información reunida hasta el momento, ha permitido la formulación de un modelo (4) para el mecanismo de acción de la testosterona (T) que involucraría los siguientes procesos :

- 1) La T , sintetizada en las células de Leydig, es transportada en el plasma y fluido testicular en forma de complejos estables con proteínas.
- 2) Luego de entrar a las células del tejido efector, por un proceso poco conocido, la T es metabolizada, siendo su principal metabolito la 5α -dihidrotestosterona (DHT).
- 3) La DHT se une específicamente y con alta afinidad a un receptor proteico citoplasmático.
- 4) El complejo receptor hormona sufre cambios de estructura que condicionan su translocación al núcleo.
- 5) En el núcleo el complejo receptor - hormona se une a sitios definidos de la cromatina, denominados aceptores.
- 6) Como resultado de esta unión se produce una activación de la transcripción que desencadena la serie de procesos responsables de la manifestación de la acción hormonal.
- 7) El complejo receptor-hormona abandona el núcleo por

un proceso aún no establecido.

Para las distintas etapas se han establecido mecanismos característicos de regulación que serán tratados a continuación.

Biosíntesis de Andrógenos.

Si bien se han presentado evidencias de que distintos tejidos poseerían la capacidad de sintetizar andrógenos, resulta evidente que este aporte es mínimo comparado con la cantidad producida por las células de Leydig, bajo el estímulo trófico de la hormona luteinizante (LH). El mecanismo involucrado en dicha estimulación es esencialmente el mismo que el demostrado para otras hormonas proteicas. La unión de la LH a sus receptores específicos incrementaría la actividad de la adenilato ciclasa con el consiguiente aumento del AMP cíclico intracelular. Como consecuencia de la unión del AMP cíclico a la subunidad regulatoria de una proteína quinasa citoplasmática se produciría la liberación de la subunidad catalítica, aumentando por consiguiente la actividad de fosforilación.

La identidad de los sustratos fosforilados no ha sido establecida hasta el momento, pero parece probable que, a semejanza de lo observado en adrenal por estimulación con ACTH, el efecto final de dicha fosforilación sea la activación de los pasos enzimáticos involucrados en el pasaje de colesterol a pregnenolona.

Si bien no existen dudas acerca del papel primordial de la LH en la estimulación de la esteroideogénesis en la célula de Leydig, ciertas evidencias indican que su acción se encuentra modulada por otras hormonas. Johanson y Ewing (5), trabajando con perfusiones de testículo de conejo, determinaron que en ciertas condiciones la FSH es capaz de actuar sinérgicamente con la LH. En la rata este efecto parece ser particularmente importante en el animal inmaduro, tal como ha sido demostrado por Odell y col. (6). Estos mismos autores comprobaron que el tratamiento con FSH de animales prepúberes produce un aumento en el número de receptores para LH, lo que proporciona una posible explicación para este efecto sinérgico (7).

Por otra parte, y tal como se verá en los capítulos correspondientes, tanto la prolactina como la insulina son requeri

das para el normal funcionamiento de la célula de Leydig.

Transporte en plasma y fluido testicular.

Los andrógenos secretados por las células de Leydig pueden seguir dos vías: pasar a la circulación periférica a través de la vena espermática o bien penetrar directamente al túbulo seminífero atravesando la barrera hemato-testicular. En ambos casos el transporte se realiza mediante la unión a proteínas ligadoras.

En el plasma humano, la capacidad de unión a los esteroides fue atribuida inicialmente a la albúmina, pero más tarde se comprobó la existencia de una beta globulina que une sólo 17-hidroxiesteroides tales como T, DHT y 3α -androstano diol y en menor medida estradiol (8,9,10). Los esteroides conjugados no se unen en forma apreciable y ello podría explicar su mayor tasa de depuración. Sin embargo, la función de dichas proteínas no es del todo clara.

Se ha postulado, por comparación con la proteína transportadora de corticoides, que la unión a proteínas podría proteger a los andrógenos de su desactivación enzimática y por lo tanto

éstas actuarían como reservorios de los cuales los andrógenos serían liberados gradualmente hacia los órganos blanco, luego de su producción en el testículo. El aumento del porcentaje de unión de andrógenos a proteínas durante el embarazo, demostrado por Rivarola (9), sugiere además la posibilidad de que las proteínas transportadoras plasmáticas constituyan un importante mecanismo regulatorio para el control de la actividad androgénica.

En la rata, no obstante, no parece existir una proteína plasmática específica para el transporte de andrógenos, y éstos se unen principalmente a la albúmina (10,11).

Por otra parte, dado el alto requerimiento de andrógenos que presentan las células germinales, el aporte directo de los mismos hacia el túbulo seminífero parece ser esencial para el desarrollo normal de la espermatogénesis.

La correlación existente entre los niveles sanguíneos de andrógenos y los determinados en el plasma seminal, sugeriría la existencia de un libre intercambio entre ambos compartimentos (12). Sin embargo, la barrera hemato-testicular poseería una cierta selectividad para el pasaje de esteroides, dado que los an-

drógenos y particularmente los 5α -reducidos penetran con mucha mayor facilidad que otros esteroides e incluso que el colesterol, para el cual dicha barrera resulta impermeable (13,14).

En el fluido seminal, los andrógenos se unen con alta afinidad a una proteína sintetizada por las células de Sertoli. Dicha proteína, denominada "proteína ligadora de andrógenos" o ABP, presenta en la rata características fisicoquímicas (PM : 90.000, coeficiente de sedimentación : 4,6 S y estabilidad térmica) que permiten diferenciarla del receptor citoplasmático para andrógenos (15). En el conejo, sin embargo, resulta inmunológicamente indistinguible de la globulina plasmática que liga esteroides (16).

Importancia fisiológica de la ABP y regulación de su síntesis.

La síntesis de ABP es estimulable tanto por FSH (17-20) como por T (21-24). No obstante, existen discrepancias sobre la importancia relativa de ambos estímulos.

Luego de la hipofisectomía se observa la desaparición de ABP en testículo y epidídimo tanto en animales adultos (18,20) como inmaduros (17). El tratamiento con FSH ya sea inmediatamente después de la hipofisectomía (17) o luego de producida la regresión

testicular (17, 18, 20), aumenta el contenido de ABP tanto en testículo (18,20) como en epidídimo (17).

El aumento en la síntesis de ABP en respuesta a FSH ha sido igualmente demostrado en células de Sertoli en cultivo (23, 25,26).

Esta respuesta específica para FSH (27) sugeriría que la conocida influencia de dicha gonadotropina sobre la espermatogénesis es mediada por la célula de Sertoli. Esta hipótesis se apoya además en la existencia de receptores específicos en la membrana de la célula de Sertoli (28) y en la estimulación, por FSH, de efectos bioquímicos característicos de la acción gonadotrófica, tales como el incremento de AMPc (28) y la activación de proteína kinasas (29).

La T es igualmente capaz de incrementar el contenido de ABP tanto "in vivo" (19-21) como "in vitro"(23). En animales hipofisectomizados, la T puede mantener la producción de ABP por largos períodos en ausencia de FSH, siempre que el tratamiento comience inmediatamente después de la hipofisectomía (22). Pero, a diferencia de la FSH, si se deja transcurrir un cierto lapso antes de comenzar el tratamiento, la T resulta inca

paz por sí misma de reiniciar la producción de ABP. Este hecho se correlaciona con la mayor efectividad de los andrógenos para mantener que para iniciar la espermatogénesis en animales hipofisectomizados (30). El sinergismo entre la T y la FSH podría ser parcialmente explicado por la capacidad de los andrógenos para sensibilizar a la célula de Sertoli ante el estímulo de la hormona hipofisaria (31,32).

Tindall y Means (33), sin embargo, atribuyen el aparente efecto estimulador de los andrógenos sobre la síntesis de ABP a una estabilización de la proteína durante el procedimiento de homogeneización, y sostienen que es la FSH quien ejerce el control primario sobre su producción. A esta hipótesis se opondrían, no obstante, las evidencias que indican la andrógeno dependencia de la célula de Sertoli, y la presencia en su citoplasma, de receptores específicos para DHT, similares a los descritos en otros tejidos efectoros (34). Por otra parte, si bien es cierto que los animales inmaduros presentan una gran sensibilidad a la FSH, ésta va disminuyendo durante el proceso de maduración, quedando la síntesis de esta proteína en el animal adulto bajo el control estricto de los andrógenos (35).

Más controvertido aún resulta el problema del posible significado fisiológico de la ABP.

Hansson y col. (34) han propuesto que, dada su capacidad de unir andrógenos, la ABP podría constituir un medio de transporte para los mismos hacia el epidídimo. Esta suposición se apoyaría en las altas concentraciones de andrógenos requeridas para la maduración de espermatozoides en el epidídimo y en la correlación existente entre dichas concentraciones y los niveles de ABP (36). Por otra parte, y a semejanza de la proteína transportadora plasmática, la unión de los andrógenos a ABP podría protegerlos de su metabolización y permitiría mantener un nivel aproximadamente constante de los mismos dentro del túbulo, a pesar de las fluctuaciones diarias de su secreción (37).

Esta hipótesis ha sido parcialmente refutada por Van der Molen (38), basándose en consideraciones sobre el volumen y flujo en los distintos compartimentos intratesticulares. Según este autor, la capacidad total de unión de la ABP y su constante de disociación (2 nM), no le permitirían regular el nivel de andrógenos libres, fisiológicamente activos, intratesticulares, cuya concentración comparativamente alta (20-60 nM), se mantendría

independientemente de la presencia de esta proteína, aparentemente por un proceso de simple difusión desde el intersticio. A su vez, postula que quizás el complejo ABP-DHT posea algún efecto sobre las células germinales.

A pesar de estas discrepancias, existe un acuerdo general en que los niveles de ABP en testículo y epidídimo constituyen un buen parámetro para evaluar la funcionalidad de la célula de Sertoli, y por lo tanto, la medición de los mismos puede brindar una información útil en las alteraciones de la regulación hormonal de la espermatogénesis.

Metabolismo de andrógenos en tejidos efectores.

Es un hecho actualmente aceptado que la metabolización de la T en sus tejidos efectores es un requisito esencial para la completa expresión de su actividad androgénica.

En próstata de rata, órgano clásico para el estudio del mecanismo de acción de andrógenos, la T es primeramente reducida en su doble enlace en la posición 4, transformándose en 5α -dihidrotestosterona o DHT. La enzima responsable de esta conversión, es la Δ^4 -3-cetoesteroide 5α -reductasa o 5α -reductasa

(E. C. 1.3.1.4.), requiere NADPH como cofactor, y se localiza principalmente en la fracción microsomal, aunque también se encuentra en cantidades apreciables en la fracción nuclear (39).

Nozu y Tamaoki (40) demostraron que la actividad en los núcleos está asociada a la membrana externa, a partir de la cual se originaría el retículo endoplasmático (41). Este hecho y la similitud en los parámetros cinéticos (42) sugieren que se trata en realidad de una misma enzima presente en ambos compartimentos subcelulares.

Por acción de la 3α - y 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasas (3α - y 3β -HDH, E. C. 1.1.1.50 y E. C. 1.1.1.51 respectivamente) la DHT puede ser posteriormente convertida en 3α - o 3β -androstano diol (3α - o 3β -diol).

La actividad de la 3α -HDH se localiza en su mayor parte en la fracción soluble (43,44) y en menor medida en las fracciones nuclear (45) y microsomal (46). Una distribución similar se observa para la 3β -HDH (46).

Ambas enzimas pueden usar tanto NADPH como NADH pero la mayor actividad se registra con el primero de los cofactores (46,43).

Por otra parte, en el caso de la 3 α -HDH, el diferente comportamiento frente a los cambios en el pH en la actividad de la fracción soluble y la particulada permiten suponer la existencia de isoenzimas (47).

Una característica notable de las enzimas mencionadas es el valor extremadamente bajo de sus Km, del orden de 1 μ M o inferiores. Esta alta afinidad es probablemente la que les permite desarrollar su máxima actividad aún con las bajas concentraciones de esteroide presentes normalmente en el tejido.

El esquema descrito para el metabolismo de la T en próstata es igualmente válido para otros órganos sexuales accesorios tales como la vesícula seminal (48) y el epidídimo (44, 50, 51) y estructuras nerviosas como la hipófisis y el hipotálamo (52).

En el caso del testículo la situación es más compleja, ya que si bien se reconoce su capacidad de convertir la T a DHT y a androstanodiolos, existen discrepancias sobre la contribución relativa de los distintos tipos celulares.

Rivarola y col., basándose en estudios de metabolismo "in vitro" (53) y determinación de metabolitos endógenos (54) concluyeron que, en la rata inmadura, los túbulos seminíferos son

capaces de producir proporcionalmente más 3α -diol que el tejido intersticial. Contrariamente, otros autores sostienen que tanto la 5α -reductasa como la 3α -HDH se encuentran fundamentalmente localizadas en el tejido intersticial (55,56). Estas discrepancias podrían ser parcialmente debidas a diferencias en los métodos de obtención de las distintas fracciones y en las condiciones de incubación (55,57).

Por otra parte, a pesar de las diferencias en cuanto a la distribución, es un hecho generalmente aceptado que la actividad específica de la 5α -reductasa y de la 3α -HDH son máximas en el animal inmaduro (58,59) concordantemente con el hecho de que en estos animales el 3α -diol es el principal andrógeno circulante, mientras que en el adulto lo es la T (54,60).

Una posible explicación para estos cambios durante el proceso de maduración estaría dada por los resultados obtenidos por Dorrington y Fritz en cultivos de células aisladas (61,62). Estos autores demostraron que el metabolismo de la T en el túbulo seminífero tiene lugar en la célula de Sertoli y en los espermatoцитos, pero no en las espermátidas. La célula de Sertoli es capaz de convertir la T en 3α -diol mientras que el espermatoцитo

sólo podría reducirla a DHT. Esto indicaría que la elevada actividad específica en los túbulos seminíferos de las ratas inmaduras sería un reflejo de la mayor proporción de las células de Sertoli y espermatoцитos presentes, mientras que en el adulto la disminución de dicha actividad sería una consecuencia del incremento en la proporción de espermátides maduras. Sin embargo, no puede descartarse, como se verá más adelante, la posibilidad de que las variaciones observadas sean producidas por cambios en los niveles hormonales.

Estudios recientes han demostrado además que el testículo posee enzimas capaces de convertir la T en estradiol y en compuestos 7 hidroxilados. La aromatización de la T tiene lugar en la célula de Sertoli (63), mientras que la 7 α -hidroxilasa está localizada fundamentalmente en el tejido intersticial (64). La actividad de esta última enzima aumenta con la edad, en forma inversa a la de la 5 α -reductasa (64,65).

Importancia fisiológica del metabolismo de la T.

Numerosos trabajos han llevado a la conclusión de que la DHT es el andrógeno biológicamente activo y que por lo tanto

la 5α -reducción de la T es un paso esencial en el mecanismo de acción androgénica.

Esta conclusión se basaría fundamentalmente en los siguientes hechos:

1) Luego de inyectar T- ^3H el mayor porcentaje de radioactividad se encuentra como DHT y se halla localizada en los núcleos de los tejidos efectores (66,67). Estos resultados han sido confirmados recientemente a través de la medición de los distintos metabolitos endógenos (68).

2) La DHT resulta más efectiva que la T en la producción de respuestas biológicas tanto "in vivo" (64) como "in vitro" (70).

3) La administración de inhibidores de la 5α -reductasa provoca una disminución en el efecto trófico de la T en animales castrados (70).

A estas evidencias experimentales se sumarían además los casos clínicos de pseudohermafroditismo masculino asociados a una deficiencia congénita en la 5α -reductasa (71).

En cuanto a las 3α y 3β -HDH su papel fisiológico no ha sido hasta el momento establecido en forma concluyente. Dado

que ni el 3α ni el 3β -diol se unen apreciablemente al receptor citoplasmático para andrógenos y que sus concentraciones en el núcleo son prácticamente no detectables (72), es posible suponer que ambas enzimas podrían regular la concentración intracelular de DHT y controlar así su alto poder mitogénico.

Por otra parte ciertos autores postulan la existencia de acciones específicas para los androstanodiolos. Baulieu y col. (73) han sugerido que el 3β -diol estaría involucrado en la regulación de la actividad secretoria del epitelio prostático. Este metabolito es igualmente capaz de mantener la espermatogénesis en ratas hipofisectomizadas (74).

En cuanto al 3α -diol, diferentes autores han demostrado su eficacia en la manutención de la viabilidad de espermatozoides (75) y de los niveles de ABP en el epidídimo (76), y en la supresión de LH en animales castrados (77).

Sin embargo, considerando la reversibilidad de las reacciones de reducción, se hace difícil discernir si las acciones mencionadas son producidas por los androstanodiolos "per se" o a través de su reconversión a DHT, debiéndose las diferencias en la actividad biológica "in vivo" a las distintas velocidades de depu

ración plasmática o al grado de asociación a proteínas séricas (78).

Regulación hormonal del metabolismo de andrógenos

La actividad de la 5α -reductasa en próstata y epidídimo es dependiente de andrógenos, tal como lo demuestra la notable disminución de dicha actividad luego de la castración y su restablecimiento por tratamiento con T (79,80).

El tratamiento con T de animales intactos puede elevar la actividad de esta enzima por encima de los niveles normales en próstata (81) pero no así en epidídimo (80).

La andrógeno dependencia de la 5α -reductasa constituye un mecanismo singular de amplificación de la acción androgénica, ya que la T induce su propia activación. Este sin embargo no parece ser un mecanismo generalizado para todos los tejidos efectores de andrógenos, ya que en el túbulo seminífero la T tendría un efecto inhibitorio sobre la actividad de la 5α -reductasa (82, 83). En este tejido la enzima estaría principalmente bajo el control de la LH y FSH (83).

En hipófisis e hipotálamo, los andrógenos ejercerían

igualmente un control negativo sobre la actividad de la 5α - reductasa (52) en forma similar a lo que se observa en adrenal (84).

Los esteroides adrenales y el estradiol son, por otra parte, capaces de inhibir la 5α -reductasa en próstata (74). El efecto inhibitorio del estradiol, como así también el de ciertos esteroides sintéticos, es particularmente evidente en experiencias "in vitro" (85, 86).

La regulación de las 3α y 3β -HDH en tejidos efectores de andrógenos ha sido considerablemente menos estudiada.

La castración no altera la actividad de la 3α -HDH en próstata de rata (87), pero si en epidídimo donde esta actividad disminuye notablemente, siendo normalizada por tratamiento con T (88, 89, 90).

Por otra parte, la adición de FSH produce sólo un leve aumento en la conversión de DHT a 3α -diol en cultivo de células de Sertoli, mientras que el pasaje de testosterona a DHT se incrementa en un cien por ciento (91).

Receptores para andrógenos.

Se ha convenido en designar con el término de receptor para una hormona determinada, al componente celular capaz de unirse a dicha hormona en forma específica y con alta afinidad, y de producir como consecuencia de esta unión una respuesta biológica definida.

En los tejidos efectores para andrógenos ha sido descrita la presencia de una proteína citoplasmática que une preferentemente DHT y en menor medida T. Su coeficiente de sedimentación, de alrededor de 8 S , puede transformarse en 4,5 S por calentamiento a 20 °C o por aumento de la fuerza iónica (92, 93, 94). El peso molecular aproximado, para la forma 8 S , es de 276000 (92) y la constante de disociación para la DHT del orden de 10^{-9} M .

Experiencias "in vitro" con DHT - ^3H han demostrado que, en próstata de rata, la radiactividad asociada al pico de 4,5 S puede ser transferida al núcleo (94) donde se la encuentra asociada a una porción no histónica de la cromatina a la que se ha denominado aceptor (96).

Por otra parte, cuando los núcleos son extraídos con

KCl 0,4 M, se obtiene un complejo de coeficiente de sedimentación ligeramente inferior al del citoplasmático (97), lo que sugeriría la existencia de un proceso de activación previo a la translocación, cuya naturaleza no ha sido establecida hasta el momento.

El esquema antes mencionado ha sido parcialmente verificado en otros tejidos andrógeno dependientes tales como el epidídimo (98) y el túbulo seminífero (99).

Numerosas evidencias indican por otra parte que la unión de la DHT a esta proteína citoplasmática, es parte integrante del mecanismo de acción androgénica y autorizan a considerar a dicha proteína como su receptor específico.

Esta evidencias podrían sumarse en los siguientes hechos:

- 1) La estrecha correlación existente entre la capacidad de unión de distintos esteroides a la proteína citoplasmática, medida a través del desplazamiento de DHT-³H, y su poder androgénico (100).

- 2) Los compuestos capaces de bloquear el efecto de los andrógenos, conocidos como anti-andrógenos, inhiben la formación del complejo receptor-DHT(66,101).

3) El complejo receptor-DHT aislado puede estimular, en próstata, la actividad de la ARN polimerasa ADN dependiente (102).

4) Tanto en el síndrome de testículo femineizante como en las cepas mutantes de animales tfm, caracterizados por poseer cariotipo XY con fenotipo femenino e insensibilidad a los andrógenos, no es posible detectar el receptor citosólico 8 S (103).

Existen no obstante ciertas evidencias que indican que no todas las acciones de los andrógenos estarían mediadas por la unión de la DHT al receptor citoplasmático, especialmente aquellas que no se verificarían a nivel nuclear, tales como las producidas por la T o el 3α -diol (4, 104).

Como consecuencia de la interacción del complejo receptor-DHT con la cromatina se produciría un incremento de la actividad de templado que conduciría finalmente a la manifestación de las respuestas típicas de la acción hormonal en cada tejido.

La naturaleza de estos fenómenos, que ha sido exhaustivamente analizada por Mainwaring (4) y Liao (97), no se tratará en detalle en el presente estudio, cuyo interés se centrará prin-

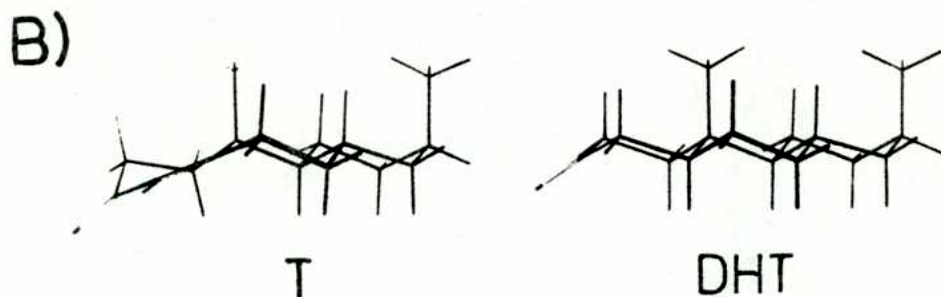
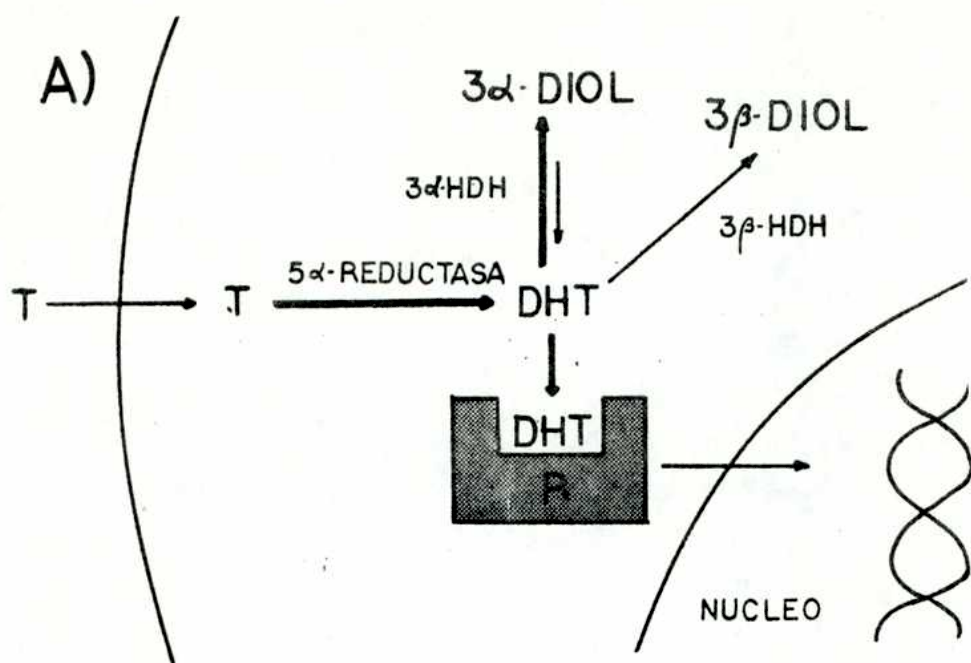
principalmente en los procesos que tienen lugar desde la producción de la T en la célula de Leydig hasta la formación del complejo receptor-DHT (Ver esquema general del metabolismo en la pag. 27).

Regulación del receptor citoplasmático para andrógenos.

Tal como ocurre con la 5α -reductasa, la concentración del receptor citoplasmático para DHT es dependiente del aporte de andrógenos testiculares. El contenido del receptor en próstata de rata disminuye rápidamente luego de la castración, pudiendo ser restablecido por tratamiento con T o DHT (105,106).

Sullivan y Stroot (107) han propuesto la existencia de un mecanismo adicional, no dependiente de andrógenos, para la regulación del receptor en próstata, basándose en la recuperación por ellos detectada, alrededor del cuarto día luego de la castración. Sin embargo esta recuperación es evidente sólo cuando expresan sus resultados como concentración por mg de proteína o por ug de ADN, ya que el contenido total del receptor, por órgano, continúa decreciendo a través del tiempo post-castración.

En el epidídimo, si bien se han presentado ciertas evi-



Esquema simplificado del metabolismo de la T en los tejidos efectores de andrógenos (A) y configuración de los anillos A y B de la T y la DHT (B) según Liao (100). La mayor planaridad de la molécula de DHT le conferiría una mayor afinidad por el receptor, en tanto que la reducción del carbonilo en la posición 3, en el caso del 3 α y 3 β -diol, impediría su unión con el mismo.

dencias en sentido opuesto (108,109,110), la situación parece ser esencialmente la misma, observándose una rápida disminución en el contenido del receptor luego de la castración que es revertida por tratamiento con andrógenos (111,112,113,114).

Objetivos de la presente investigación.

La información presentada resumiría el conocimiento actual sobre los factores involucrados en la regulación del mecanismo de acción de andrógenos. Existen sin embargo ciertas evidencias de que otros factores hormonales, además de los mencionados, podrían ejercer un efecto regulatorio sobre la acción de la T en sus tejidos efectores. Estos son la prolactina, la insulina y los andrógenos administrados durante el período neonatal.

El objeto de la presente investigación es estudiar el efecto de dichos factores sobre el transporte, el metabolismo y la unión de los andrógenos a sus receptores específicos. Finalmente se analizará la existencia de interrelaciones entre estos parámetros como un posible mecanismo de regulación intracelular.

Con el objeto de facilitar la exposición y el análisis de los resultados cada uno de los temas será tratado por separado, siendo precedido por la correspondiente introducción.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus albinus* variedad Wistar). Los animales fueron mantenidos a temperatura constante (25°C), con períodos de luz de 12 horas y 12 horas de oscuridad y recibieron dieta balanceada y agua "ad libitum".

Obtención de los animales diabéticos

La diabetes se produjo, en animales de 60 días de edad, mediante la inyección de estreptozotocina (Upjohn Co. lot 60140) (droga que destruye selectivamente las células beta del páncreas) por vía endovenosa en una dosis de 65 mg por kilogramo de peso corporal. La droga se preparó en solución salina acidificada con unas gotas de ácido cítrico 0,025 M hasta ajustar el pH a 4,5.

El éxito del tratamiento se evaluó 3 días después de la inyección, determinando la concentración de glucosa en sangre mediante tiras reactivas Destrotix. Se consideraron diabéticos aquellos animales que presentaron una marcada hiperglucemia

conjuntamente con glucosuria y poliuria.

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

Tratamiento con insulina de los animales diabéticos

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

Tratamiento con testosterona de los animales diabéticos

Las distintas dosis de propionato de testosterona (PT) (50-5000 ug/rata/día) se inyectaron subcutáneamente en un volumen de 0,1 ml de aceite vegetal. Los animales control recibieron aceite vegetal solamente. El tratamiento se prolongó durante 10 días a partir de los 20 días de la inyección de estreptozotocina.

Tratamiento con prolactina

Se usó prolactina ovina (NIH PS-12) (PRL_o), disuelta en solución salina (NaCl 0,85%) ajustada a pH 9,0 con NaOH 0,1 N. Las distintas dosis (5-500 ug/rata/día) se dividieron en dos inyecciones subcutáneas de 0,1 ml dadas a las 10.00 y 18.00 hs. Los animales control recibieron solución salina.

El tratamiento se prolongó durante 10 días comenzando a los 30 días de edad. Los animales fueron sacrificados por decapitación aproximadamente 16 hs después de la última inyección. La sangre se recogió para los ensayos hormonales correspondientes.

Tratamiento con drogas que modifican la secreción de prolactina

Con el fin de suprimir la liberación de prolactina (PRL) los animales fueron tratados con mesilato de 2-Br- α -ergocriptina, (CB-154, Sandoz, Suiza), agonista dopaminérgico que inhibe la secreción hipofisaria de dicha hormona (115). La bromocriptina, previo agregado de igual cantidad de ácido tartárico, fue disuelta en etanol 70% - solución fisiológica (30:70 v/v) y se administró a razón de 3 mg/kg de peso/día.

El sulfato de sulpirida fue obtenido comercialmente (Vipral, Roemmers) y se inyectó en una dosis de 43 mg/kg de peso/día.

La solución de pimocida se realizó en tartárico 0,1 M y fue posteriormente diluída con solución salina. La dosis inyectada fue de 630 ug/kg de peso/día.

Para las tres drogas mencionadas la edad de los animales y el esquema de las inyecciones fue el mismo que para la PRL_o.

Obtención de animales androgenizados

Los animales, (en este caso de la cepa Instituto de Fisiología, de la Facultad de Medicina), recibieron una única dosis de PT (1 mg/rata), en el primer día de vida post parto.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación a los 90 días de edad utilizándose su sangre para los estudios hormonales.

Determinación de la concentración de la proteína transportadora de andrógenos (ABP)

Dado que la velocidad de disociación del complejo ABP-

DHT es alta ($t_{1/2} 0^{\circ}\text{C} = 6 \text{ min}$) (116) comparada con el tiempo requerido para la separación del esteroide unido del libre, se hace necesario, para la medición de esta proteína, el uso de un método en condiciones de estado estacionario, es decir en el que las velocidades de asociación y disociación sean iguales.

El método utilizado, electroforesis en estado estacionario descrito por Ritzén (117), combina la alta resolución de la electroforesis en geles con las ventajas del estado estacionario. Básicamente, el método consiste en disolver el ligando marcado, en este caso DHT- ^3H , en la solución de acrilamida antes de su polimerización, con lo que durante su paso a través del gel, el esteroide unido se encuentra siempre en equilibrio con una concentración constante de hormona libre.

Preparación de las muestras: Los animales fueron muertos por decapitación. Los testículos decapsulados y las cabezas de epidídimo fueron homogeneizadas en buffer Tris-HCl 10 mM conteniendo 1,0 mM EDTA, 1,0 mM 2-mercaptoetanol, 10% en glicerol, de pH 7,4, en una relación 1:3 p/v. Todas las operaciones se realizaron a $0-4^{\circ}\text{C}$. Los homogenatos se centrifugaron a $105\ 000 \times g$ durante 60 min y los sobrenadantes fueron incubados con agita-

ción constante con carbón (1 mg/mg de proteína) durante toda la noche, con el fin de eliminar los esteroides endógenos. Luego de la incubación, el carbón se separó por centrifugación a 10 000 x g durante 30 min. En experimentos posteriores la adsorción con carbón fue obviada por comprobarse que no modificaba el valor final. Las muestras, previa extracción de alícuotas para la determinación de proteínas, fueron conservadas a -20°C.

Electroforesis en geles de poliacrilamida: Los geles fueron confeccionados de acuerdo con lo descrito por Davis (118) con el agregado de glicerol al 10% en el gel de resolución para aumentar la solubilidad del esteroide. La DHT-³H (Dihidrotestosterona 1,2,4,5,6,7 ³H(N) A. E. 123 Ci/mmol, New England Nuclear) fue evaporada a sequedad y disuelta en las soluciones de gel de modo tal que las concentraciones fueran 15 nM para el gel compactador y 2 nM para el gel de resolución. Se usaron tubos de 5 mm de diámetro interno siendo las longitudes correspondientes al gel compactador y al de resolución de 10 y 65 mm respectivamente.

En cada gel se sembraron entre 300 y 800 ug de protef-

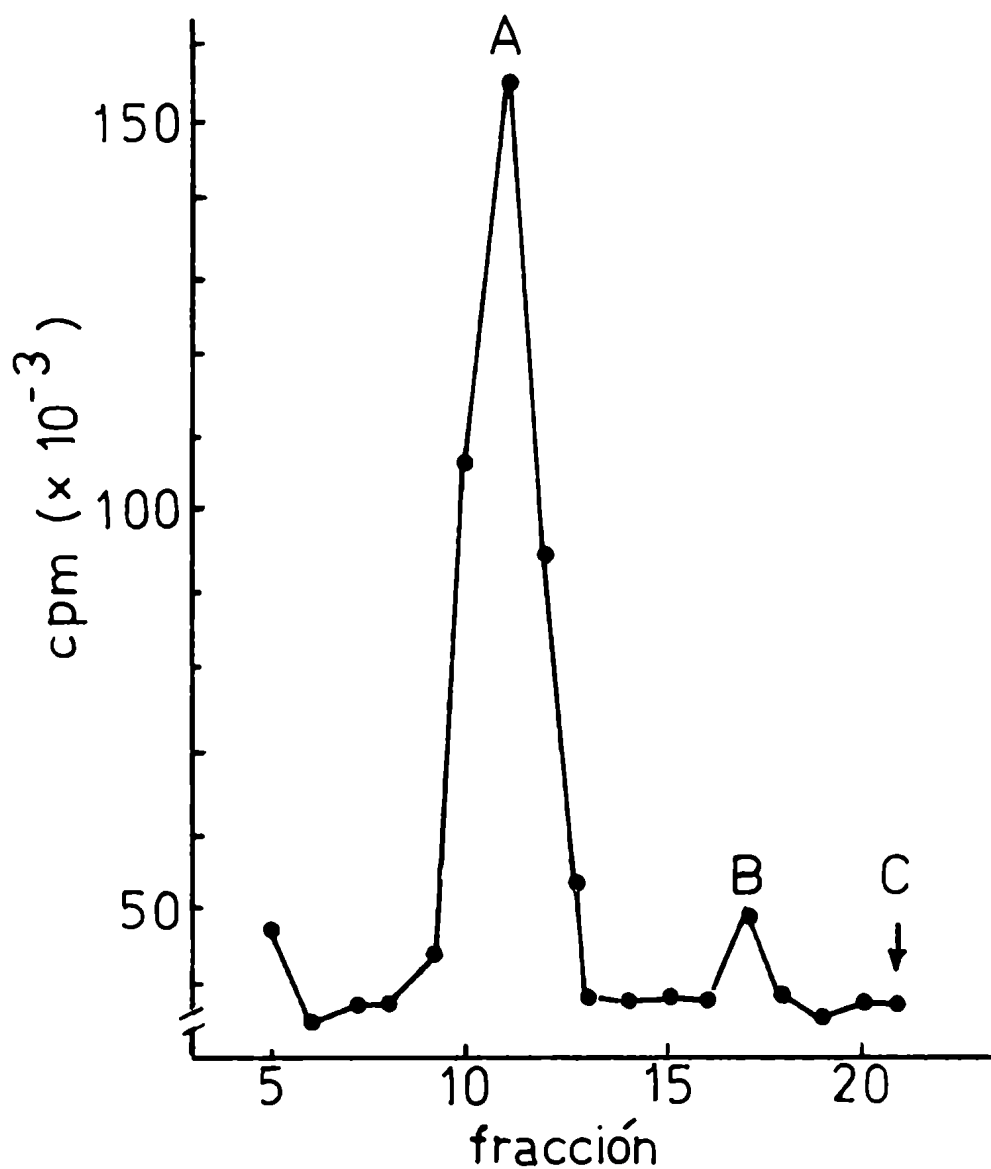
na en un volumen máximo de 200 ul. Los geles se sumergieron totalmente en el buffer de corrida (Tris - glicina pH 8,6); en la cámara electrolítica superior se agregaron unas gotas de azul de bromofenol como indicador del frente de corrida. La electroforesis se realizó a 0°C durante 7 hs a 2 mA por tubo hasta un máximo de 150 V.

Finalizada la corrida electroforética los geles fueron cortados transversalmente en secciones de 2 mm de espesor que se colocaron en viales de polietileno (50 x 12 mm), se les agregó 3 ml de tolueno centelleante y se contaron 12 a 14 hs más tarde. En estas condiciones el 98% de la radiactividad fue extraída por el tolueno. (Ver Figura de la pag. 36).

Cálculo de los resultados

En condiciones de estado estacionario es válida la ley de acción de masas y por lo tanto, considerando un solo sitio de unión por molécula de proteína, puede plantearse la ecuación:

$$K_d = \frac{(ABP) \cdot (DHT)}{(ABP-DHT)} \quad (I)$$



Perfil típico de radioactividad en los geles usados para la determinación de ABP. A : ABP; B : albúmina; C : indicador de corrida.

Donde:

K_d : constante de disociación = $2 \cdot 10^{-9} M$.

(DHT) : concentración de esteroide libre, se determina a partir de la actividad específica y de la radioactividad medida en un volumen conocido del gel.

(ABP-DHT) : concentración del esteroide unido, se obtiene de la radioactividad medida en el pico correspondiente, luego de sustraer el "background" de esteroide libre (nivel de radioactividad delante y detrás del pico).

(ABP) : sitios libres de unión.

Por otra parte:

$$(ABP_{total}) = (ABP) + (ABP-DHT)$$

Luego sustituyendo en (I) y despejando la concentración total de la proteína transportadora:

$$(ABP_{total}) = (ABP-DHT) \cdot (K_d / (DHT) + 1)$$

Como ABP_{total} y ABP-DHT están igualmente distribuidas en el mismo volumen, las concentraciones molares pueden reemplazarse por las cantidades totales en moles.

$$ABP_{total} = ABP-DHT (K_d / (DHT) + 1)$$

Los resultados se expresan usualmente como pmoles/mg de proteína o pmoles/órgano.

Metabolismo de andrógenos

Obtención de 3α -diol- ^{14}C

El 3α -diol- ^{14}C se obtuvo a partir de DHT- ^{14}C (Dihydrotestosterone-4- ^{14}C , New England Nuclear A. E. 57,5 mCi/mmol, mediante una preparación de 3α -HDH parcialmente purificada de próstata de rata.

Para la obtención de la enzima se homogeneizaron próstatas de ratas adultas en buffer Tris 50 mM, 0,25 M en sacarosa, 1,5 mM en EDTA, 1 mM en DTT, pH 7,4 (buffer R), en una relación 1:3 p/v. La homogeneización se llevó a cabo a 0-4°C usando un homogeneizador Polytron (Kinemática, Steinhofhalde). El

homogenato se filtró a través de Nytex 50 y se centrifugó a 150 000 x g por 1 h a 4°C en una ultracentrífuga Beckman L2-65B. La fracción citosólica así obtenida se precipitó con sulfato de amonio en el rango 0-40% de saturación, mediante el agregado, gota a gota, de una solución de sulfato de amonio al 80% previamente neutralizada. Se dejó reposar durante 40 min a 0°C luego de los cuales se centrifugó 30 min a 10 000 rpm usando una centrífuga International B 20. El sobrenadante fue llevado al 80% de saturación por agregado de sulfato de amonio sólido. Luego de 40 min se centrifugó nuevamente, el precipitado fue resuspendido en el mismo buffer en una relación de 5 ml por gramo de tejido original y separado en alícuotas de 0,5 ml que se conservaron congeladas a -20°C. En estas condiciones la enzima resultó activa por varios meses.

Para la obtención del 3 α -diol-¹⁴C, aproximadamente 2.10⁶ cpm de DHT-¹⁴C se incubaron con 0,5 ml de la preparación enzimática y NADPH en una concentración final de 1 mg/ml, durante 1 h a 37°C. La reacción se detuvo mediante el agregado de 2 ml de acetato de etilo. La separación de fases se efectuó por congelamiento a -70°C. La extracción se repitió con otros 2 ml

de acetato de etilo. Las fases orgánicas se reunieron y se llevaron a sequedad. El extracto se tomó con 3 gotas de cloroformo-metanol 1:1 y se sembró en una placa delgada de sílica gel (Merck, 60 F 254) que se desarrolló con un sistema de cloroformo-éter etílico 4:1 o cloroformo-metanol 98:2. La DHT- ^{14}C remanente y el 3α -diol- ^{14}C se localizaron mediante un radiocromatógrafo Scanner Packard modelo 385. El cálculo de las áreas de los picos permite calcular el rendimiento que osciló entre el 50 y el 85%. Las zonas correspondientes a DHT y 3α -diol se eluyeron con cloroformo-metanol 1:1. El 3α -diol se recromatografió en papel Whatman 3 usando un sistema Bush A (n-hexano-metanol-agua 10:9:1). Este sistema separa los isómeros 3α y 3β . Se comprobó que el esteroide obtenido corresponde en un 98% al isómero α . El 3α -diol fue finalmente eluído con metanol.

Obtención de 3β -diol- ^{14}C

El 3β -diol- ^{14}C se obtuvo por reducción química de la DHT- ^{14}C con borohidruro de sodio. Aproximadamente 2.10^6 cpm de DHT- ^{14}C se llevaron a sequedad en un tubo de ensayos al que se agregó 0,1ml de una solución de BH_4Na (K & K Labo-

ratories Inc.) (6mg/ml en metanol). Se dejó reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego de los cuales se agregó 1 ml de agua destilada. Se efectuaron dos extracciones con 2 ml de acetato de etilo y se procedió a la separación cromatográfica tal como se indicó para el 3α -diol. El análisis radiocromatográfico indicó que la eficiencia de la reducción de la DHT es prácticamente del 100 %. En la cromatografía en papel se obtienen dos picos, uno correspondiente al 3β -diol (60 %) y otro (40 %), a un producto de movilidad similar al 3α -diol pero distinto de éste, según se dedujo de los datos de cristalización.

La zona correspondiente al 3β -diol se eluyó con metanol.

Aislamiento de túbulos seminíferos por tratamiento con colagenasa.

Se utilizó la técnica descrita por Mendelson y col.(119) usando colagenasa (Worthington) para la dispersión del tejido tubular.

Los testículos descapsulados, colocados en tubos de plástico (Falcon)(6 testículos por tubo), fueron suspendidos en Medio 199 (Difco Co.) en la relación de 1 testículo por ml de medio conteniendo 0,3 mg de colagenasa/ml. La incubación se realizó a

37°C durante 15-20 minutos en un incubador Dubnoff, bajo atmósfera de carbógeno (95 % O₂-5 % CO₂) con agitación constante.

Con el objeto de dispersar mejor el tejido, se agitó en forma rotatoria el tubo incubado, durante 3 minutos dejándolo reposar otros 3 minutos. Finalizada la incubación la reacción se detuvo por dilución con Medio 199 frío (8 ml por cada ml de incubación). La suspensión se filtró a través de Nitex 50. Los túbulos se lavaron con 2 volúmenes de Medio 199 frío, se secaron sobre papel de filtro y se pesaron.

Determinación de la actividad de la 5 α -reductasa en homogenato total.

Las próstatas y epidídimos, previamente disecados y liberados de tejido conectivo y graso, y los túbulos aislados, se homogeneizaron en buffer R en una relación 1:10 (p/v) en un homogenizador Polytron. El homogenato se filtró por Nitex 50 y 1,5 ml del mismo se incubaron con T-³H (Testosterone 1,2,6,7-³H (N), A.E. 98,8 Ci/ mmol, New England Nuclear)(600 000 cpm), T no radiactiva (0,36 . 10⁻⁶ M) y NADPH 4.10⁻⁴ M, a 37°C.

A los tiempos 0, 7,5 y 15 minutos se tomaron alícuotas de 0,5 ml que se transvasaron a tubos conteniendo 1,5 ml de acetato de etilo con el fin de detener la reacción. A cada uno de los tubos se agregaron 3.000 cpm de 3α -diol- ^{14}C y 3.000 cpm de DHT- ^{14}C (para evaluar pérdidas), y 20 ug de T y Δ^4 -androstenediona no radiactivas (Sigma). La extracción y separación de los esteroides por capa delgada de sílicagel se realizó según se describió anteriormente. Las zonas correspondientes a T y Δ^4 -androstenediona se localizaron por su absorción a la luz ultravioleta.

Paralelamente se corrió una placa con esteroides patrón que fue revelada con ácido fosfomolibdico. Tomando como referencia esta placa y la ubicación de la T y Δ^4 -androstenediona en cada uno de los cromatogramas, se procedió a separar las zonas de 3α / β -dioles y DHT. Las porciones de sílica fueron colocadas en sendos viales a los cuales se agregó 0,5 ml de metanol y 6 ml de líquido centellante (tolueno conteniendo 0,5 % PPO y 0,05 % POP OP).

Determinación de la actividad de la 3α - HDH en homogenato total

En este caso, 60 ul del homogenato se llevaron a 1,5 ml

con buffer R en un vial conteniendo 600.000 cpm de DHT-³H (New England Nuclear, A.E. 123 Ci/ mmol), $0,36 \cdot 10^{-6}$ M de DHT (Steraloids), $4 \cdot 10^{-4}$ M en NADPH. Las alícuotas fueron como en el caso anterior de 0,5 ml y fueron tomadas a los tiempos 0, 10 y 20 minutos. Una vez detenida la reacción se agregaron 5.000 cpm de 3α -diol-¹⁴C e igual número de cuentas de 3β -diol-¹⁴C. Los extractos se cromatografiaron directamente en papel. Las zonas correspondientes a los esteroides, ubicadas mediante el radiocromatógrafo, se eluyeron con metanol (2 veces con 2 ml). El extracto metanólico se llevó a sequedad en un vial de conteo al que se agregó el líquido centellante.

Actividad de la 5α -reductasa en la fracción microsomal.

Los tejidos se homogeneizaron en buffer R, tal como se describió anteriormente, en una relación 1:3 (p/v). El homogenato se centrifugó a 17.000 x g durante 30 minutos, el precipitado se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 105.000 x g durante 1 h. Este último sobrenadante se usó para el ensayo de la 3α -HDH en la fracción soluble, mientras que el precipitado fue re-suspendido en buffer R en una proporción de 3 ml por g de tejido

original. Para la determinación de la actividad enzimática, 0,5 ml de esta fracción se incubaron con 200.000 cpm de T-³H, 0,35 .10⁻⁶ M de T y 4.10⁻⁴ M de NADPH a 37°C durante 1 h (la velocidad de reacción se mantiene lineal durante este período). La reacción se detuvo por agregado de acetato de etilo procediéndose para la extracción y separación como se indicó para los homogenatos.

Actividad de la 3 α -HDH en la fracción soluble.

En este caso, 15 ul del sobrenadante de 105.000 x g fueron incubados con 250.000 cpm de DHT-³H, 0,35. 10⁻⁶ M de DHT y 4.10⁻⁴ M en NADPH en un volumen final de 0,5 ml de buffer R.

El tiempo de incubación fue de 20 minutos a 37°C. La extracción y separación se efectuaron en la forma ya descripta.

Estudios enzimáticos en hipófisis e hipotálamo.

En estos casos la relación de homogenización fue de 1:30. Dada la baja actividad enzimática en estos órganos y la poca disponibilidad de tejido sólo fue posible efectuar las incubaciones a partir de T-³H. La actividad de las 3 α y 3 β -HDH se es-

timó mediante el cálculo de la relación $3\alpha + 3\beta$ -diol/ DHT formados.

Cálculo de las actividades.

La corrección por pérdidas se realizó mediante la medición simultánea de ^{14}C y ^3H por el método de Okita (120). Para evitar los errores debidos al "quenching", los estándares de ^{14}C y los sustratos tritiados fueron contados en las mismas condiciones en que se encuentran las muestras luego de las separaciones cromatográficas.

La actividad de la 5α -reductasa se expresó como la velocidad inicial de formación de los productos 5α -reducidos (DHT, 3α y 3β -diol), en tanto que para la 3α y 3β -HDH se consideraron las velocidades de formación de los dioles respectivos.

En el caso de los homogenatos los resultados son el promedio de tres preparaciones distintas por cada grupo.

Radioinmunoensayo.

Los niveles plasmáticos de 3α y 3β -diol se midieron usando anticuerpos específicos (anti 3α -3-4 A 3α -diol 15 BSA

y R⁺ 39-40 A - 3 β -diol - 7BSA) gentilmente cedidos por los doctores B. Kounetzova y F. Dray (121) y los correspondientes trazadores radiactivos (Androstan-3 α , 17 β -diol-5 α -1,2-³H (N) y Androstan-3 β , 17 β -diol-5 α -1,2-³H (N) provistos por New England Nuclear y Amersham respectivamente).

El dosaje de T se realizó mediante la utilización de un suero anti-T obtenido por inmunización activa de conejos con un conjugado de T-BSA preparado por acoplamiento de la carboximetil oxima de la T a BSA. Este anticuerpo da una alta reacción cruzada con la DHT y por lo tanto ambos esteroides fueron determinados en forma conjunta.

Para la determinación del estradiol sérico se usó un anticuerpo altamente específico (estradiol-6-carboximetoxima-BSA) gentilmente cedido por los doctores K. Pirke y P. Doerr (Max Planck Institut, Munich) y ³H-estradiol (New England Nuclear).

Para las determinaciones hormonales se extrajeron alícuotas de los sueros con éter etílico (Merck), en dos veces con 5 ml. El residuo evaporado de los extractos fue resuspendido en 0,5 ml de buffer de ensayo (Na₂HPO₄·7H₂O 0,04 M; NaH₂PO₄·H₂O 0,03 M; azida sódica 0,015 M; NaCl 0,15 M; EDTA 10 mM y gelatina

0,1 %, pH 7,0). Un alícuota apropiada fue utilizada para el ensayo del esteroide en cuastión. La separación de la hormona libre se efectuó por agregado de 0,2 ml de una suspensión de carbón (Norit A)- dextrano(70), 0,5-0,05 % (p/v), en el buffer de ensayo.

Los niveles séricos de PRL y LH fueron determinados mediante radioinmnuensayo usando una técnica de doble anticuerpo. Los equipos correspondientes fueron provistos por la NIAMDD Rat Pituitary Agency. Las hormonas fueron marcadas mediante la técnica de la lactoperoxidasa que se describe posteriormente. Las concentraciones de las gonadotrofinas fueron expresadas en ng/ml tomando como base el estándar suministrado (RF-1).

T tisular

Para la determinación de la T tisular se descapsularon los testículos y se homogeneizaron en 3 ml de NaCl 0,15 M conteniendo 5 % de etanol. La extracción se realizó con 10 ml de acetato de etilo (2 veces) previo agregado de 8 000 dpm de T-³H. La separación de los esteroides se realizó en columnas de celite-propilenglicol (1:1) (0,5 x 13 cm) usando las siguientes mezclas de solventes: n-hexano: tolueno (4:1) 2 ml (lavado); n-he-

xano:tolueno (3:1) (DHT); n-hexano:tolueno (1:1) (T); n-hexano:tolueno (2:3), 5 ml y n-hexano:tolueno (3:7), 10 ml ($3\alpha + 3\beta$ -diol). El residuo seco de la hormona purificada fue redissuelto en 500 μ l de buffer de ensayo y se tomaron de allí las alícuotas correspondientes para evaluar pérdidas y para medir T por radioinmunoensayo.

Estudios de unión de andrógenos a sus receptores específicos

Para los estudios de unión de andrógenos se usó un andrógeno sintético, la metiltriienolona (R1881) que se une a los receptores específicos con alta afinidad y presenta la ventaja de no ser metabolizable (122). Se preparó una solución madre de 50 nmol/l de R1881- 3 H (17 hydroxy-17 methyl-4.9.11-estratrien-3-one- 3 H, New England Nuclear, A.E. 87,0 Ci/mmol) en benceno-etanol (9:1). La solución de R1881 radioinerte (10 nmol/ml) se preparó en etanol absoluto.

El tejido fue homogeneizado a 0-4°C en buffer Tris 10 mM conteniendo EDTA 1,5 mM, MgCl 1 mM y sacarosa 0,25 M pH 7,4 (buffer A) en una relación 1:8 (p/v) usando un homogeneizador Polytron. Los homogenatos fueron filtrados a través de

Nytex 50 y centrifugados a 800 x g por 20 min a 4°C. El precipitado fue usado para los estudios de unión a la fracción nuclear, y el sobrenadante fue centrifugado a 105 000 x g por 1 hora a 2-4°C con el fin de obtener la fracción soluble o citosol.

Remoción de la hormona libre endógena

La hormona endógena libre fue removida de la fracción soluble mediante la incubación con buffer carbón-dextrano (CD-1) (0,5 % dextrano T 70 y 5 % No rit A en buffer A) en una relación 10:1 (v/v) a 0-4°C por 10 min. Los tubos fueron centrifugados a 3 700 x g a 4°C por 20 min. Se tomaron alícuotas para la determinación de proteínas y la fracción soluble adsorbida remanente se utilizó para la medición de sitios de unión libres y totales.

Medición de sitios libres de unión en citosol

Alícuotas del citosol (100 ul conteniendo aproximadamente 600 ug de proteína) se incubaron en condiciones de intercambio despreciable (16 h a 0°C) con R1881-³H (0,42-6 nM) en presencia o ausencia de un exceso de 500 veces de R1881 no radioactivo. La separación del R1881 libre del unido se efectuó mediante el agre-

gado de 50 ul de buffer carbón-dextrano (CD-2) (0,625 % dextrano y 1,25 % de carbón en buffer A) a 0°C por 10 min. Luego de centrifugar a 800 x g por 15 min se tomaron alícuotas de 100 ul de los sobrenadantes con el objeto de medir la radioactividad unida. En experimentos posteriores se usó una sola concentración saturante de R1881-³H (6 nM).

Medición de los sitios de unión totales por intercambio

La medición de los sitios totales de unión se llevó a cabo usando la técnica descrita por Bonne y Raynaud (122). Primeramente, para saturar los sitios de unión libres, el citosol adsorbido se incubó con DHT 10 nM a 0-4°C por 1 h. El exceso de DHT fue luego removido por agregado de carbón-dextrano (CD-1) en una relación 1:10 (v/v) y posterior centrifugación a 3 700 x g por 20 min. Alícuotas de 100 ul del citosol saturado se incubaron con R1881-³H (4-48 nM) a 15 °C durante 16 horas. La unión inespecífica se determinó por incubaciones paralelas con un exceso de 500 veces de R1881 radioinerte por cada concentración de hormona marcada. La separación del R1881-³H libre y unido se llevó a cabo como se mencionó anteriormente. La radioactividad uni-

da fue determinada en alícuotas del sobrenadante. Se encontró que la saturación de los sitios totales de unión se alcanza a una concentración 20 nM y consecuentemente se usó esta concentración en los experimentos posteriores.

Estudios de unión a la fracción nuclear

El precipitado obtenido luego de la centrifugación a 800 x g del homogenato, fue lavado 2 veces por resuspensión y centrifugación, en 4 volúmenes de buffer A. Los núcleos lavados se extrajeron por incubación a 0-4°C por 1 h en 4 volúmenes de buffer A conteniendo KCl 0,4 M. Luego de la incubación se tomaron alícuotas para la determinación de DNA y la suspensión remanente fue centrifugada a 12 000 x g a 0-4°C por 20 min. El sobrenadante resultante fue usado como "extracto nuclear". La capacidad de unión fue medida por incubación de 100 ul del extracto nuclear (aprox. 35 ug de DNA) con R1881-³H (0,5-10 nM). La determinación de la unión inespecífica se realizó como se describió en la sección precedente y las muestras fueron incubadas por 16 hs a 0°C. La separación de la radioactividad libre y unida se efectuó del mismo modo que para la fracción citosólica.

Cálculo de los resultados

Los resultados se calcularon como ha sido sugerido por Katzenellenbogen y col. (123). La diferencia en dpm entre el citosol o el extracto nuclear marcados con R1881-³H y R1881-³H + R1881 se tomó como medida de la cantidad del receptor de andrógenos. Los resultados se expresaron como fmoles de hormona específicamente unida por mg de proteína o por ug de DNA.

Obtención de PRL marcada con ¹²⁵I

Se utilizó una modificación del método de Thorell y Johansson (124). Para la preparación de la hormona marcada, 5 ug de PRL_o (en Na₂HPO₄ 0,05 M pH 7,4) fueron marcados con 500 uCi de ¹²⁵I, según se indica a continuación:

- 1) PRL_o, 5 ug
- 2) Buffer fosfato de sodio 0,5 M pH 7,4
- 3) ¹²⁵I, libre de portador, en NaOH 0,1 N, 500 uCi (6 ul)
- 4) Lactoperoxidasa bovina (Calbiochem, grado B, cat B, cat. N° 427466) 2,7 mg/ml en buffer Acetato de sodio 0,1 N (4 ul)
- 5) H₂O₂ (300 volúmenes, diluída 1:2000) (4 ul)

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

Cada alícuota, aproximadamente de 0,2 ml, fue purificada por columna de poliacrilamida-agarosa (ACA 54, Ultrogel, LKB, Suecia), separándose la hormona agregada de la utilizable para los estudios de unión al receptor.

La actividad específica obtenida usualmente fue de 30 uCi/ μ g.

Unión de PRL- 125 I a membranas de próstata

Las próstatas de cada grupo fueron homogeneizadas a 0° C en 10 volúmenes de buffer Dulbecco pH 7,4 (PBS), filtradas a través de Nytex 50 y centrifugadas a 17 000 x g en una centrífuga International B 20 a $0-4^{\circ}$ C por 30 min. El precipitado fue resuspendido en 10 volúmenes de PBS conteniendo 0,1 % de BSA y recentrifugados a 17 000 x g por 30 min. El precipitado final fue

resuspendido en 5 volúmenes (5 ml de buffer/g de tejido) conteniendo 0,1 % de BSA y 0,1 % de neomicina.

Alícuotas de 50 ul de la preparación de membrana se incubaron con 10 000 cpm de PRL-¹²⁵I y cantidades crecientes de PRL no marcada (0,7-12 ng) durante 16-20 hs a 22°C, en un volumen final de 200 ul. Luego de la incubación, los tubos fueron centrifugados a 5 000 x g a 2-4°C por 30 min. Los precipitados se lavaron dos veces con el mismo buffer y se volvieron a centrifugar como se indicó. La radioactividad en los precipitados remanentes se determinó usando un contador Beckman 4000 con una eficiencia del 70 %.

Como unión inespecífica se consideró aquella que se verificaba en presencia de 2 ug de PRL no marcada.

Otros métodos

Las proteínas se midieron por el método de Lowry y col. (125) y el DNA por el de Burton (126).

Los datos de unión fueron obtenidos por el análisis de Scatchard (127).

Para el análisis estadístico de los resultados se aplica-

ron el test de t de Student y el test de comparaciones múltiples de Dunnett (128).

I . EFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE EL
MECANISMO DE ACCION DE ANDROGENOS

Las acciones de la PRL no están restringidas al inicio y manutención de la lactación. Muy por el contrario, esta hormona es tal vez un caso único por la variedad de acciones fisiológicas demostradas en los distintos vertebrados. Así por ejemplo, en los anfibios inhibe los cambios metamórficos y es responsable de ciertos aspectos de la conducta de apareamiento. En las aves, induce el crecimiento corporal, la lipogénesis y la secreción de productos nutritivos específicos. La PRL se encuentra también involucrada en la regulación del metabolismo del agua y electrolitos en numerosas especies, desde los teleósteos hasta el hombre.

Esta disparidad de efectos ha llevado a Blum (129) a postular que la molécula de PRL estuvo sujeta a procesos evolutivos, adquiriendo nuevas capacidades durante el curso de la filogenia de los vertebrados. Ello explicaría que el efecto sobre la conducta de los anfibios se halle presente en todas las "prolactinas", incluyendo las extraídas de elasmobranquios, mientras que la actividad luteotrópica aparezca recién en las provenientes de mamí

feros.

En estos últimos, la PRL se halla estrechamente relacionada a la función reproductiva. Este hecho ha sido plenamente establecido en la hembra, en la que las acciones de la PRL tienen lugar a tres niveles distintos: 1) Sinergismo con la LH en la estimulación de la producción de progesterona en las células luteales. 2) Sinergismo con los esteroides gonadales en el desarrollo y manutención de la glándula mamaria y 3) A nivel hipofisario, regulando la secreción de LH.

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

Bartke y col. demostraron que en ratas hipofisectomizadas, la PRL actúa sinérgicamente con la LH en la incorporación de acetato ¹⁴C a T y en la restauración de los niveles plasmáticos de andrógenos (130,131). Estos resultados fueron parcialmente

corroborados por Johnson (132), quien además demostró la existencia de ritmos diarios de sensibilidad del testículo al estímulo conjunto de ambas hormonas.

Por otra parte, la demostración por Charreau y col. (133) de receptores específicos para PRL en el tejido intersticial confirmaría la suposición de que dicho tejido es un efector normal de la PRL.

No obstante, el efecto más evidente de la PRL en el macho es el que ejerce sobre el desarrollo y manutención de los órganos sexuales accesorios.

Las primeras demostraciones al respecto, efectuadas por Grayhack en 1955 (134), permitieron comprobar que el peso de la próstata disminuía más luego de la hipofisectomía que de la castración y que el tratamiento conjunto con PRL y T en animales hipofisectomizados era más efectivo que con T solamente.

Estos resultados fueron confirmados posteriormente por distintos autores, comprobándose además que el efecto de la PRL era particularmente evidente en animales inmaduros.

El peso de los órganos sexuales accesorios aumenta significativamente en ratas inmaduras cuando se elevan sus nive-

les de PRL mediante un implante de hipófisis en la cápsula suprarrenal (135). Contrariamente, el tratamiento desde el nacimiento con anticuerpos anti-PRL produce una disminución del peso de próstata y vesícula seminal tanto en la rata (136) como en el conejo (137).

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

El implante en ratas machos de un tumor productor de PRL induce hipogonadismo y atrofia de los órganos sexuales accesorios (138). Un efecto similar se observa cuando se realizan cuatro implantes de hipófisis (139).

Esta discrepancia ha sido parcialmente atribuida a la inhibición de la secreción de gonadotrofinas, particularmente de LH, producida por la hiperprolactinemia (138,139,140).

Los resultados experimentales mencionados anteriormente concuerdan con los datos clínicos obtenidos a partir de 1971, cuando el aislamiento de la PRL humana permitió el desarrollo del radioinmunoensayo específico.

En el hombre, la hiperprolactinemia se halla frecuentemente asociada a hipogonadismo, con pérdida de la libido, impotencia y bajos niveles séricos de T (141,142). Sin embargo la elevación moderada de los niveles de PRL, por tratamiento con antagonistas dopaminérgicos, produce un incremento en la respuesta de T a la hCG (143,144).

Esta última observación concordaría con el hallazgo de una correlación entre el ritmo de secreción de T y el de PRL en sujetos normales (145,146).

Por otra parte, investigaciones recientes indican la interesante posibilidad de que la PRL tenga un efecto directo sobre los espermatozoides. Esto ha sido sugerido por la demostración de concentraciones apreciables de PRL en el plasma seminal (147) y por el hecho de que esta hormona es capaz de estimular ciertas actividades metabólicas de los espermatozoides (148,149).

Pero a pesar de las evidencias experimentales que se acaban de resumir con respecto a los efectos de la PRL sobre los órganos sexuales accesorios, su mecanismo de acción es escasamente conocido.

Si bien se han demostrado algunos efectos directos sobre

el tejido prostático en cultivo (150) o sobre la captación de Zn^{2+} en próstatas de ratas castradas (151), actualmente se acepta que la PRL actúa principalmente sensibilizando la respuesta del tejido efector al estímulo androgénico. No obstante, los mecanismos bioquímicos involucrados en este efecto sinérgico no han sido establecidos hasta el momento en forma concluyente.

Lloyd y col. (152), usando PRL bovina "in vitro", encontraron una reducción en la acumulación de T en los lóbulos dorsales y laterales de la próstata, mientras que la PRL ovina, en bajas concentraciones, es capaz de incrementar la captación de este andrógeno.

Bardin y col. (153), mediante una técnica de perfusión, demostraron un incremento significativo en la concentración de DHT en núcleos de próstatas de ratas hipofisectomizadas, luego del tratamiento con PRL ovina.

Más recientemente, Morris y col. (154) comunicaron que el tratamiento con PRL ovina de ratas inmaduras produce un aumento en los sitios libres de unión para andrógenos, medidos por una técnica de no intercambio, en vesícula seminal.

En cuanto a la posible acción sobre el metabolismo de

andrógenos, diferentes autores han demostrado efectos inhibitorios (155), estimulatorios (156) o nulos (150), según el modelo experimental, la dosis y el origen de la hormona utilizada.

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

La secreción hipofisaria de PRL se halla principalmente bajo el control inhibitorio del sistema dopaminérgico hipotalámico.

Basándose en este hecho, se han usado antagonistas dopaminérgicos, tales como la sulpirida y la pimocida, o agonistas de la dopamina tales como la bromocriptina, con el objeto de inducir hiperprolactinemia o de suprimir la secreción de PRL respectivamente.

Aún cuando no puedan descartarse acciones laterales para estas drogas, resultan herramientas sumamente útiles para estudiar los efectos de la PRL en condiciones fisiológicas.

En la presente sección se presentan los estudios realizados con el objeto de determinar la influencia de la PRL sobre el

mecanismo de acción de los andrógenos. Para ello se usó como modelo la rata inmadura tratada con PRL ovina (PRL_o) o con drogas que modifican la secreción hipofisaria de dicha hormona.

RESULTADOS

Efectos de la PRL_o

Peso de órganos

La Tabla I.1 muestra el efecto del tratamiento con PRL_o sobre el peso de testículo y órganos sexuales accesorios. Los animales fueron inyectados diariamente durante 10 días a partir de los 30 días de edad.

La dosis más alta (500 ug/rata/día) produjo un aumento significativo en el peso de testículo, próstata y epidídimo.

Niveles séricos de andrógenos y de LH.

El tratamiento con PRL_o en dosis crecientes (5-500 ug/rata/día) produjo un aumento concomitante en los niveles séricos de 3 α -diol (Figura I.1), mientras que los de T+DHT permanecieron inalterados.

Con el objeto de determinar una posible causa, respon

Tabla I.1. Efecto del tratamiento con PRLo sobre el peso de testículo y órganos sexuales accesorios en ratas machos prepúberes.

Tratamiento	Testículo (mg)	Próstata (mg)	Epidídimo (mg)
Controles (9)	448 ± 38	64,7 ± 3,0	58,2 ± 4,0
PRLo (50 ug) (13)	440 ± 26	60,0 ± 3,2	61,0 ± 3,3
PRLo (500 ug) (14)	583 ± 21 *	80,0 ± 4,0 *	72,1 ± 5,0 *

Los valores están dados como promedios ± E. S.. Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales. * = P < 0,05 comparado con el grupo control.

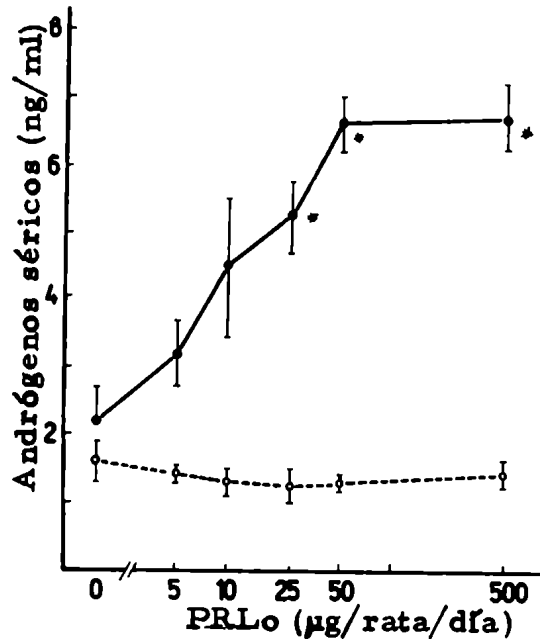


Figura I.1. Niveles séricos de T+DHT (○) y de 3α-diol (●), en ratas inmaduras tratadas con distintas dosis de PRL0. * = p < 0,05 comparado con el control.

sable de este incremento en los andrógenos circulantes, se midieron en los mismos animales los niveles séricos de LH. Como puede observarse en la Figura I.2, el tratamiento con PRLo produjo un incremento en dichos valores que se hace máximo para la dosis de 50 ug ($p < 0.001$).

Receptores para andrógenos

Seguidamente se procedió a medir el contenido del receptor citoplasmático para andrógenos en próstata mediante la determinación de los sitios libres y totales de unión para el andrógeno sintético R1881. El número de sitios libres de unión fue determinado igualmente en la fracción nuclear extraíble con KCl.

En la Figura I.3 se muestran las representaciones de Scatchard correspondientes a los estudios de saturación para las fracciones citoplasmática y nuclear. Las constantes de afinidad (K_a) para los sitios libres y totales fueron respectivamente $0,4 \cdot 10^9$ y $0,1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. Para la fracción nuclear extraíble con KCl la K_a fue $0,3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$.

La menor constante de afinidad para los sitios citoplasmáticos totales de unión, cuando se la compara con la de los si-

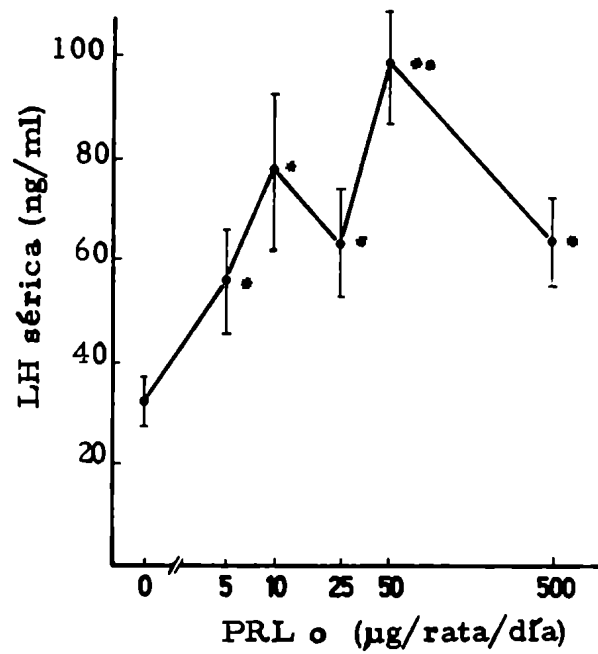


Figura I.2. Niveles séricos de LH en ratas inmaduras tratadas con distintas dosis de PRL o. * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,001$, comparados con el grupo control

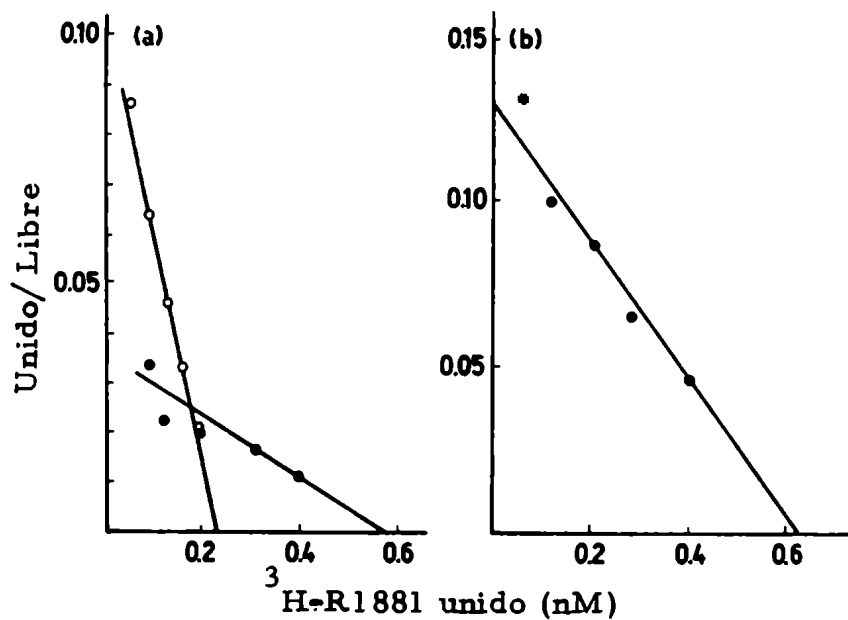


Figura I.3. Representaciones de Scatchard de los datos de unión de ³H-R1881 a los sitios citoplasmáticos (panel a) libres (o) y totales (●) y a la fracción nuclear extraíble por KCl (panel b).

tios libres, estaría de acuerdo con las comunicaciones previas de Shain y col. (157) y Wilson y French (158), y podría ser explicada por la mayor velocidad de disociación de la hormona a 20°C.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de unión, se efectuó el ensayo en los diferentes grupos, usando en este caso la concentración saturante del ligando determinada previamente.

El número total de receptores citoplasmáticos, expresado como fmoles de R18881 unido por mg de proteína, resultó significativamente menor en los animales tratados con 50 y 500 ug de PRL_o (Figura I.4). Cuando los resultados se expresan como fmoles unidos por órgano, la reducción es igualmente observable en el grupo tratado con 50 ug (42 % del control) pero no así en el tratado con 500 ug (92 % del control). La disminución observada en el lote tratado con 50 ug no sería entonces atribuible a un incremento en el contenido total de proteínas, con la consiguiente disminución en la concentración relativa del receptor.

Por otra parte, el número de sitios libres de unión se incrementó progresivamente a medida que aumentaba la dosis de PRL_o inyectada (Figura I.4). No obstante, las diferencias con el control sólo resultan significativas con las dosis de 50 y 500 ug ($p < 0,05$).

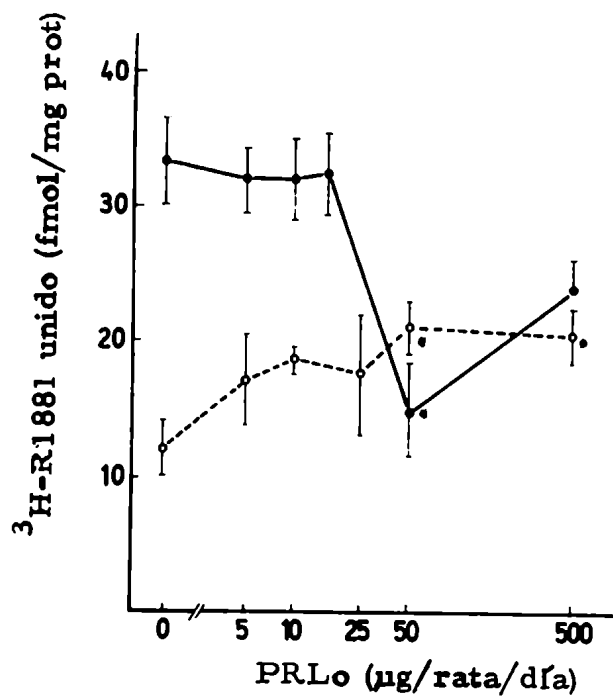


Figura I.4. Efecto del tratamiento con PRLo sobre los sitios libres (o) y totales (●) de unión para andrógenos en próstata de ratas inmaduras. * = $p < 0,05$ comparado con el control.

Resultados similares se obtienen expresando los datos en términos de contenido total por órgano (Controles: 30 ± 6 ; PRLo 50ug: 70 ± 12 y PRLo 500 ug: 71 ± 10 fmoles).

Es interesante notar que, en los grupos tratados con las dosis más altas de PRLo, no existe diferencia entre el número total de sitios y el número de sitios libres. Aún cuando el número total de sitios pudiera estar ligeramente subestimado debido a un intercambio incompleto, o a una degradación parcial, resulta evidente que, en estas dosis, la PRLo produce una virtual desaparición de los sitios ocupados por la hormona (expresados como la diferencia entre los totales y los libres).

En un intento de correlacionar estos cambios observados en el receptor citoplasmático con alteraciones en el receptor nuclear, se estudió la unión de andrógenos a la fracción extraíble con KCl. Como puede observarse en la Tabla I.2, ninguna de las dosis de PRLo ensayadas produjo cambios significativos en la capacidad de unión de esta fracción.

Actividades enzimáticas

Dado que los niveles de DHT circulante son muy bajos

Tabla I.2. Efecto del tratamiento con PRL_o sobre la unión de ³H-R1881 a la fracción nuclear extraíble con KCl.

Tratamiento	K _a (M ⁻¹)	fmoles/ug ADN	fmoles/órgano
Controles	0,3 . 10 ⁹	1,61 ± 0,06	134 ± 6
PRL _o (50 ug)	0,2 . 10 ⁹	1,51 ± 0,06	121 ± 6
PRL _o (500 ug)	0,3 . 10 ⁹	1,42 ± 0,06	147 ± 11

en la rata inmadura (159), el aumento detectado en la concentración sérica de 3α -diol en relación a la de T+DHT, sugería un incremento en las actividades tanto de la 5α -reductasa como de la 3α -HDH. Para verificar esta posibilidad, se procedió a estudiar el metabolismo de la T en homogenatos de próstata, epidídimo y tubo seminífero (TS) de ratas inyectadas con 50 y 500 ug de PRL. Los resultados pueden observarse en la Figura I. 5.

En la próstata (Figura I. 5. A), el tratamiento con la dosis más alta de PRL (500 ug) produjo un aumento significativo en la actividad de la 5α -reductasa, expresada como la suma de los metabolitos 5α -reducidos formados por órgano. La actividad específica, sin embargo, no resultó alterada por esta dosis de PRL (0,338 vs. 0,337 pmoles/mg proteína.min en el grupo control).

En epidídimo y TS, la administración de PRL no afectó significativamente las velocidades de formación de DHT, 3α y 3β -diol. Consecuentemente, ninguna de las actividades enzimáticas (5α -reductasa, 3α y 3β -HDH) parece ser afectada por dicha hormona (Figura I. 5. B y C).

Como puede observarse en la Figura I. 5. C), la velocidad de formación del 3α -diol en homogenatos de TS es superior a la de

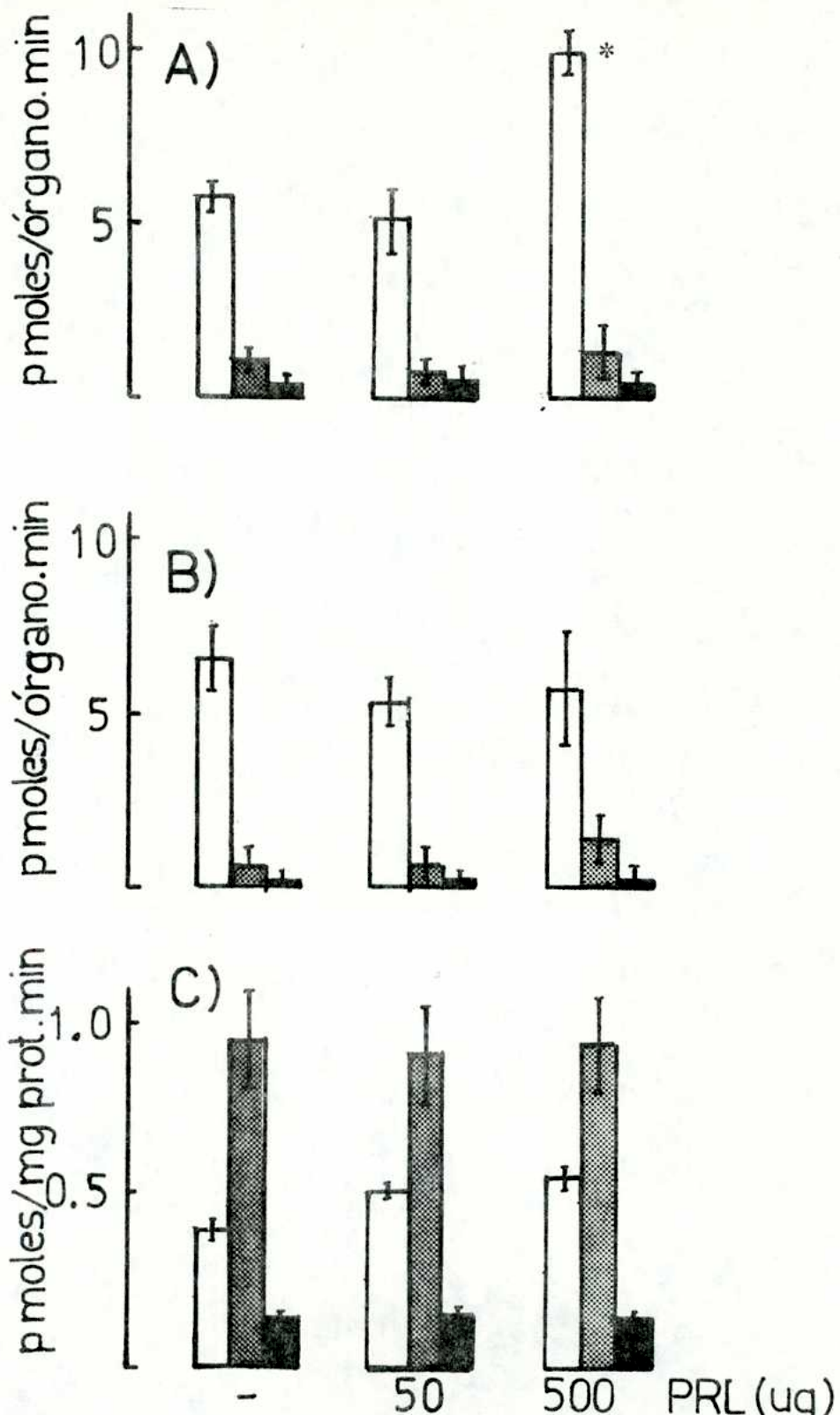


Figura I.5. Efecto del tratamiento con PRL sobre el metabolismo de la T en pfofata (A), epididimo (B) y TS (C). □ DHT; ▨ 3 α -diol; ■ 3 β -diol. * = p < 0,05.

DHT. Este hecho, aparentemente contradictorio, coincide sin embargo con lo demostrado por Cigorruga y col. (160), y sería explicable por la actividad extramedamente alta de la 3α -HDH en este tejido, debido a la cual, la DHT predomina sólo en tiempos de incubación muy cortos.

Varios autores han demostrado que, tanto en el túbulo seminífero como en el epidídimo, la 5α -reductasa y la 3α -HDH alcanzan su máxima actividad entre los 20 y 30 días de edad. (58, 161, 162). Con el objeto de comprobar si la PRL está involucrada en estos cambios en la actividad enzimática, se estudió el efecto de inyecciones diarias de PRL a partir de los 15 días de edad. La dosis administrada, 250 ug/rata/día, resulta equivalente en términos del peso corporal, a la de 500 ug en ratas de 30 días.

Los animales se sacrificaron a los 21 días de edad y los homogenatos de epidídimo y TS fueron incubados con T y DHT triadas.

En este caso no se observaron cambios en el peso de órganos ni en el peso corporal.

Como puede observarse en la Figura I.6, la actividad de la 5α -reductasa no fue alterada por este tratamiento en ninguno

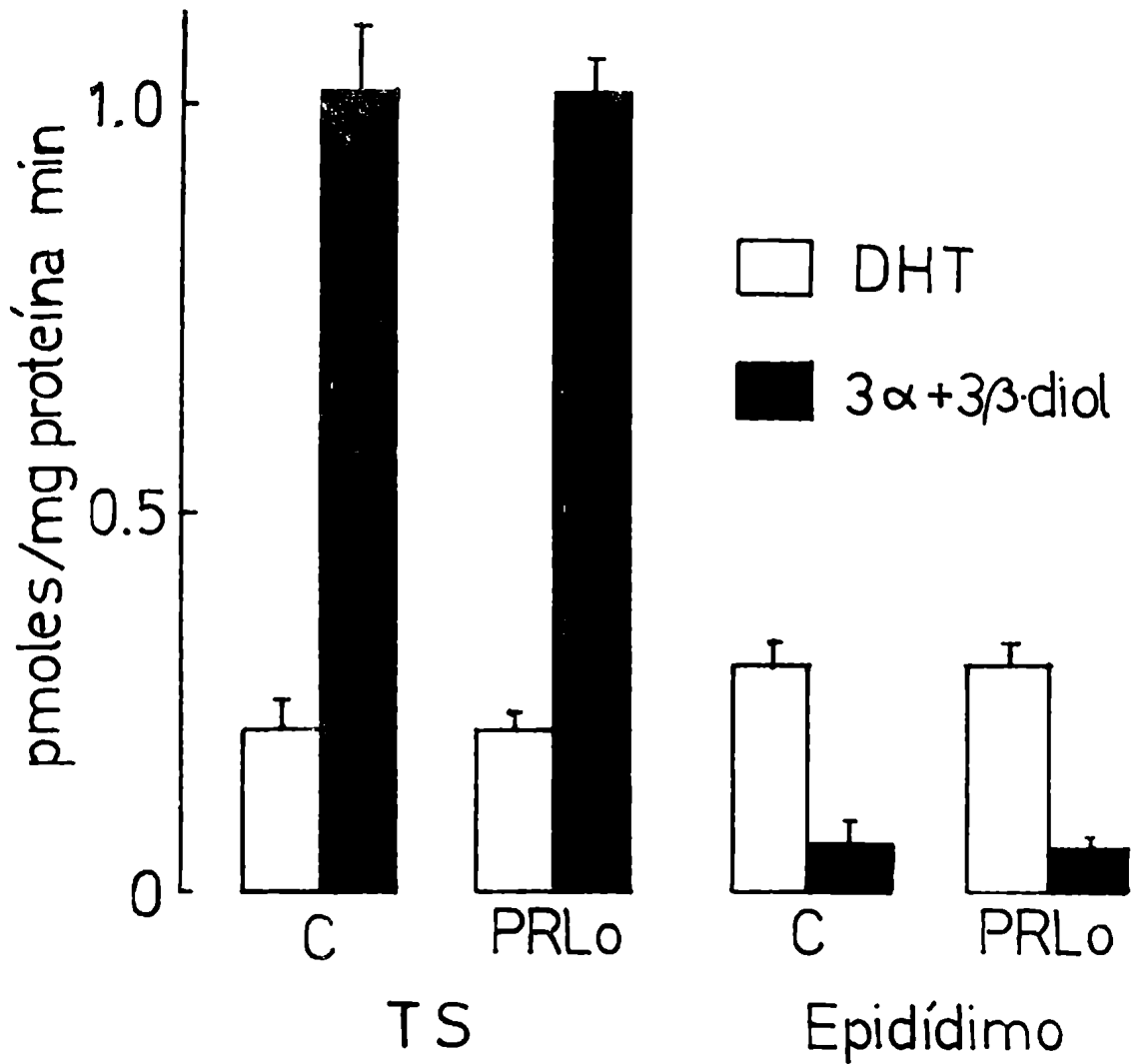


Figura I. 6. Metabolismo de T en ratas tratadas con PRLo entre los 15 y los 21 días de edad.

de los dos tejidos. Por otra parte, cuando las incubaciones se llevaron a cabo con DHT como sustrato (Figura I.7), el único cambio observado fue una ligera disminución en la velocidad de formación del 3β -diol, mientras que la actividad de la 3α -HDH permaneció inalterada.

Efectos de la administración de agonistas y antagonistas de la dopamina.

En la Figura I.8, se hallan representados los niveles séricos de PRL en animales tratados durante 10 días con bromocriptina o con sulpirida.

Tal como se esperaba, el tratamiento con un agonista de la dopamina, la bromocriptina, produce un descenso significativo en la PRL sérica, mientras que el antagonista dopaminérgico sulpirida, eleva considerablemente las concentraciones de esta hormona por sobre el nivel basal.

Niveles de LH y de andrógenos.

Ninguno de los dos tratamientos modificó los niveles de LH (Figura I.9).

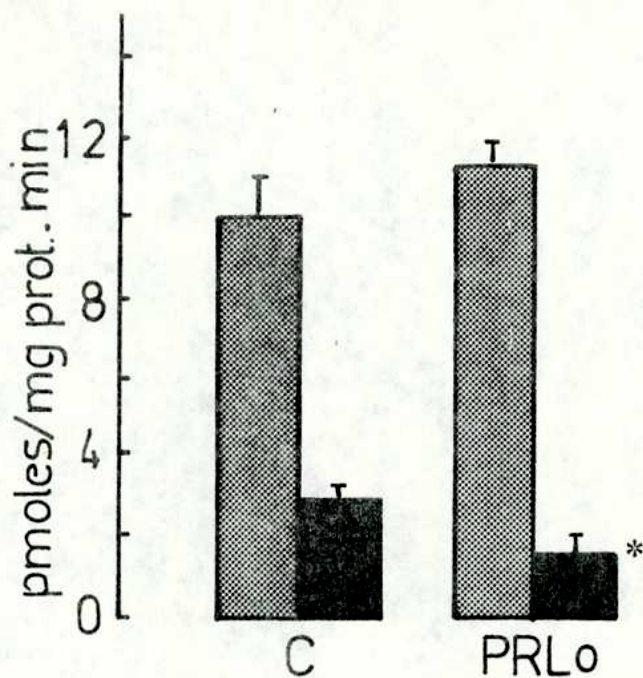


Figura I. 7. Metabolismo de DHT en túbulos seminíferos de ratas tratadas con PRLo entre los 15 y 21 días de edad. Cada barra representa el promedio de triplicados \pm E. S. ■ 3 α -diol; ■ 3 β -diol. * = $p < 0,05$ comparado con el control.

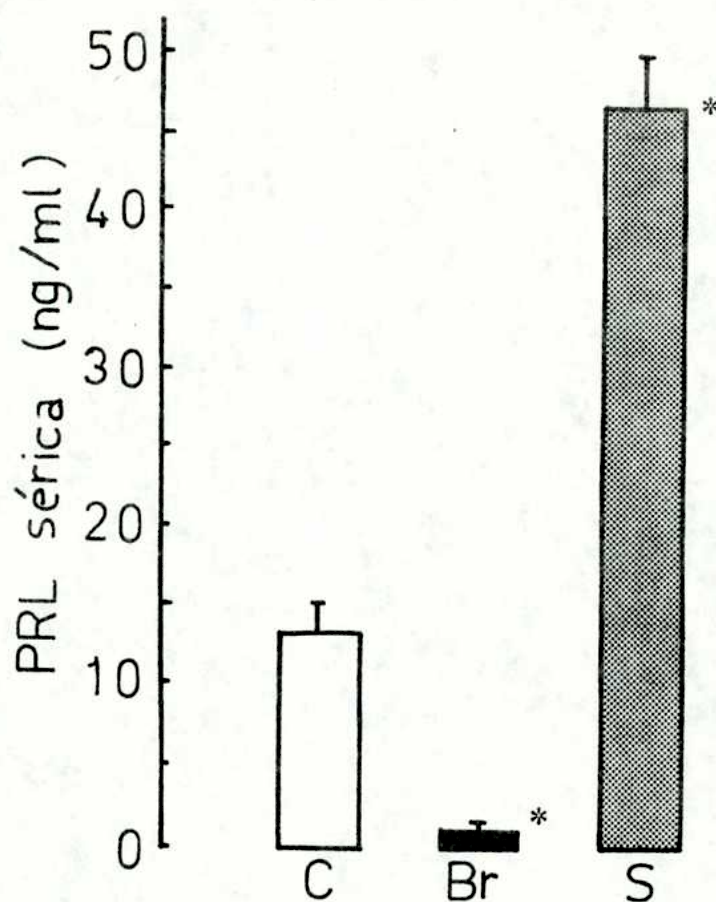


Figura I. 8. Niveles séricos de PRL en animales tratados con bromocriptina (Br) o sulpirida (S). Cada barra representa el promedio \pm E. S. de las determinaciones correspondientes a 10 animales, realizadas por duplicado. * = $p < 0,05$ comparado con el control.

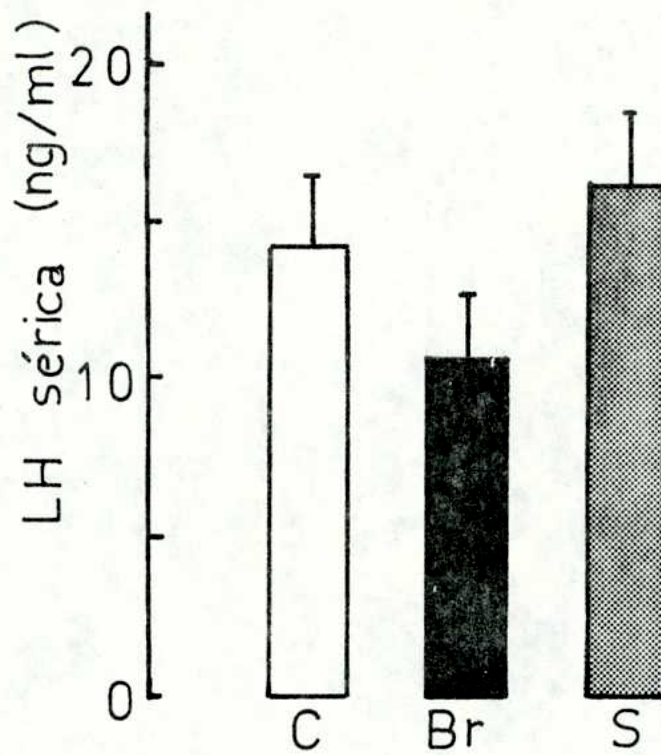


Figura I.9. Niveles séricos de LH en animales tratados con bromocriptina (Br) o sulpirida (S). Cada barra representa el promedio \pm E. S. de las determinaciones correspondientes a 10 animales, realizadas por duplicado.

Cuando se midieron los valores séricos de andrógenos se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura I.10. En el grupo tratado con bromocriptina, los niveles séricos de 3α -diol fueron sensiblemente inferiores a los de los animales control mientras que la disminución en T+DHT no fue significativa.

Por el contrario, el tratamiento con sulpirida elevó significativamente los niveles séricos tanto del 3α -diol como los de T+DHT.

Peso de órganos.

Tal como se observa en la Tabla I.3, la administración de bromocriptina redujo el peso de testículo y órganos sexuales accesorios. Los incrementos aparentes observados con sulpirida no resultaron significativos.

Actividades enzimáticas.

La actividad de la 5α -reductasa en próstata fue notablemente menor en el grupo tratado con bromocriptina, expresada ya sea como actividad total por órgano (Figura I.11) o como actividad específica (27 % del control, $p < 0,05$). El tratamiento

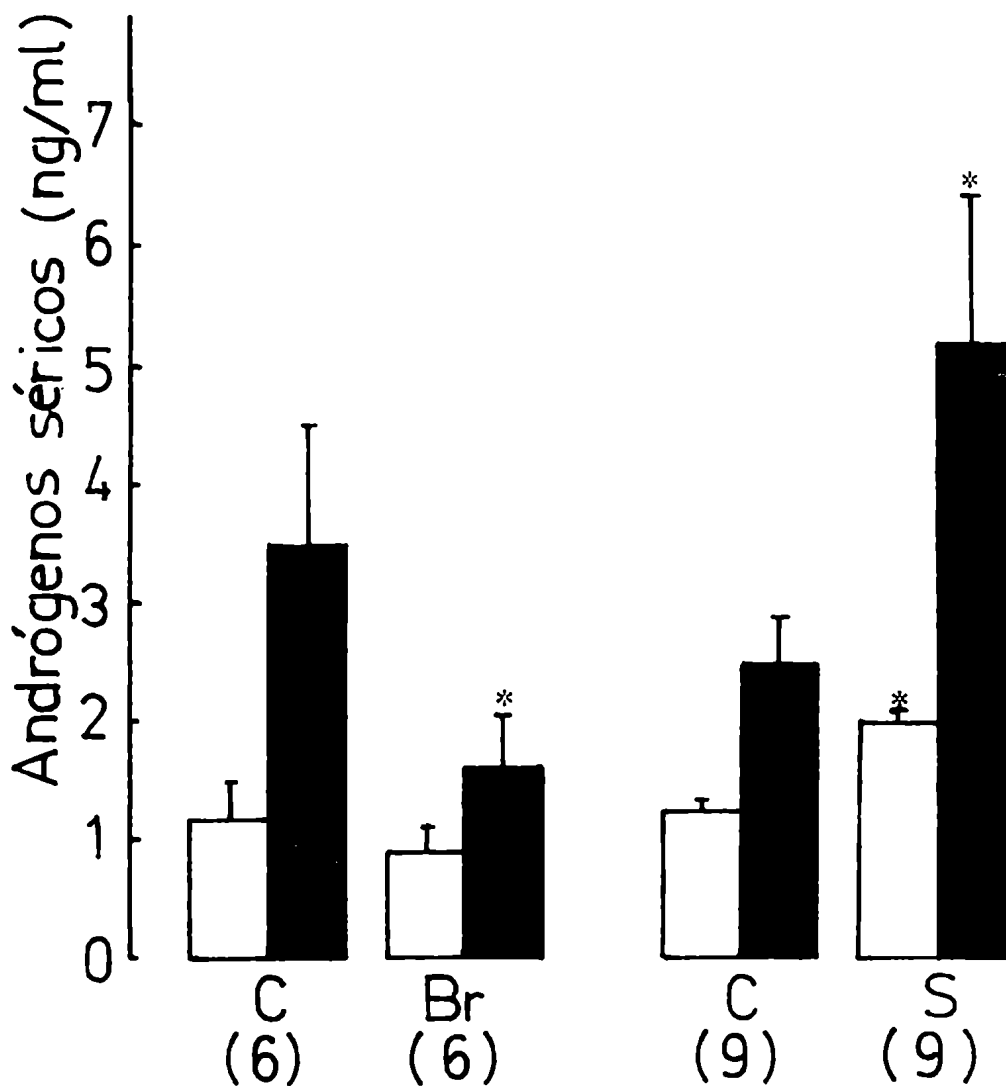


Figura I. 10. Niveles séricos de T+DHT (□) y 3α-diol (■) en animales control (C) y tratados con bromocriptina (Br) o sulpirida (S). Los valores están dados como promedios ± E.S. Las cifras entre paréntesis indican el número de animales. * = p < 0,05 comparado con los controles.

Tabla I.3. Efecto del tratamiento con bromocriptina (Br) o sulpirida (S) sobre el peso de testículo y órganos sexuales accesorios en ratas inmaduras.

Tratamiento	n	Testículo (mg)	Epidídimo (mg)	Próstata (mg)
Controles	10	447 ± 40	41,3 ± 3,1	46,5 ± 3,7
Br	8	341 ± 48 *	31,6 ± 3,7 *	35,7 ± 3,3 *
S	8	470 ± 45	50,1 ± 3,7	54,6 ± 8,3

Los valores están dados como promedios ± E. S. . n = número de animales; * = $p < 0,05$ comparado con el grupo control.

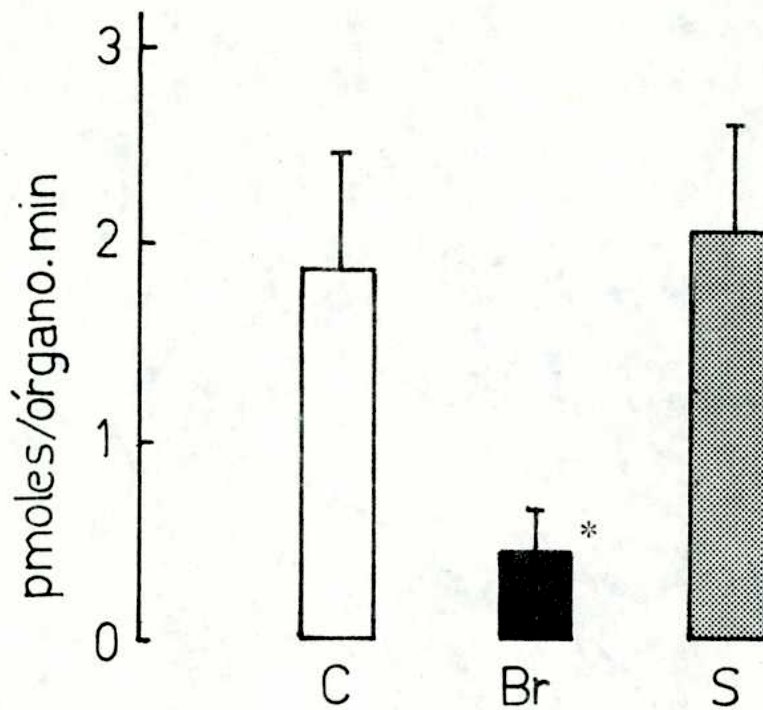


Figura I. 11 Actividad de la 5α -reductasa en próstata de animales control (C) y tratados con bromocriptina (Br) o sulpirida (S). Cada barra representa el promedio \pm E. S. de tres homogenatos separados. * = $p < 0,05$ comparado con el control.

con sulpirida, sin embargo, no modificó significativamente dicha actividad.

El efecto de la bromocriptina sobre la 5α -reductasa fue igualmente estudiado en TS. Como puede observarse en la Figura I.12, en forma similar a lo que ocurre en la próstata, la bromocriptina produce una disminución considerable en la actividad de esta enzima, mientras que la PRL_o, como había sido observado anteriormente, no altera significativamente la 5α -reductasa en este tejido.

A pesar de la menor conversión total a metabolitos 5α -reducidos en los animales tratados con bromocriptina, se observaba en estos una mayor proporción del 3α -diol que sugería una activación de la 3α -HDH. Se procedió entonces a determinar el efecto de los distintos tratamientos sobre la actividad de esta enzima.

Sorprendentemente, tanto la bromocriptina como la sulpirida produjeron un aumento de la 3α -HDH, mientras que la PRL_o, en la dosis administrada (500ug) no afectó dicha actividad enzimática (Figura I.13).

Para tratar de esclarecer este hecho aparentemente con-

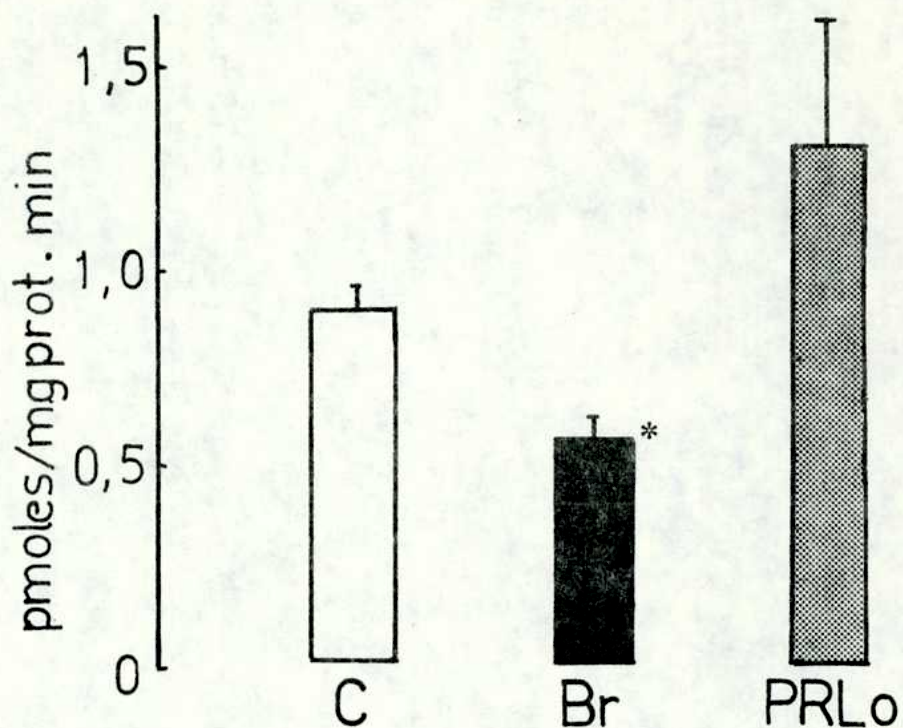


Figura I. 12. Actividad de la 5α -reductasa en túbulos seminíferos aislados de ratas control (C) y tratadas con bromocriptina (Br) o PRL0. Cada barra representa el promedio de triplicados \pm E.S.. * = $p < 0,05$ comparado con el control.

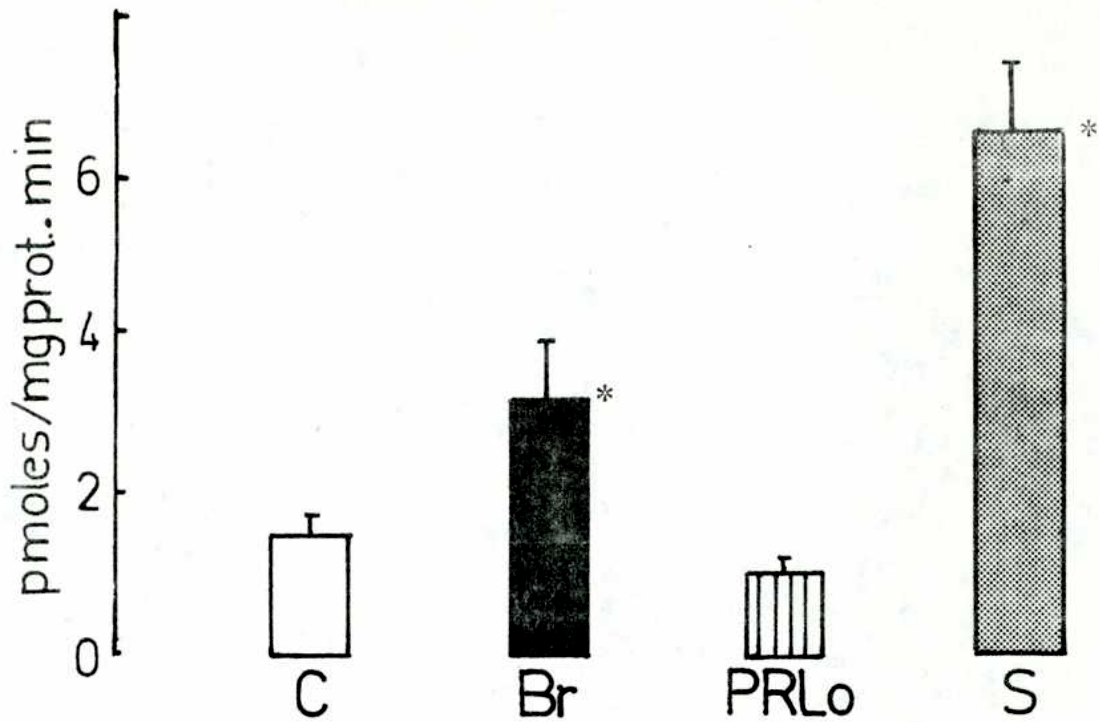


Figura I. 13. Actividad de la 3α -HDH en túbulo seminífero de ratas control (C) y tratadas con bromocriptina (Br), PRL0 o sulpirida (S). Cada barra representa el promedio de triplicados \pm E.S.. * = $p < 0.05$ cuando se compara con el control.

tradictorio, se decidió estudiar el efecto de la bromocriptina en una edad más temprana, cuando los niveles de PRL endógena son relativamente muy bajos. Los animales fueron tratados con bromocriptina a partir de los 21 días y se sacrificaron al alcanzar los 25 días de edad.

Este tratamiento no produjo cambios significativos en el peso de órganos, sin embargo, se observó un incremento significativo en la actividad de la 3α -HDH tanto en TS como en epidídimo (Figura I.14).

Posteriormente, para tratar de descartar la posibilidad de una interferencia de la bromocriptina en la reacción enzimática, se estudió el efecto del agregado de esta droga, en una concentración de 200 ng/ml a un homogenato de TS realizado en las condiciones habituales. Este ensayo no mostró efecto alguno sobre la velocidad total de 5α -reducción ni sobre las proporciones de los distintos metabolitos.

Por otra parte, se intentó corroborar el efecto estimulador de la sulpirida mediante la administración de otro antagonista de la dopamina, la pimocida.

Los animales fueron tratados según el esquema habitual

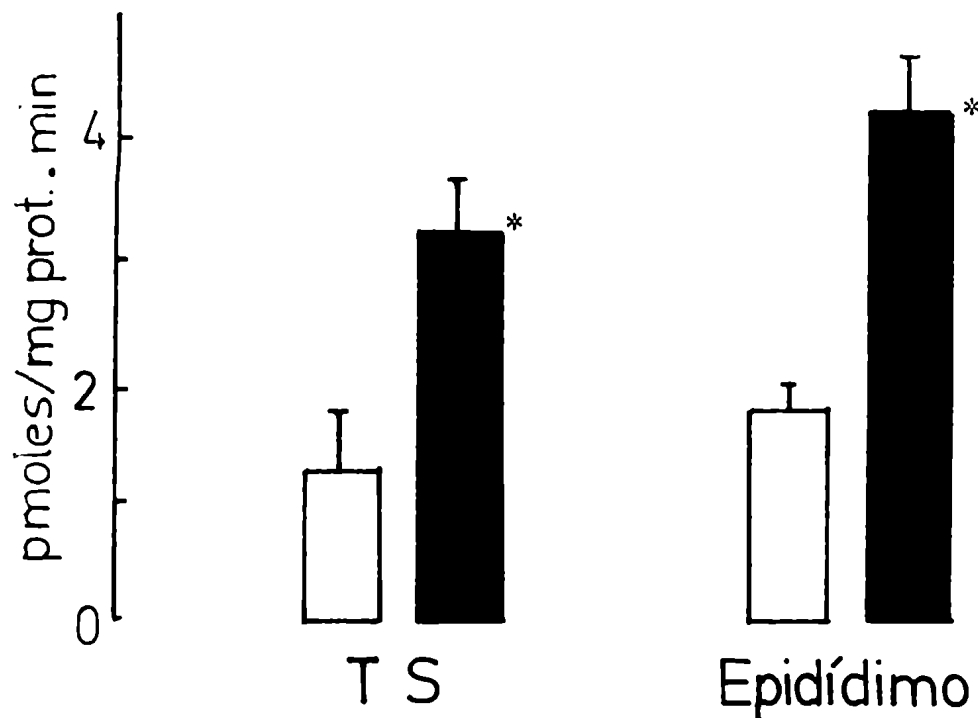


Figura I.14. Actividad de la 3α -HDH en túbulo seminífero (TS) y epidídimo de ratas controles (□) y tratadas con bromocriptina (■) entre los 21 y 25 días de edad. Cada barra es el promedio de triplicados \pm E.S.. * = $p < 0,02$ comparado con los controles.

durante 10 días a partir de los 30 días de edad, pero en este caso los animales fueron divididos en dos grupos, uno tratado con una dosis de 0,63 mg/kg de peso cada 48 hs (P1) y otro tratado diariamente con la misma dosis (P2).

La Tabla I.4 muestra el efecto de estos tratamientos sobre el peso de los órganos sexuales accesorios. En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas con respecto a los controles.

La actividad de la 3α -HDH en cambio, fue notablemente mayor en ambos grupos (P1 y P2), tanto en TS como en epidídimo, comparada con los controles respectivos (Figura I.15). En la próstata el efecto parece ser similar, aunque en este caso no pudo efectuarse el análisis estadístico debido a que en el grupo control sólo pudo usarse un homogenato.

Estos resultados parecerían confirmar el efecto observado con la sulpirida, sin embargo cuando se midieron los niveles séricos de PRL en los animales tratados con pimocida, se encontró que esta droga tiene una acción sustancialmente distinta de la primera.

En la Figura I.16 se hallan representados los niveles sé

Tabla I.4. Efecto del tratamiento crónico con pimocida cada 48hs (P1) o cada 24 hs (P2) sobre el peso de órganos sexuales accesorios de ratas inmaduras.

Tratamiento	n	Epidídimo (mg)	Próstata (mg)
Controles	14	58,2 ± 2,4	57,5 ± 5,5
P1	11	61,6 ± 4,6	66,2 ± 3,7
P2	13	56,2 ± 3,2	60,8 ± 9,8

Los valores están dados como promedios ± E. S. . n = número de animales.

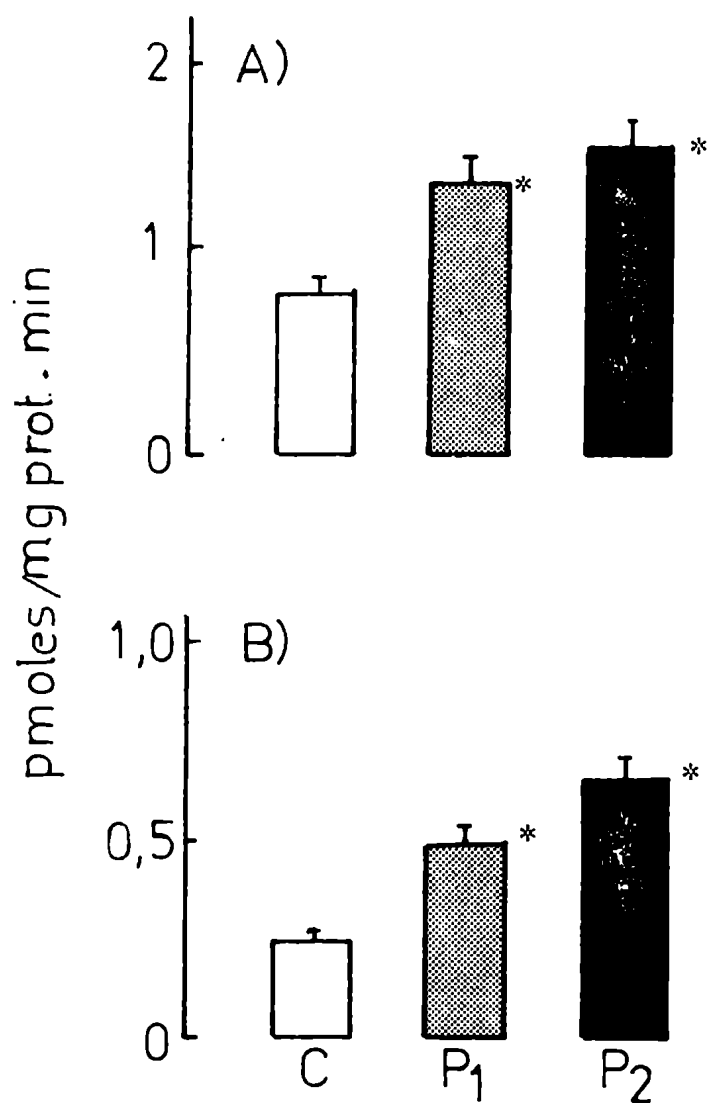


Figura I. 15. Actividad de la 3 α -HDH en túbulo seminífero (A) y epidídimo (B) de ratas control (C) y tratadas con pimocida cada 48 (P1) o 24 hs (P2). Cada barra representa el promedio de triplicados \pm E.S.. * = $p < 0,05$ comparada con los controles.

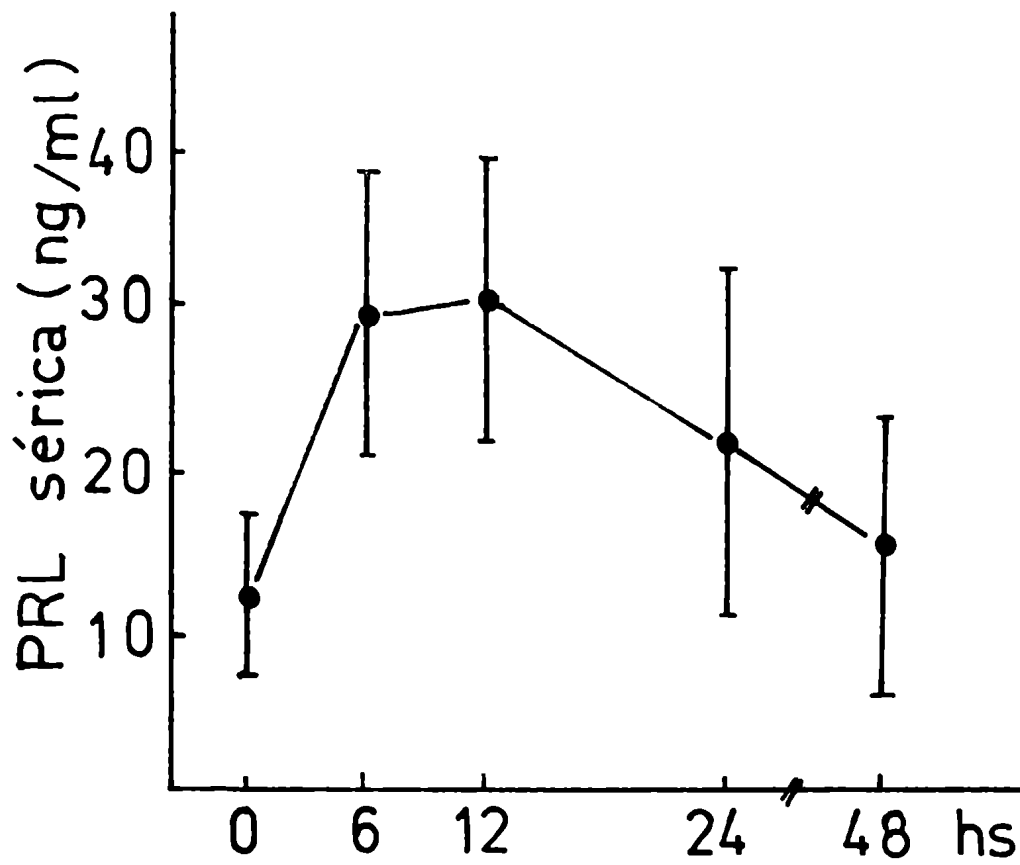


Figura I.16. Niveles séricos de PRL a distintos tiempos luego de un única inyección de pimocida. Cada valor es el promedio de tres determinaciones individuales \pm E.S..

ricos de PRL a distintos tiempos luego de una única inyección de pimocida. A pesar de que las diferencias con respecto al control no son significativas, dada la enorme variación individual y el reducido número de animales por grupo se observa un aparente incremento de dichos niveles por sobre el valor basal.

Contrariamente, el tratamiento crónico con esta droga (grupos P1 y P2), produjo una disminución del tipo dosis-respuesta en la PRL sérica (Figura I.17). Estos resultados indicarían que en altas dosis, y a pesar de su acción antagónica con la dopamina, la pimocida puede ejercer un efecto supresor sobre la secreción de PRL.

DISCUSION

A pesar de que el sinergismo existente entre la PRL y los andrógenos ha sido fehacientemente comprobado, el mecanismo por el cual esta hormona hipofisaria modula la acción androgénica es escasamente conocido.

Este hecho se debe en parte a los resultados contradictorios obtenidos por los distintos autores según el modelo experimental utilizado.

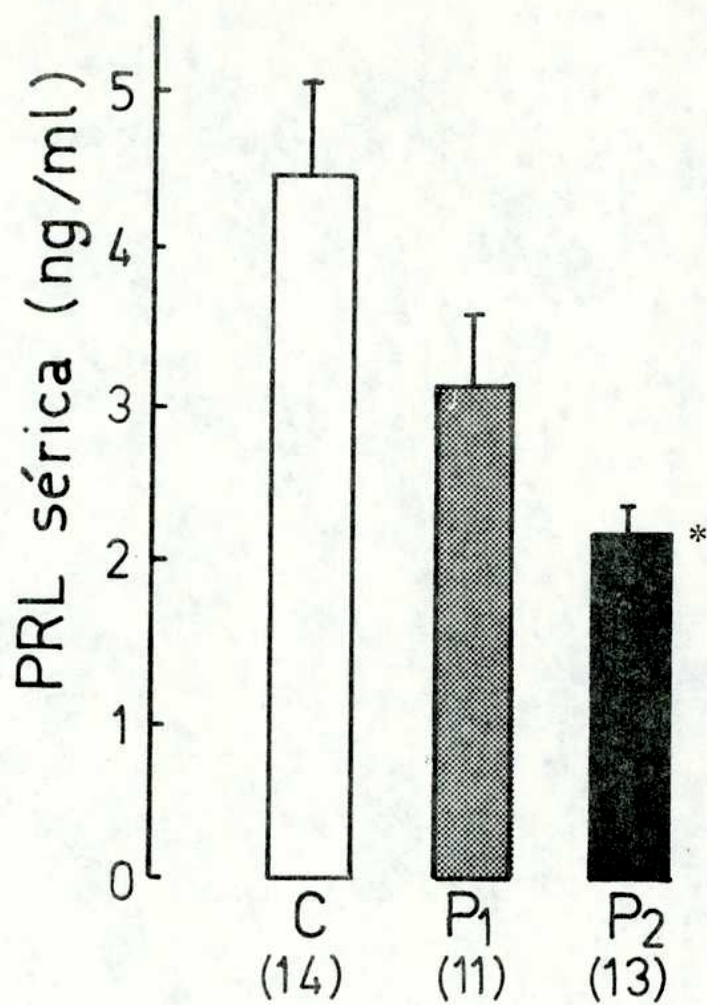


Figura I.17. Niveles séricos de PRL en animales tratados crónicamente con pimocida cada 48 hs (P1) o 24 hs (P2). Las cifras entre paréntesis indican el número de animales. * = $p < 0,05$ cuando se compara con el grupo control.

Numerosos grupos han utilizado ratas hipofisectomizadas o castradas con el objeto de evitar aquellos efectos de la PRL que pudiesen estar mediados por cambios en los niveles de gonadotrofinas o de andrógenos circulantes. No obstante, tanto la hipofisectomía como la castración introducen una serie de alteraciones laterales cuyas consecuencias fisiológicas resultan difíciles de evaluar.

Es por ello que la administración de PRL exógena o la modificación de sus niveles endógenos, en ratas intactas, aún cuando requiera la medición simultánea de gonadotrofinas y andrógenos circulantes, parece ser un modelo más adecuado para el estudio de las acciones de esta hormona en condiciones fisiológicas.

La elección de la rata inmadura se fundamenta además, por una parte en el hecho de que, como se ha mencionado en la Introducción, la PRL parece jugar un papel fundamental durante el desarrollo sexual y por otra parte en su mayor sensibilidad a los cambios en los niveles de esta hormona.

La rata inmadura presenta además niveles comparativamente bajos de PRL, sin embargo existen discrepancias sobre la evolución cronológica de los mismos.

En un primer trabajo, Negro-Vilar, Krulich y McCann (163), mostraron que los niveles de PRL en la rata son muy bajos entre los 15 y los 20 días de edad, experimentan un primer ascenso a partir de los 25 días, se mantienen aproximadamente constantes hasta los 50 días y luego experimentan un segundo ascenso hasta alcanzar un máximo alrededor de los 90 días. Estos resultados fueron confirmados por Dohler (164), quien encuentra un aumento a partir de los 29 días y un pico de secreción alrededor de los 37 días.

Sin embargo McCann, en un trabajo posterior (165), se retractó parcialmente, afirmando que el primer pico, a los 25 días de edad, era en realidad debido al desarrollo de la respuesta al "stress", que dadas las condiciones de mantenimiento de los animales, producía una elevación aparente en los niveles basales.

La existencia de un pico de PRL en el período prepuberal ha sido no obstante comprobada en otras especies tales como el ratón y la oveja (166), correlacionándose en ambos casos con el comienzo del desarrollo de los órganos sexuales accesorios.

Por otra parte, el hecho de que los receptores para PRL en próstata tengan una concentración máxima alrededor de los 20

días de edad (167), es un indicio considerable de que esta hormona desempeña un papel importante en el desarrollo de esta glándula.

En cuanto a los resultados obtenidos por administración de PRL, el aumento observado en el peso de órganos estaría de acuerdo con lo demostrado por Negro-Vilar (135) mediante el implante de hipófisis en ratas inmaduras.

Este aumento se observó también en epidídimo, hecho que resulta sorprendente dado que, a pesar de haberse demostrado en el conejo que este órgano posee receptores para PRL (168), no es de los considerados clásicamente como efector de dicha hormona.

El efecto trófico observado en el epidídimo podría ser no obstante debido no sólo a un efecto directo de la hormona hipofisaria sino también al aumento en los niveles séricos del 3α -diol. Esta última suposición se apoyaría en el hecho de que este andrógeno es capaz de mantener la función epididimaria a juzgar por su efecto sobre la supervivencia y viabilidad de espermatozoides en animales castrados (75,169).

El 3α -diol es además el principal andrógeno circulante

en la rata inmadura (54,160). Por lo tanto el aumento detectado en las concentraciones séricas de dicho esteroide, implicaría un incremento en la síntesis de andrógenos en la célula de Leydig.

El incremento en la esteroideogénesis podría ser producido por la PRL ya sea actuando directamente sobre la célula de Leydig, aumentando su sensibilidad hacia la LH, como ha sido demostrado recientemente (170,171) o indirectamente, a través del aumento observado en los niveles de LH.

Con respecto a este último punto, los resultados presentados en este estudio, estarían de acuerdo con los obtenidos por Morris y Saxena (172) quienes encontraron igualmente un aumento significativo en los valores de LH plasmática en ratas de 22 días de edad tratadas con PRL durante dos días. Este efecto implicaría una acción de la PRL sobre las estructuras centrales.

Las acciones a nivel central son igualmente sugeridas por el hecho de que, siendo el 3α -diol un activo inhibidor de la secreción de LH (77), sería dable esperar que las concentraciones de esta gonadotropina descendieran a medida que se incrementan las concentraciones séricas del 3α -diol. El aumento conjunto de LH y 3α -diol implicaría pues una alteración en los mecanis

mos de retroalimentación producida por la PRL. A este respecto, es interesante notar que se han descrito efectos de la PRL sobre el metabolismo de andrógenos en hipófisis e hipotálamo(173).

Por otra parte, la relación de las concentraciones séricas de 3α -diol/T+DHT difiere de las obtenidas por Moger (60) mediante la inyección de LH a ratas de la misma edad. Este autor encontró un aumento de la T+DHT con un incremento subsecuente en los niveles de 3α -diol, lo que produce, en los animales estimulados, una disminución en la relación 3α -diol/T+DHT. El aumento en la proporción de 3α -diol en los animales tratados con PRL no sería entonces explicable exclusivamente por el aumento en los niveles de LH, sino que implicaría además un efecto de la PRL sobre el metabolismo de la T.

La acción estimuladora de la PRL sobre el peso del testículo y órganos sexuales accesorios, y sobre los niveles séricos de LH y andrógenos presentada en este trabajo, se opondría al efecto antigonadotrófico observado en ratas implantadas con tumores productores de PRL (138) o con cuatro explantes hipofisarios (139,174). Esta diferencia podría estar relacionada con las concentraciones extremadamente altas de PRL alcanzadas en es-

tos animales.

Con respecto a este hecho, Bartke (175) ha propuesto que para una función testicular normal son necesarios niveles bajos de PRL, que niveles más altos estimulan el crecimiento de los órganos sexuales accesorios sin afectar el testículo, pero que la elevación de la concentración sérica de PRL por encima de determinado umbral causa la involución testicular.

Aún cuando el mecanismo involucrado en este posible efecto bifásico no se conoce hasta el momento, es interesante notar que, en el presente trabajo, los niveles máximos de LH se alcanzaron con una dosis de PRL de 50 ug mientras que con una dosis diez veces mayor este efecto es parcialmente revertido y que, en los animales con hiperprolactinemia extrema (139,174) la secreción hipofisaria de LH se encuentra notablemente disminuída.

Más allá de su acción sobre el eje hipófiso-testicular, los resultados obtenidos indican que la PRL es capaz de influir sobre el mecanismo de acción de la T en sus tejidos efectores.

El tratamiento con dosis crecientes de PRL produjo una reducción en el contenido total de receptores para andróge-

nos en próstata con un aumento concomitante en el número de sitios libres de unión. Estas variaciones se traducirían en una virtual desaparición de los sitios ocupados, es decir del complejo receptor-DHT citoplasmático.

Para este hecho podrían proponerse al menos tres explicaciones posibles. Primero, la disminución observada podría corresponder a un incremento en el proceso de translocación del complejo receptor-hormona hacia el núcleo. Este hecho concordaría con la mayor captación de radiactividad en núcleos de próstatas incubadas con T-³H y bajas concentraciones de PRL_o (152) y con el aumento en la concentración de DHT en núcleos de ratas hipofisectomizadas tratadas con PRL_o (153). La falta de cambios en los receptores nucleares podría ser explicada en ese caso por el hecho de que los mismos representan sólo los sitios libres de unión, ya que no fueron medidos en condiciones de intercambio.

Segundo, siendo la DHT el andrógeno que se halla preferentemente unido al receptor, la variación en la relación de sitios libres a sitios totales de unión, podría ser un reflejo de una disminución en la concentración intracelular de dicho metabolito de la T. No obstante, esta hipótesis se contrapondría a los resulta-

dos del metabolismo de andrógenos que indican un aumento en la conversión de la T a DHT en la próstata de los animales tratados con PRL_o.

Por último, no puede descartarse la posibilidad de una regulación directa de la síntesis del receptor para andrógenos por PRL. El fenómeno inverso, es decir la regulación por andrógenos del receptor para PRL ha sido demostrada por Charreau y col. (176) y será analizada en la sección siguiente.

El tratamiento con la dosis más alta de PRL_o (500ug) produjo, por otra parte, un incremento en la actividad de la 5 α -reductasa en próstata, expresada como la suma de metabolitos reducidos formados.

Este resultado concordaría con lo descrito por Yamanaka y col. (156) en ratas castradas mantenidas con distintas dosis de T. Sin embargo, dado que la actividad específica no resultó alterada, este efecto podría atribuirse tanto a una estimulación selectiva de la enzima, con el consiguiente aumento de la acción trófica de la T sobre la síntesis de proteínas, como a un aumento generalizado de la síntesis proteica producido directamente por la PRL.

En testículo y epidídimo no fue observado efecto alguno de la PRL sobre el metabolismo de andrógenos de estos tejidos en ratas de 40 y 25 días de edad.

Para comprobar si esto era debido a una diferencia en la actividad biológica de la hormona heteróloga, se decidió estudiar el efecto producido por la variación de los niveles de la PRL endógena mediante la administración de agonistas o antagonistas de la dopamina.

La elección de este tipo de tratamiento se fundamentó en demostraciones previas que indicaban que el sistema dopaminérgico que controla la secreción de PRL se halla presente ya durante la vida fetal (177).

La bromocriptina, agonista dopaminérgico derivado de la ergotamina, ha sido usado con éxito de los casos clínicos de hipogonadismo asociado a hiperprolactinemia (178). Sin embargo, en sujetos euprolactinémicos y en ratas intactas, la administración crónica de este compuesto produce una disminución en los niveles plasmáticos de T (179,180).

Contrariamente, el agente bloqueante dopaminérgico, la sulpirida, produce hiperprolactinemia tanto en el hombre (144)

como en la rata (181). Este compuesto es igualmente capaz de revertir los cambios estacionales del tracto reproductivo en el hamster dorado, debidas presumiblemente a una disminuci3n en la secreci3n de PRL (182). En la rata adulta, sin embargo, ha demostrado tener poco o ning3n efecto (183).

En el presente trabajo, el tratamiento con bromocriptina redujo en forma significativa el peso de test3culo y 3rganos sexuales accesorios, simult3neamente con una disminuci3n considerable en los niveles de andr3genos circulantes.

Dado que los niveles de LH no fueron alterados por este tratamiento, la disminuci3n observada en los niveles de andr3genos se deber3a a una menor sensibilidad de la c3lula de Leydig al est3mulo por esta gonadotropina. Este hecho estar3a de acuerdo con la menor respuesta del test3culo "in vitro" demostrada por Purvis y col. (170), y ser3a explicable por la disminuci3n en el n3mero de receptores para LH en la c3lula de Leydig hallada por Calvo (171) en las mismas condiciones experimentales que las usadas en el presente trabajo.

Harper, sin embargo, trabajando con ratas adultas no observ3 cambios en el peso de 3rganos luego del tratamiento cr3-

nico con bromocriptina (184). Esta discrepancia podría ser debida a la diferente edad de los animales y sería coherente con el hecho de que, en el animal maduro, la administración de PRL tampoco produce cambios apreciables en estos parámetros (79).

Por otra parte, la elevación de los niveles de PRL endógena mediante la administración de sulpirida, produjo un aumento en los andrógenos séricos comparable al observado luego del tratamiento con PRL. A diferencia de esta última, sin embargo, la sulpirida incrementó también los valores de T+DHT; no obstante la relación 3α -diol/T+DHT en el grupo tratado con esta droga resulta ser superior a la observada en los animales controles.

El incremento en los andrógenos circulantes observado con sulpirida se debería fundamentalmente a un aumento de la sensibilidad del tejido intersticial a la estimulación por LH, ya que en este caso no se produce el aumento en los niveles de esta gonadotropina previamente detectado en los animales tratados con PRL. Esta disparidad en el efecto sobre los niveles de LH según se administre PRL exógena o se estimule la secreción hipofisaria de esta hormona, podría atribuirse ya sea a las diferentes concentraciones locales alcanzadas en cada caso o a la dife-

rente actividad biológica de la PRL endógena.

Es necesario considerar además que, dado que el sistema dopaminérgico también podría hallarse involucrado en el control de la secreción hipofisaria de LH (185), las diferencias observadas podrían deberse al hecho de que en el caso de la administración de PRL se estaría alterando el "turn over" de dopamina(186), mientras que en el otro se estarían bloqueando los receptores para dicho neurotransmisor a nivel hipofisario.

El peso de testículo y órganos sexuales accesorios en los animales tratados con sulpirida no resultó ser significativamente distinto del de los controles, sin embargo, este hecho parecería ser debido al reducido número de animales usados y a la gran variación individual, ya que las diferencias observadas en cada caso son comparables a las obtenidas con la dosis más alta de PRL (Tablas I.1 y I.3).

Las modificaciones observadas en el peso de órganos en los distintos tratamientos se correlacionan parcialmente con los cambios encontrados a nivel de las actividades enzimáticas, sin embargo, también a este nivel se manifiestan algunas disparidades entre el efecto de la PRL exógena y el producido por los agen

tes dopaminérgicos.

El tratamiento con bromocriptina disminuyó significativamente la actividad de la 5α -reductasa en próstata y también en TS, aún cuando en este último caso la administración de PRL no produjo cambios apreciables en la actividad de la enzima.

Nayfeh y col. (83) han demostrado que la LH y la FSH están involucradas en el control de la 5α -reductasa testicular. No obstante, dado que la LH no fue modificada por el tratamiento con bromocriptina, y que, según Doherty y col. (187) esta droga tampoco altera los niveles de FSH, estos resultados permitirían suponer que, para la actividad de la 5α -reductasa en el TS se requieren igualmente niveles fisiológicos de PRL.

Por otra parte, podría aducirse que los cambios observados en la actividad de la 5α -reductasa en los animales tratados con bromocriptina, pueden ser mediados por la disminución en los andrógenos circulantes. Esto podría ser posible en la enzima prostática, dada su andrógeno-dependencia (79), pero no en el TS, donde los andrógenos parecerían ejercer un efecto inhibitorio (83,188). En el caso de la enzima prostática, sin embargo, se ha observado igualmente una disminución en su actividad en

animales castrados mantenidos con T , luego de la administración de otro derivado de la ergotamina (mesilato de lergotryl)(156), lo que indicaría que el efecto de la bromocriptina no se produce a través de un descenso de los andrógenos circulantes.

Además, el hecho de que la 5α -reductasa de adrenal también se halle bajo el control por PRL (189) sugeriría que éste es un mecanismo generalizado para la regulación de esta enzima.

Con respecto al efecto de la PRL sobre la 3α -HDH, la situación es más compleja, ya que si bien el tratamiento con PRL produjo un incremento considerable en la relación 3α -diol/T+DHT séricos, en las presentes condiciones no pudo detectarse un aumento concomitante en la actividad de esta enzima en los tejidos efectores de andrógenos.

La alteración en los metabolitos plasmáticos podría deberse entonces a otros factores tales como la diferente velocidad de depuración o a modificaciones en la metabolización hepática. Esta última posibilidad parece especialmente factible, por cuanto se ha comprobado que el tratamiento con PRL de ratas machos adultos produce, en el hígado, un incremento en la relación de metabolitos 3α -reducidos/ 5α -reducidos formados a partir

Δ^4 -androstenediona (189).

La ineffectividad de la PRL para alterar la actividad de la 3α -HDH en los tejidos efectoros de andrógenos, hace aún más sorprendente el hecho de que, tanto la bromocriptina como la sulpirida, hayan producido un aumento significativo en la actividad de esta enzima en TS y epidídimo.

Este mismo efecto se observó también luego del tratamiento con otro antagonista de la dopamina, la pimocida, aunque contrariamente a lo esperado, esta droga produjo una disminución en los niveles séricos de PRL. Esta acción de la pimocida sobre los niveles de PRL estaría de acuerdo sin embargo, con demostraciones previas que indican que la pimocida y la sulpirida se comportan en forma diferente en ciertos ensayos biológicos (190). Más aún, experiencias "in vitro" han demostrado que aunque la pimocida, en bajas concentraciones es un potente antagonista de la dopamina en el control de la secreción de PRL, en altas concentraciones, esta droga es capaz de inhibir la secreción de PRL, aún cuando continúa inhibiendo parcialmente la acción de la dopamina (191). Este efecto a altas concentraciones es compartido con otras drogas anti-psicóticas tales como el haloperidol y apa-

rentemente no estaría mediado por los receptores de alta afinidad para la dopamina (192).

No obstante, el único precedente encontrado en la literatura sobre la demostración "in vivo" de este eparente efecto bifásico es el trabajo de Lawson y Gala (193), quienes en ratas ovarectomizadas tratadas con estrógenos, encontraron que la pimocida, en una dosis de 2,5 mg por kg de peso es menos efectiva para incrementar los niveles plasmáticos de PRL que en dosis menores. La presente sería entonces la primera demostración de que la pimocida, administrada en forma crónica, puede reducir significativamente los niveles de PRL circulante.

Con respecto al efecto sobre las actividades enzimáticas, es importante puntualizar que la ineficacia de la hormona heteróloga para producir cambios en la 3α -HDH no permite excluir la posibilidad de que la acción de los agentes dopaminérgicos sea mediada a través de la modificación de los niveles de PRL endógena. Sin embargo, el hecho de que la bromocriptina, la sulpirida y la pimocida hayan producido cambios similares en la actividad enzimática, sugiere la posibilidad de efectos directos sobre los tejidos estudiados, ya que, independientemente de su acción

sobre la secreción de PRL, estos tres compuestos tienen en común la capacidad de interactuar con el receptor para dopamina.

Esta última posibilidad resulta especialmente atractiva, dado que, aunque numerosos trabajos han demostrado la amplia localización de la neurotransmisión dopaminérgica, y la importancia de la dopamina en los mecanismos autónomos (194), se ha prestado muy poca atención a los posibles efectos de esta catecolamina sobre el tracto reproductivo masculino.

Recientemente, sin embargo, la demostración de la existencia de receptores beta-adrenérgicos en las células de Sertoli (195), ha abierto la posibilidad de que las catecolaminas cumplan una importante función en la regulación de la actividad del túbulo seminífero.

Por otra parte, en el caso de la bromocriptina, se ha comprobado que esta droga es capaz de producir efectos "in vitro" tanto sobre la esteroideogénesis en la célula de Leydig (196) como sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa de testículo (197). Más aún, en un trabajo reciente Di Carlo y col. (198) comunicaron un efecto de la bromocriptina sobre el receptor de estrógenos en útero de rata, producido tanto "in vivo" como "in vitro" y que

notablemente, se observa igualmente por administración de sulpirida.

El efecto observado con sulpirida en el presente trabajo merece además un comentario especial.

Magrini y col (144), estudiaron el efecto de la administración de sulpirida a sujetos normales sobre la respuesta de T y DHT plasmáticas a la estimulación por hCG y observaron que, si bien este tratamiento no modifica la respuesta de T, produce una marcada inhibición de la respuesta de DHT. Estos autores concluyen que la PRL podría estar inhibiendo la conversión periférica de la T en su metabolito 5α -reducido.

Esta hipótesis se opondría a lo demostrado en el presente trabajo, no obstante, y a pesar de que las discrepancias pueden deberse a las diferencias en el modelo experimental, es interesante notar que la disminución en la respuesta de DHT en los sujetos tratados con sulpirida, podría ser igualmente una consecuencia de una mayor conversión de ésta en 3α -diol, lo que concordaría con la activación de la 3α -HDH producida por esta droga.

Aún cuando el mecanismo responsable del incremento observado en la 3α -HDH en los tejidos efectores de andrógenos

no pueda ser dilucidada con los resultados presentes, éstos resultan de considerable interés, dado que hasta el momento esta es la única demostración de una estimulación de dicha actividad en animales intactos. Por otra parte, la posibilidad planteada de efectos directos de ciertos neurotransmisores, abre una nueva perspectiva para el estudio de los factores involucrados en el control de la acción androgénica.

II. INSULINA Y MECANISMO DE ACCION ANDRO-
GENICA. ALTERACIONES EN LA DIABETES
EXPERIMENTAL.

Las alteraciones reproductivas que suelen acompañar a la diabetes experimental y humana, indican que la insulina juega un papel fundamental en la regulación del mecanismo de acción androgénica.

En el hombre diabético, ha sido señalada repetidamente la alta incidencia de la impotencia sexual, que afecta del 25 al 75 % de los pacientes, proporción que aumenta con la edad de los mismos (199,200).

La diabetes suele acompañarse asimismo de esterilidad, atribuible a lesiones testiculares que incluyen: atrofia, desaparición de la línea germinal, engrosamiento de la membrana basal de los túbulos y esclerosis del vaso deferente (201-205). Estas alteraciones sumadas a una presumible disfunción de los órganos sexuales accesorios, se traducirían finalmente en una disminución del número de espermatozoides en el semen (203) y en su contenido de fructosa (206).

En la orina se ha descrito un menor contenido de 17-ce-
toesteroides (207-209) y de andrógenos (207), mientras que los ni-
veles plasmáticos de T son normales para ciertos autores (210,211)
y disminuídos para otros (214).

En cuanto a la diabetes experimental, si bien histórica-
mente nace en 1889 cuando Von Mering y Minkowski (213) logran
extirpar totalmente el páncreas en el perro, los estudios sistemá-
ticos sobre las alteraciones reproductivas comienzan a efectuarse
recién a partir de 1944, con la descripción de la pancreatectomía
subtotal por Foglia (214). Este modelo permitiría en los años sub-
siguientes, la realización de aportes fundamentales sobre el tema
(215-219).

La rata diabética por aloxano ha sido igualmente útil en
el estudio de las alteraciones reproductivas en el macho. En es-
tos animales Soulairac (220) describió lesiones testiculares simi-
lares a las observadas en el hombre, con desaparición de la línea
germinal de los túbulos, en los que restan solamente las células
de Sertoli. Estas alteraciones se revierten por tratamiento con
insulina.

Estudios posteriores realizados por Schofling y col. en

1967 (203), permitieron localizar las alteraciones en el proceso espermatogénico a nivel del pasaje de espermatocitos a espermátides, mientras que el tejido intersticial se conserva relativamente íntegro.

Las alteraciones producidas por el estado diabético resultan también evidentes en los órganos sexuales accesorios. La próstata, glándula coagulante y vesículas seminales se atrofian durante la fase hiperglucémica de la diabetes por pancreatocmía parcial (215). Estas alteraciones podrían ser atribuidas, en primera instancia, a la disminución de los niveles plasmáticos de T. No obstante existen evidencias de que, en ausencia de insulina habría además una menor respuesta de los tejidos al estímulo trófico de los andrógenos.

Angerwall y col. (221), midiendo el peso húmedo de los órganos, observaron una respuesta disminuída a la T en ratas tratadas con aloxano. En un estudio más detallado, Sufrin y col. (222), demostraron que en animales diabéticos castrados es necesaria la administración conjunta de T e insulina para la normalización de los órganos sexuales accesorios, ya que la T por sí misma produce sólo una restauración parcial de los tejidos afectados.

En un intento de localizar las causas de esta respuesta disminuída a los andrógenos, Oksanen y col. (223) estudiaron la captación de T-³H en órganos sexuales accesorios de animales castrados. En los animales diabéticos por estreptozotocina se produce una notable disminución en la captación de T. Este fenómeno es revertido parcialmente por tratamiento con insulina.

Estos mismos autores estudiaron asimismo la metabolización "in vitro" de T-³H en próstata, y encontraron una menor conversión a DHT en los animales diabéticos castrados. Las conversiones a androstanodiolos y androstenediona eran comparables a las de los controles, no obstante ese hecho lo atribuyen a la baja proporción de estos metabolitos, que dificulta la detección de sus variaciones.

Por otra parte, estudios con cultivos de órganos, han demostrado el requerimiento conjunto de T e insulina para el mantenimiento del tejido prostático. Lostroh y col. (224,225), demostraron que sólo en presencia de insulina la T es capaz de desarrollar su máximo efecto estimulador sobre la capacidad metabólica de la próstata en tanto que la insulina, por sí misma, induce proliferación irregular del epitelio prostático (226).

Efectos directos de la insulina sobre la síntesis de ARN y proteínas en próstata de rata en cultivo fueron igualmente descritos por Johansson (227). Este efecto aumenta sinérgicamente con el agregado de T (228).

Estos resultados, conjuntamente con las alteraciones observadas en la diabetes experimental, sugieren fuertemente que la insulina es un requisito imprescindible para la completa expresión del estímulo androgénico en los tejidos efectores.

En trabajos anteriores del laboratorio, usando como modelo la rata diabética por estreptozotocina, se había demostrado una disminución en los niveles plasmáticos y testiculares de T (229), probablemente debidas a la menor respuesta de la célula de Leydig al estímulo de la LH (230). Estos estudios habían demostrado además que la disminución en la respuesta del tejido intersticial se debería no sólo al menor número de receptores para la gonadotropina (231) sino también a alteraciones en los mecanismos intracelulares de amplificación del estímulo hormonal (171) y en los sistemas enzimáticos responsables de la esteroideogénesis (171, 230).

A nivel de los órganos sexuales accesorios, se había de-

tectado una disminución significativa en el contenido epididimario de ABP (229) y en el contenido del receptor para andrógenos en próstata, medido por la técnica semicuantitativa de geles de agarosa (251).

Con el objeto de determinar en qué medida estas alteraciones están mediadas por la disminución en los niveles de T circulante y si existe alguna modificación en el metabolismo de andrógenos, se procedió a medir los niveles de ABP, la concentración del receptor para andrógenos (sitios libres y totales citoplasmáticos y nucleares) y la actividad de las enzimas metabolizantes de andrógenos en animales diabéticos tratados con distintas dosis de propionato de testosterona (PT).

Dado que en los animales diabéticos se han verificado alteraciones en el eje hipófiso-testicular que podrían deberse a una falla en los mecanismos de retroalimentación por andrógenos la actividad de la 5α -reductasa y el contenido de receptores fueron igualmente determinados en hipófisis e hipotálamo.

RESULTADOS

Tratamiento con PT.

La eficacia del tratamiento, realizado durante 10 días según se describió en Materiales y Métodos, fue verificada a través de la medición de la concentración sérica de T.

Como puede observarse en la Figura II.1, la administración de PT en dosis de 5 y 50 ug/rata/día produce una disminución significativa en los valores de T circulante en los animales controles, en tanto que las dosis más altas (500 y 5.000 ug/rata/día) elevan considerablemente dichos niveles séricos en ambos grupos.

Esta disminución observada en los niveles séricos de T en los controles, es probablemente debida a un descenso de la síntesis de este andrógeno provocada por la inhibición de la secreción hipofisaria de LH. Dado que los animales fueron sacrificados aproximadamente 18 hs después de la última inyección, los valores determinados no representan la concentración máxima alcanzada. En el caso de las dosis bajas, la velocidad de depuración de la hormona exógena sería comparativamente mayor que el tiempo requerido para que el testículo normalice su secreción. En

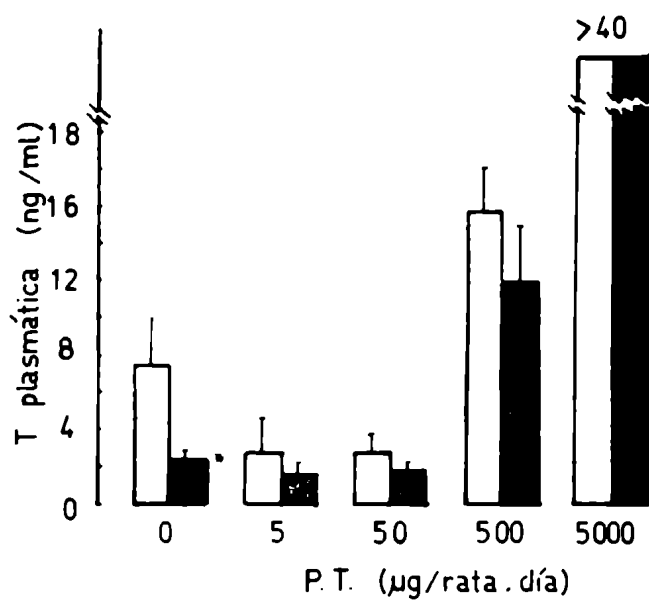


Figura II. 1. Niveles plasmáticos de T en animales inyectados con dosis crecientes de PT.
Barras blancas = animales controles.
Barras sombreadas = animales diabéticos.

cambio las dosis mayores (500-5.000 ug) inducirían una elevación considerablemente más prolongada de la T circulante. Estos resultados concordarían con recientemente presentados por Cunningham y Huckins (237).

Niveles de ABP.

La administración de PT en dosis crecientes a los animales diabéticos produjo un aumento del tipo dosis-respuesta en el contenido de ABP medido en cabeza de epidídimo, hasta alcanzar los valores normales (Figura II.2).

Por otra parte, si bien este resultado indicaba que la disminución en el contenido de ABP en la rata diabética sería principalmente debido a la menor producción de andrógenos, esto no permitía excluir una alteración en la regulación por FSH de la síntesis de esta proteína.

Para comprobar esta última posibilidad, se midió la concentración de ABP en epidídimo de animales normales y diabéticos, previamente hipofisectomizados, inyectados por vía endovenosa con 200 ug de FSH ovina.

Como puede observarse en la Figura II.3, los animales

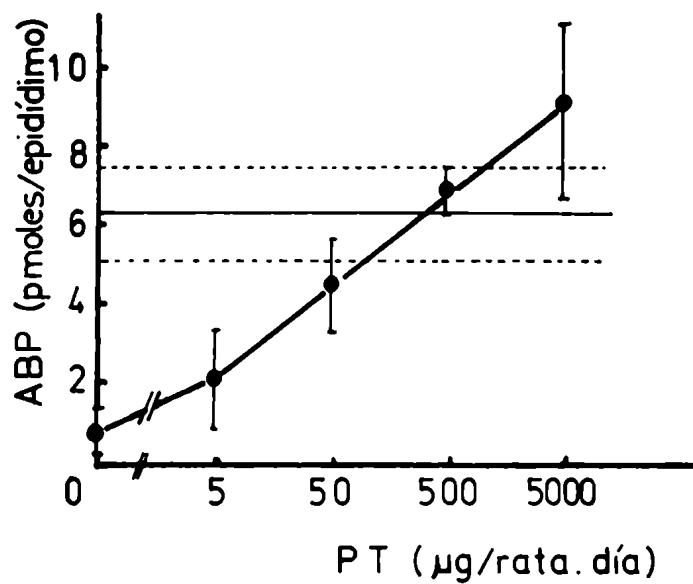


Figura II.2. Niveles de ABP en epidídimo de animales diabéticos tratados con dosis crecientes de PT. Las líneas horizontales corresponden al valor control \pm E. S.

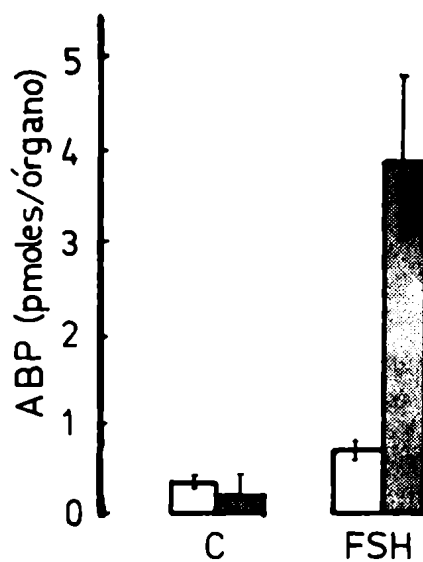


Figura II.3. Niveles de ABP en epidídimo de animales hipofisectomizados medidos después de la inyección endovenosa de solución salina (C) o 200 ug de FSH.

Barras blancas = controles

Barras negras = diabéticos

diabéticos responden al estímulo por FSH, presentando incluso una aparente hipersensibilidad a la hormona. Resulta notable observar además, que la inyección de FSH produjo simultáneamente un incremento significativo en los niveles de T, tanto séricos como testiculares (Figura II.4), no detectándose en este caso diferencia entre los animales diabéticos y los controles respectivos.

Por otra parte, este resultado corroboraría los obtenidos con tratamiento con PT, en lo referente a que la insulina, "per se", no sería requisito imprescindible para la síntesis de ABP.

Efecto del tratamiento con PT sobre los órganos sexuales accesorios.

En los animales diabéticos por estreptozotocina, se observa una marcada reducción tanto en el peso testicular como en el de los órganos sexuales accesorios (Figura II.5). El tratamiento con insulina restaura parcialmente el peso de próstata y epidídimo, aunque el peso testicular, continuó siendo significativamente menor que en los controles.

La administración de PT en dosis por encima de 50 ug

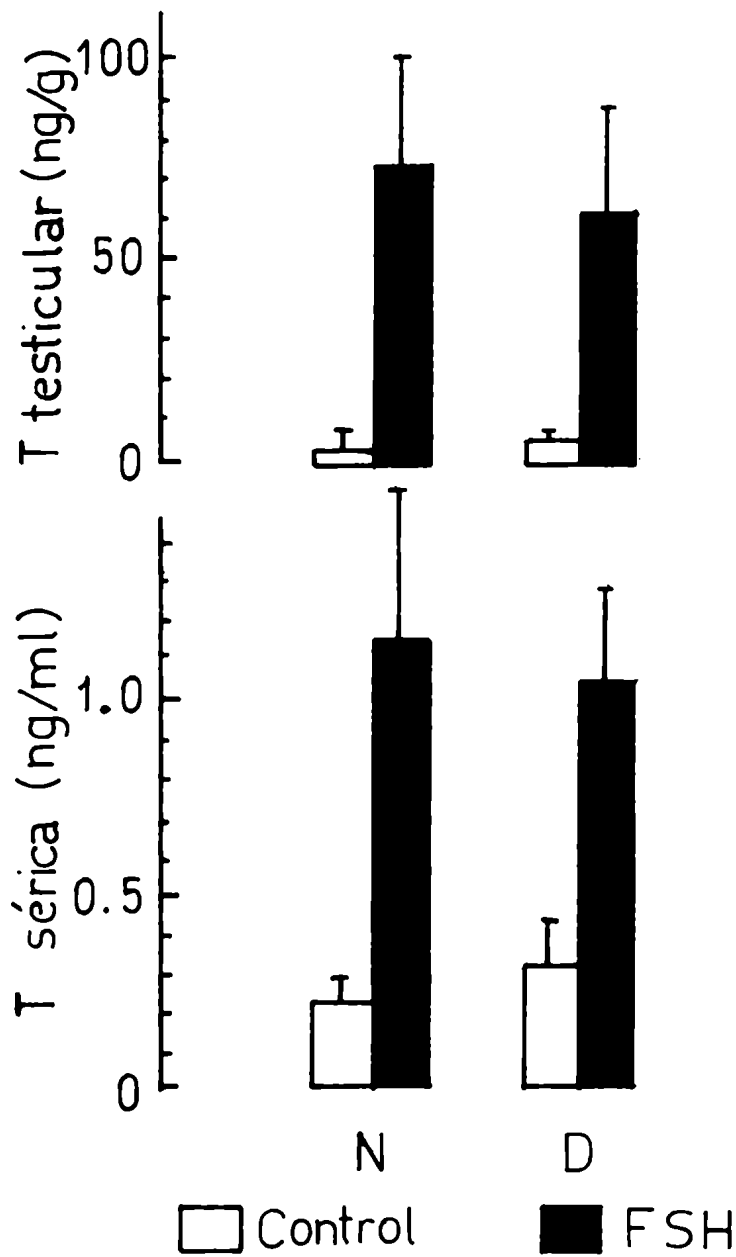


Figura II.4. Niveles de T testicular y sérica en animales normales (N) y diabéticos (D) previamente hipofisectomizados, medidos 2 hs después de una inyección endovenosa de 200 ug de FSH.

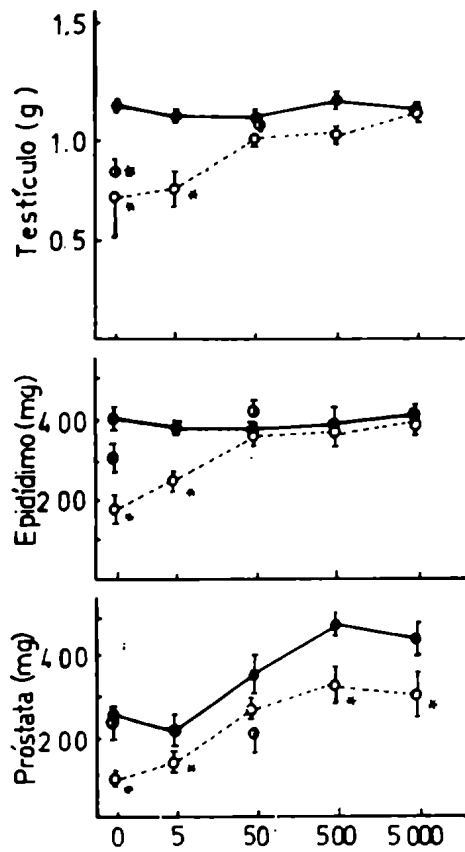


Figura II. 5. Peso testicular y de órganos sexuales accesorios en animales normales (●), diabéticos (○) y diabéticos tratados con insulina (◌). Todos los animales fueron tratados con las dosis indicadas de propionato de testosterona ($\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$) (abscisas).

produjo una recuperación total del peso testicular y del de epidídimo. Por otra parte, si bien las diferencias en el peso de próstata no fueron significativas para los lotes tratados con 50 ug, en los animales normales la administración de dosis mayores produjo un incremento significativo en el peso de este órgano que no se verificó en los diabéticos. Esto indicaría la necesidad de la insulina para la expresión plena del efecto trófico de los andrógenos.

Con el objeto de determinar las posibles alteraciones en el mecanismo de acción de la T, que pudiesen dar cuenta de la menor sensibilidad del tejido prostático en los animales diabéticos a la estimulación androgénica, se procedió al estudio de la actividad de la 5α -reductasa.

Actividad de la 5α -reductasa prostática.

Sorprendentemente, la actividad específica de la 5α -reductasa en la fracción microsomal se encontró significativamente aumentada en los animales diabéticos (Figura II.6). Sin embargo el tratamiento con dosis crecientes de PT no alteró en forma significativa esta actividad mientras que en los controles hubo una correlación positiva ($r^2 = 0,94$; $p < 0,001$) entre la actividad espe-

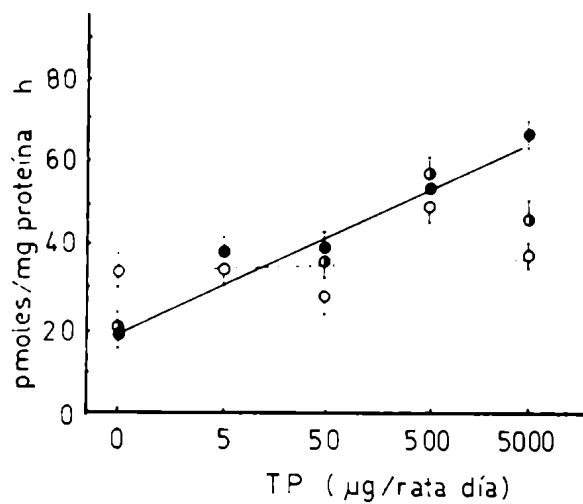


Figura II.6. Actividad específica de la 5 α -reductasa en próstata de animales control (●), diabéticos (○) y diabéticos tratados con insulina (◐) inyectados con distintas dosis de propionato de testosterona.

cífica de esta enzima y las dosis de PT administradas. El tratamiento con insulina normaliza tanto la actividad basal como la respuesta a la administración de PT.

Contrariamente a lo observado en la actividad específica, la actividad total de la 5α -reductasa, expresada por órgano, se halló notablemente disminuída en los animales diabéticos, persistiendo esta diferencia con la administración de altas dosis de PT (Figura II. 7).

Estos resultados indicarían que el aumento observado en la actividad específica de la fracción microsomal no sería debido a una activación selectiva de la enzima, sino más bien a una alteración en la composición proteica de dicha fracción, con el consiguiente aumento en la concentración relativa de la 5α -reductasa. En este respecto, cambios en la composición de las membranas microsomales de hígado han sido recientemente demostrados en ratas diabéticas (234).

Actividad de 3α y 3β -HDH.

La actividad de estas enzimas, en próstata ventral, se determinó en las fracciones microsomal y soluble.

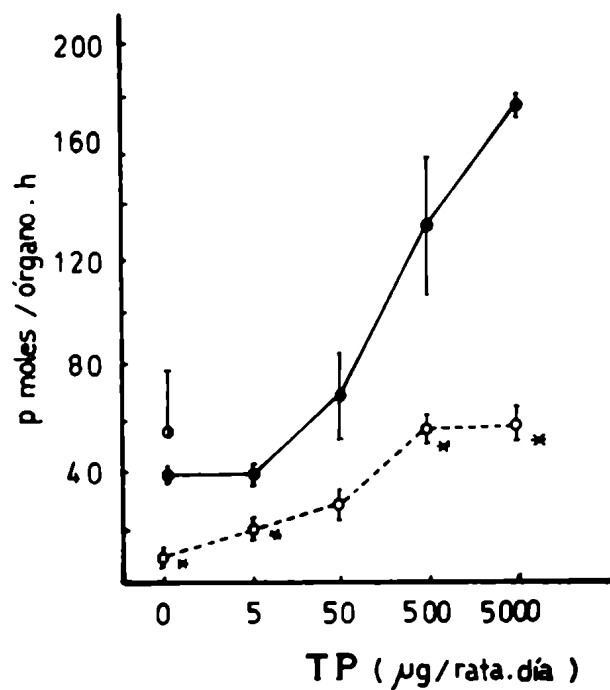


Figura II.7. Actividad total de la 5 α -reductasa en próstata de animales control (●) y diabéticos (○), tratados con dosis crecientes de propionato de testosterona.

Como se aprecia en la Figura II. 8, la relación $3\alpha/3\beta$ - diol formados en la fracción microsomal por incubación con DHT- ^3H , está marcadamente alterada en los animales diabéticos.

La administración de insulina normaliza la actividad de la 3α -HDH, mientras que la 3β -HDH permanece anormalmente elevada. Ambas actividades tienden igualmente a normalizarse cuando los animales diabéticos son tratados con una dosis de 500 ug de PT, en tanto que la dosis menor (50 ug) resulta inefectiva en la reversión de esta alteración.

Cuando los estudios enzimáticos se realizaron en la fracción soluble, se encontró que ambas actividades se hallaban disminuidas en igual proporción (Figura II. 9), no habiendo cambios significativos en la relación $3\alpha/3\beta$ -diol formados. Como en el caso anterior, el tratamiento con insulina produjo una normalización parcial de la alteración.

Actividad de la 5α -reductasa en epidídimo.

A diferencia de lo observado en próstata, la actividad específica de la enzima es notablemente menor en los animales diabéticos, restaurándose tanto por el tratamiento con insulina como

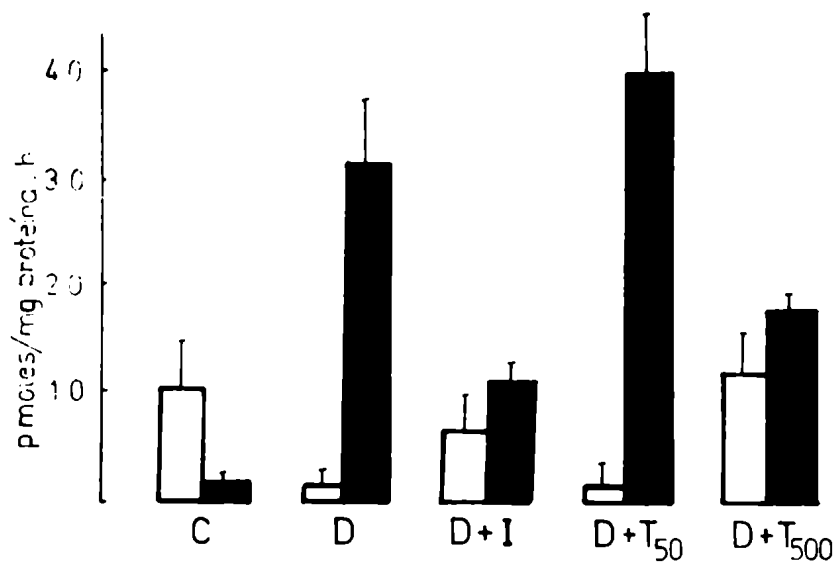


Figura II. 8. Actividad de 3α y 3β -hidroxisteroide deshidrogenasa en la fracción microsomal de próstata ventral de animales control (C), diabético (D), diabéticos tratados con insulina (D + I) o con 50 ó 500 μ g de PT (D + T₅₀ - D + T₅₀₀ respectivamente).
Barras blancas = 3α -diol.
Barras negras = 3β -diol.

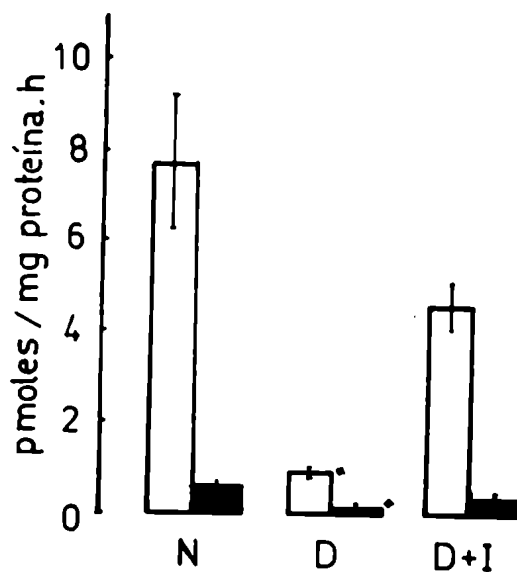


Figura II. 9. Actividad de 3 α y 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en la fracción soluble de próstata ventral en animales normales (N), diabéticos (D) y diabéticos tratados con insulina (D + I). Barras blancas = 3 α -diol. Barras negras = 3 β -diol.

con PT (500 ug) (Figura II.10). Los mismos resultados se obtienen expresando los datos en términos de actividad total por órgano, lo que indicaría que, en el caso del epidídimo, no se producirían alteraciones considerables en la composición proteica de la fracción microsomal.

Niveles plasmáticos de andrógenos

Con el objeto de determinar si las alteraciones en el metabolismo de la T en los órganos sexuales accesorios se traducían en una modificación de los metabolitos circulantes, se procedió a medir los niveles séricos de T+DHT, 3α y 3β -diol.

Los resultados se muestran en la Figura II.11. Como puede observarse, a pesar de la marcada disminución en los niveles de T+DHT en los animales diabéticos, los valores de 3α y 3β -diol no difieren significativamente de los determinados en los controles.

Receptores para andrógenos en próstata.

Determinación de los sitios citoplasmáticos totales de unión para el andrógeno sintético R1881 en condiciones de intercambio.

La Figura II.12 muestra una curva típica de saturación

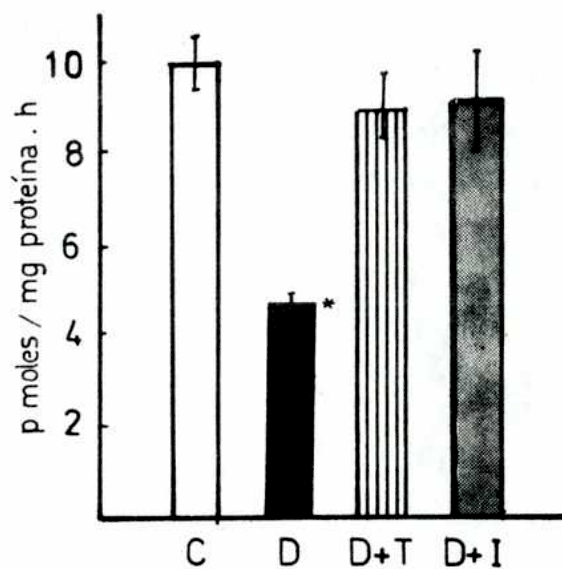


Figura II. 10. Actividad de 5α -reductasa en la fracción microsomal de epidídimos de ratas controles (C), diabéticas (D), diabéticas tratadas con 500 ug de PT (D + T) y diabéticas tratadas con insulina (D + I).

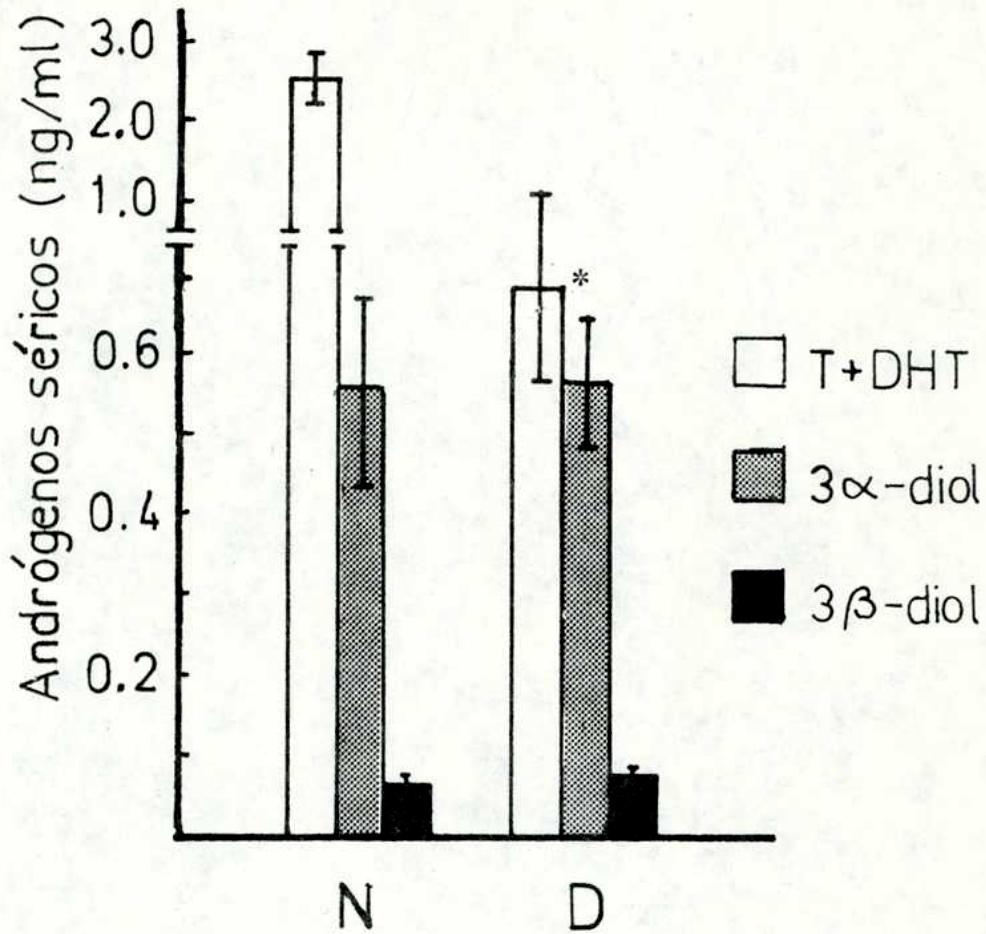


Figura II.11. Niveles de andrógenos circulantes en ratas normales (N) y diabéticas (D). * = $P < 0,05$

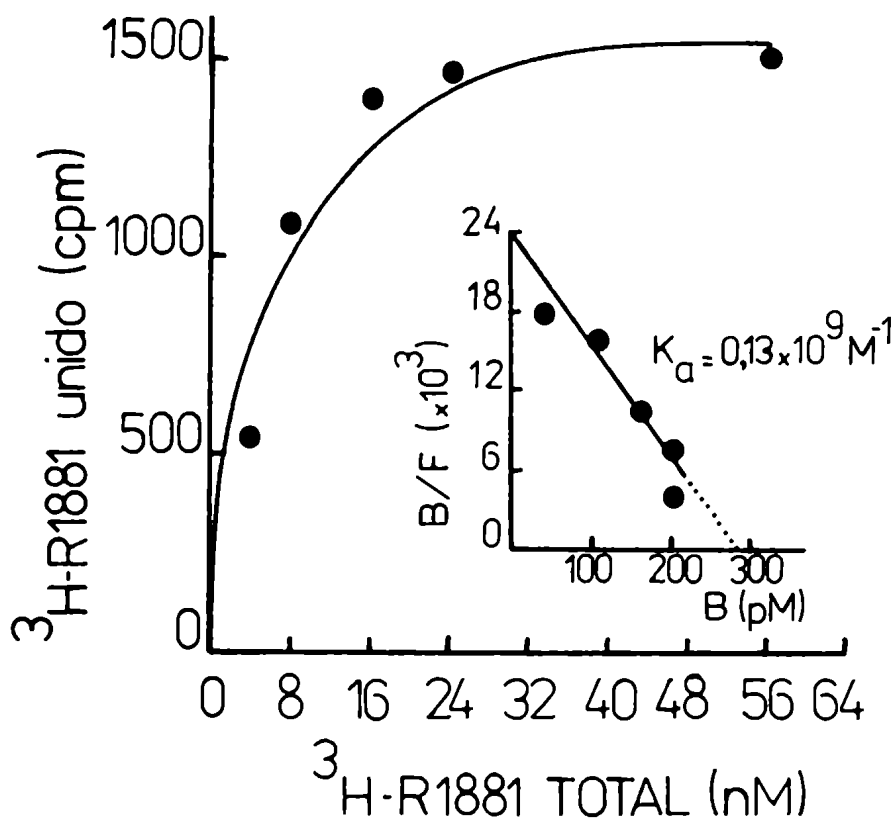


Figura II. 12. Curva de saturación (ensayo de intercambio) del andrógeno sintético $^3\text{H-R1881}$ específicamente unido a receptores citosólicos de próstata de rata control. Insertado se puede ver el gráfico de Scatchard correspondiente.

para la unión de R1881-³H a citosol de próstata de animales normales. La unión específica resultó saturable a una concentración de aproximadamente 20 nM luego de 16 hs de incubación a 15°C.

Cuando los datos de unión se sometieron al análisis de Scatchard, se obtuvo para los controles una constante de asociación (K_a) de $0,13 \pm 0,01 \cdot 10^9 M^{-1}$. Para los otros grupos no hubo diferencias significativas en este parámetro, siendo los valores obtenidos : Diabéticos: $0,17 \pm 0,02 \cdot 10^9 M^{-1}$; Diabéticos+ PT: $0,12 \pm 0,01 \cdot 10^9 M^{-1}$ y Diabéticos + Insulina: $0,10 \pm 0,02 \cdot 10^9 M^{-1}$.

Determinación de los sitios libres de unión

Luego de 16 hs de incubación a 0°C con cantidades crecientes de R1881-³H se observa que la saturación se alcanza a una concentración relativamente baja del esteroide (4 nM), indicando un número limitado de sitios de unión (Figura II. 13).

Unión de R1881-³H al extracto nuclear.

La Figura II. 14 muestra la curva de saturación de la unión de R1881-³H al extracto nuclear luego de 16 hs de incuba

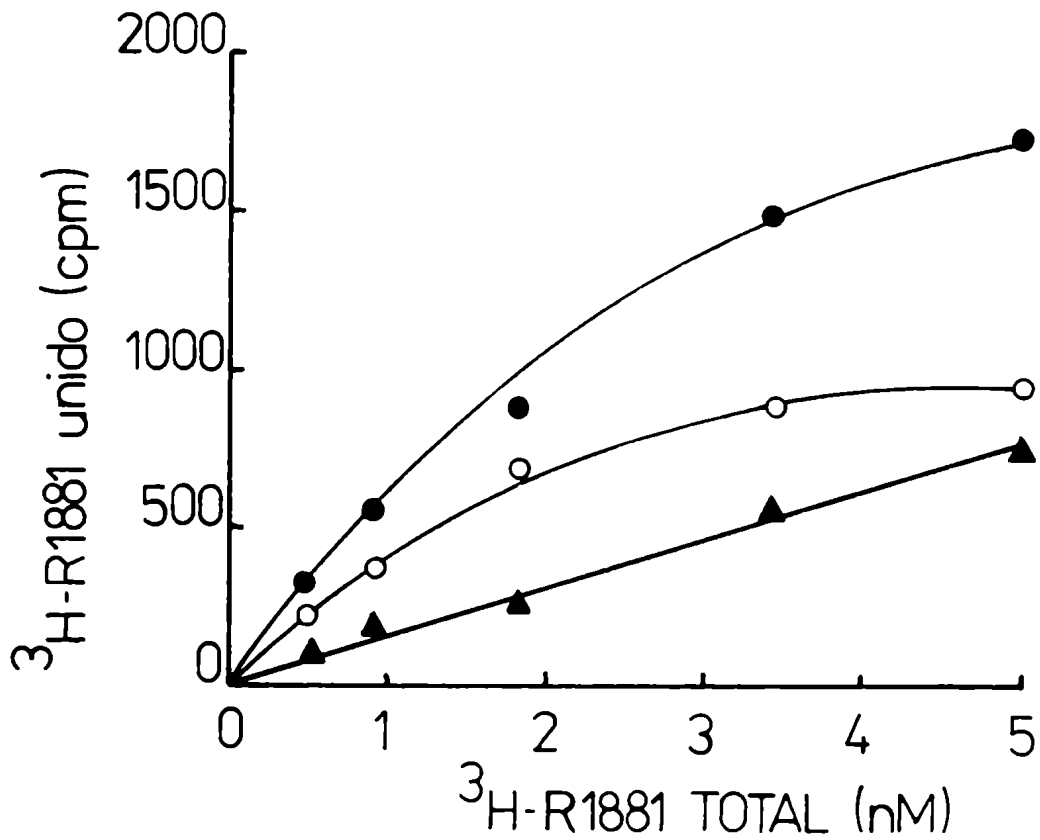


Figura II. 13. Curva de saturación de $^3\text{H-R1881}$ a receptores citosólicos de próstata de rata control. Alícuotas de citosol de próstata, proveniente de un "pool" de 10 animales, fueron incubados a 0°C durante 16 h con concentraciones crecientes de hormona marcada, con (▲) o sin exceso de 500 veces de R1881 frío. La unión específica se calculó como diferencia entre ambos (●).

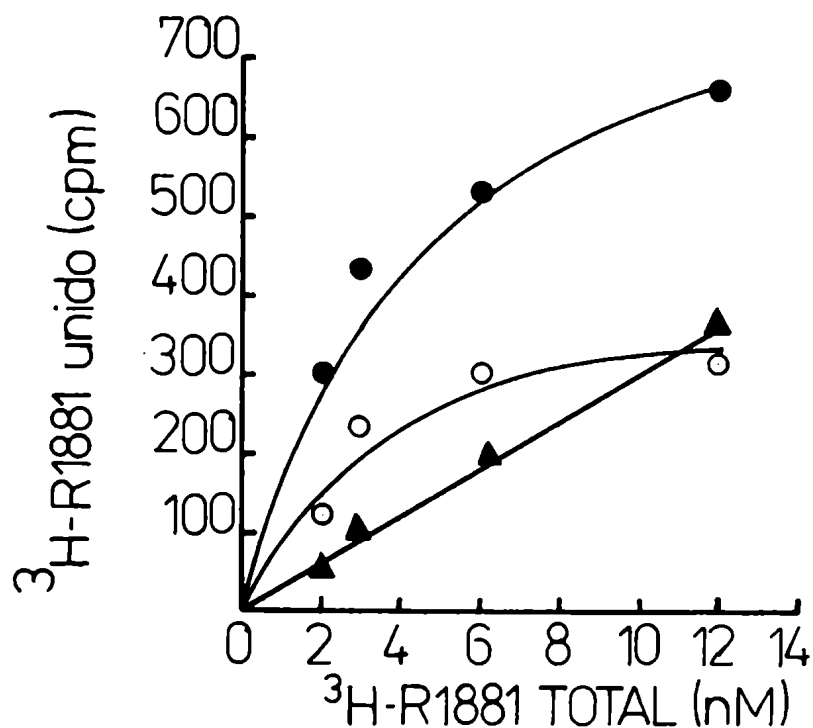


Figura II. 14. Curva de saturación de la unión de $^3\text{H-R1881}$ al extracto nuclear de ratas controles, luego de 16 horas de incubación a 0°C .

(●) unión total

(○) unión específica

(▲) unión en presencia de R1881 frío (exceso)

ción a 0°C. La unión específica resultó saturable a una concentración de 6 nM .

Comparación entre ratas normales y diabéticas. Efecto del tratamiento con PT o con insulina.

Según puede observarse en la Tabla II.1, el estado diabético produce un descenso significativo en la capacidad de unión de andrógenos en próstata (citosólicos y nucleares), expresada tanto en sitios totales o sitios libres. Este resultado concuerda con lo demostrado anteriormente en el laboratorio, usando la técnica semicuantitativa de geles de agarosa (232).

El tratamiento con insulina aumenta levemente la capacidad de unión en tanto que la administración de PT a los animales diabéticos produce una notable mejoría en este parámetro llegando casi a la normalidad en el caso de la unión nuclear.

Receptores para PRL en próstata.

Dado que la PRL, como se vió en la sección anterior, ejerce un efecto regulatorio tanto sobre el metabolismo de andrógenos como sobre la unión de los mismos a sus receptores espe-

Tabla II.1. Comparación de sitios de unión de ^3H -R1881 citosólicos y nucleares en próstata de rata normal, diabética, diabética tratada con testosterona y diabética tratada con insulina.

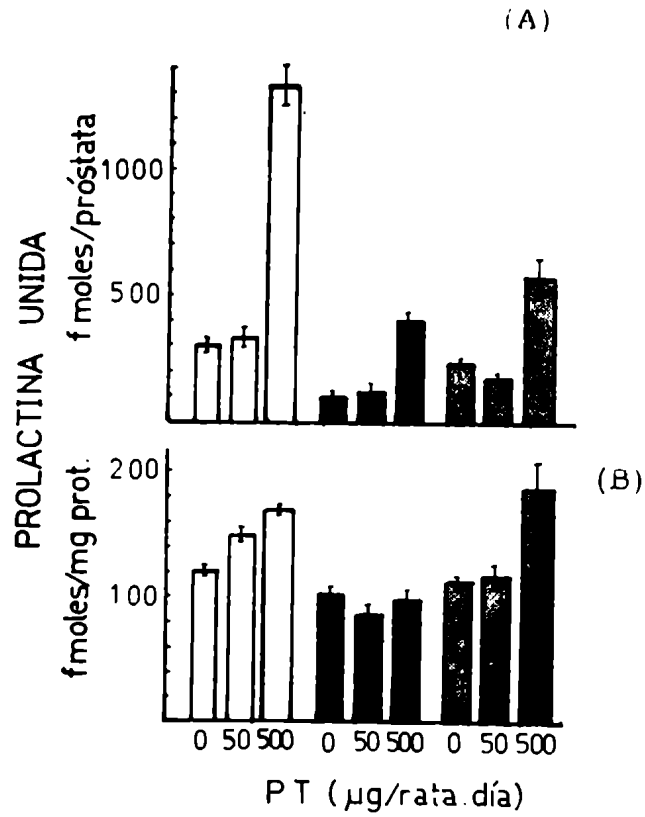
Animales	Citosol (fmoles/mg) Libres	Totales	Sitios/cél.	Nuclear fmoles/ μg DNA
Control	14,8 \pm 1,5*	94,2 \pm 11,3**	11230 \pm 765*	2,87 \pm 0,4*
Diabético	2,8 \pm 1,0	12,6 \pm 3,0	7043 \pm 234	1,80 \pm 0,06
Diabético + Testosterona	29,7 \pm 7,7*	41,1 \pm 3,1*	9665 \pm 586*	2,47 \pm 0,15*
Diabético + Insulina	8,4 \pm 1,3*	18,3 \pm 2,4	7709 \pm 156	1,97 \pm 0,04

Los valores son promedio \pm E. S. de determinaciones por triplicado. Cada grupo consistía de 10 animales y las próstatas fueron agrupadas en tres "pools" separados. Respecto de los animales diabéticos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

cíficos, se consideró de interés la determinación de los receptores para PRL en próstata de animales diabéticos y de su regulación por andrógenos.

El número de receptores para PRL, expresado como fmoles de hormona específicamente unida por órgano, está significativamente disminuído en los animales diabéticos (Figura II.15 A). La disminución es igualmente notable cuando los resultados se expresan por ug de ADN (Figura II.16). Por otra parte, el contenido de ADN por órgano es menor en ratas diabéticas (12 vs. 22 ug en los controles). Esto indicaría que la disminución en el número de receptores por órgano es debida no sólo a un menor contenido de receptores por célula, sino también a una disminución en el número de células por órgano.

El tratamiento con PT produjo un notable incremento en el número de receptores por órgano en los controles, mientras que en los diabéticos sólo se eleva hasta alcanzar el valor normal basal (Figura II.15.A). Un esquema similar se observa en el contenido de ADN por órgano, indicando que la hiperplasia producida por el tratamiento con andrógenos es considerablemente menor en los animales diabéticos.



125

Figura II. 15. Unión de prolactina- I a membranas de próstata de animales controles (barras blancas), diabéticos (barras negras) y diabéticos tratados con insulina (barras sombreadas) tratados con las dosis indicadas de PT. .

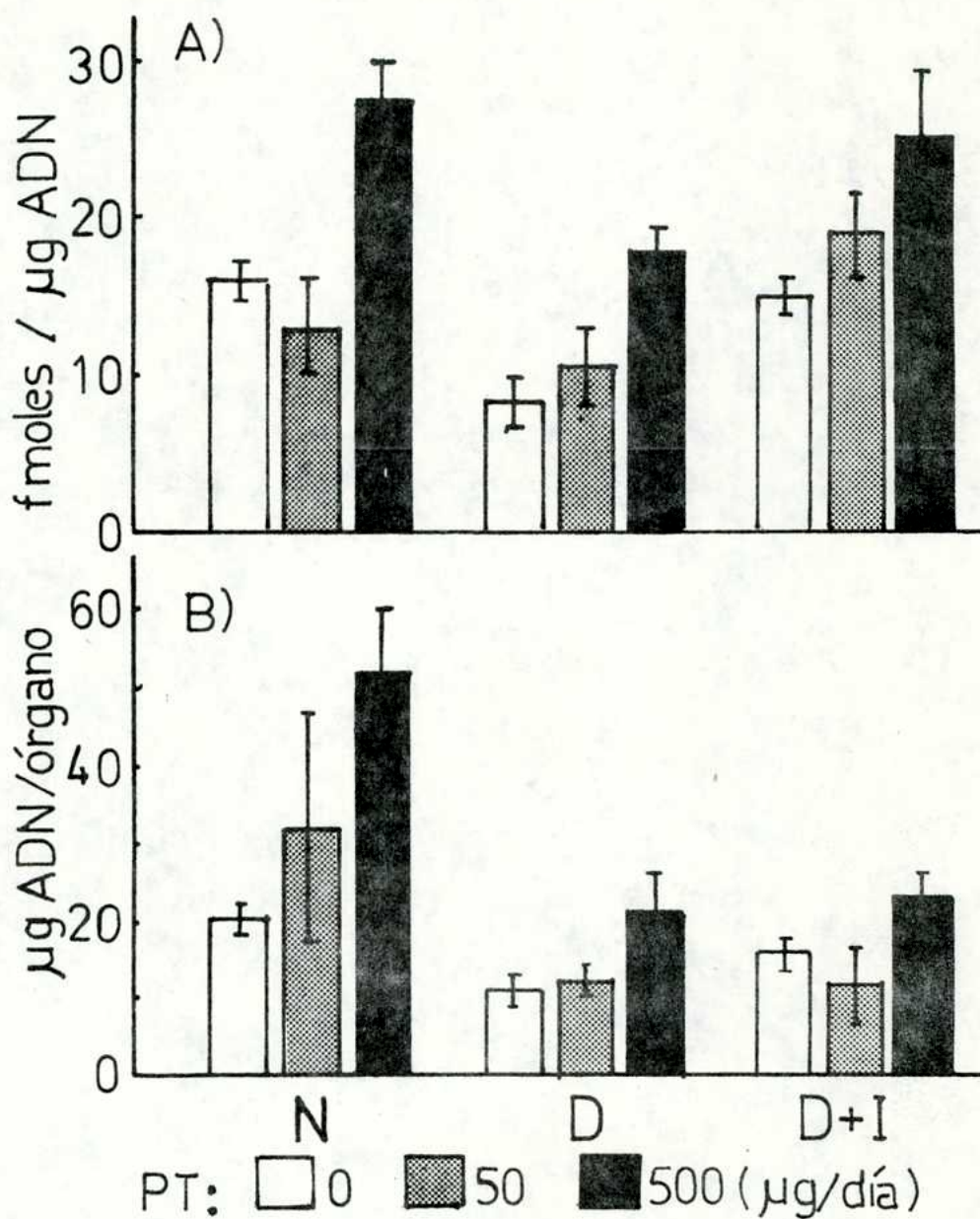


Figura II.16. A) PRL específicamente unida a próstatas de ratas normales (N), diabéticas (D) y diabéticas tratadas con insulina (D+I). B) Contenido de ADN en próstatas de los mismos animales.

Cuando los resultados se expresan por mg de proteína, no se observan diferencias significativas entre los animales diabéticos y los controles (Figura II.15.B). Sin embargo, en los primeros no se produce el aumento en la concentración de receptores por tratamiento con PT.

En todos los casos la administración de insulina produjo una normalización parcial tanto en el número inicial de receptores como en la respuesta al tratamiento con andrógenos.

Metabolismo de andrógenos y receptores en hipófisis e hipotálamo

El peso de las hipófisis e hipotálamos resultó ser significativamente menor en los animales diabéticos (Figura II.17). El tratamiento con insulina los restablece totalmente.

Las incubaciones de T-³H se realizaron usando como fuente enzimática el precipitado de 105.000 x g de homogenatos de hipófisis e hipotálamo.

La actividad de la 5 α -reductasa en hipófisis, expresada como suma de metabolitos 5 α -reducidos formados, fue significativamente menor en los animales diabéticos (Figura II.18). Sin embargo, en estos últimos se produjo un incremento en la relación

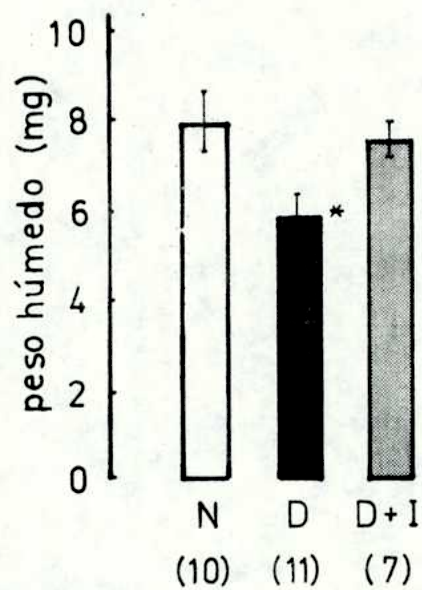


Figura II. 17. Peso de hipófisis de animales normales (N), diabéticos (D) y diabéticos tratados con insulina (D + I). Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales en cada lote.

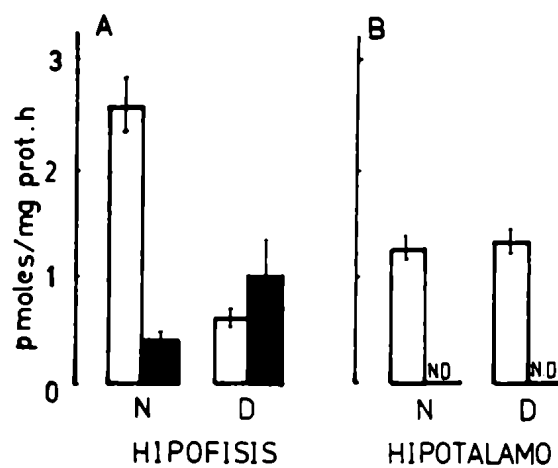


Figura II.18 Metabolitos formados por incubación de fracciones microsomales de hipófisis e hipotálamo con T-³H.
Barras blancas = DHT
Barras negras = 3 α + 3 β -diol

$3\alpha + 3\beta$ -diol /DHT formados, lo que indicaría una mayor actividad de las 3-hidroxiesteroide deshidrogenasas asociadas a membrana.

En hipotálamo no se observaron cambios significativos en la formación de DHT tritiada a partir de T entre ambos grupos (Figura II.18). Tanto en los animales diabéticos como en los controles, la velocidad de formación de androstanodiol en hipotálamo fue no detectable.

Los estudios realizados en hipófisis e hipotálamo, usando T-³H como ligando, indicaron una notable disminución en la concentración de receptores en las ratas diabéticas, parcialmente revertida por el tratamiento con insulina (Figura II.19).

DISCUSION

Los resultados obtenidos con los animales diabéticos, tratados con PT, indican que la disminución en el contenido de ABP presentada por estos animales, se debe fundamentalmente a la reducción en la producción de T, con la consiguiente disminución en la estimulación de su síntesis por parte de la célula de Sertoli.

Contrariamente a lo esperado por tratarse de una glico-

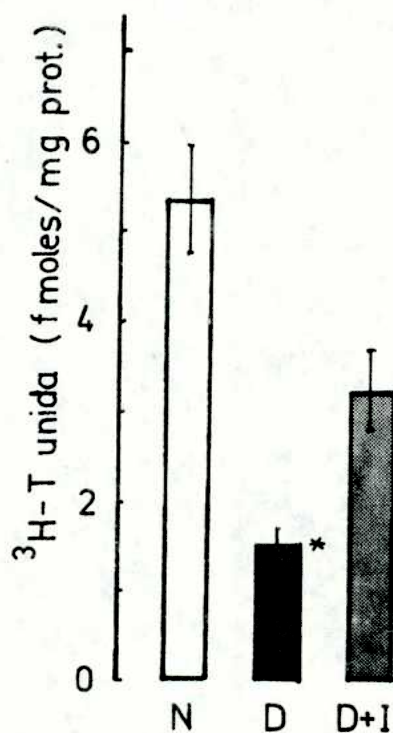


Figura II.19. Unión de $^3\text{H-T}$ a la fracción soluble de hipófisis de animales normales (N), diabéticos (D) y diabéticos tratados con insulina (D + I).
*indica $p < 0,05$ comparado con el control.

proteína, la insulina no sería un requisito esencial para su síntesis.

Aunque los niveles de FSH sérica no parecen estar alterados en la diabetes experimental (235,236), la disminución en el contenido de ABP podría ser igualmente una consecuencia de una menor respuesta de la célula de Sertoli a esta gonadotropina. Los resultados presentados indican sin embargo que los animales diabéticos presentan una hipersensibilidad a la FSH. Esta hipersensibilidad, propia de los animales prepúberes, sería coherente con la hipótesis que supone que, en muchos aspectos, el efecto de la diabetes sobre la función sexual es asimilable a un retardo en el proceso de maduración.

No pueden descartarse, sin embargo, otras posibles causas para esta respuesta aumentada en la estimulación de ABP por FSH, tales como una alteración en los mecanismos de control de su síntesis.

Con respecto a los órganos sexuales accesorios, el hecho de que, en el caso del epidídimo, el tratamiento con PT haya restaurado totalmente el peso del órgano, indica que, similarmente a lo observado en el caso de la ABP, las alteraciones observadas en el estado diabético se deberían a la disminución en la concentra

ciones de andrógenos circulantes.

En el caso de la próstata, sin embargo, parecería existir un requerimiento estricto de insulina para mantener su trofismo. Este resultado sería coherente con el hecho de que la adición de insulina es necesaria para la manutención de la morfología del tejido prostático en cultivo (222).

Una posible explicación para la diferencia en la respuesta ante el estímulo androgénico entre la próstata y el epidídimo en ausencia de insulina, podría estar dada por el diferente comportamienuto de la 5α -reductasa en ambos órganos.

La andrógeno dependencia de la 5α -reductasa ha sido demostrada tanto en la próstata como en el epidídimo (79,80). Por lo tanto, en ambos casos sería dable esperar una disminución en la actividad de dicha enzima como consecuencia de la reducción en los niveles de T circulante en los animales diabéticos.

Esto ocurre efectivamente en el epidídimo, tanto cuando la actividad se expresa por órgano como en términos de actividad específica. En próstata, en cambio, si bien la actividad total se encuentra notablemente disminuída en las ratas diabéticas, la actividad específica resulta ser superior a la de los controles.

Este hallazgo aparentemente contradictorio, coincide no obstante con lo comunicado por Sandberg (237), en ratas tratadas crónicamente con estreptozotocina (7 mg/kg de peso/día durante 7 días). Este autor atribuye el aumento de la actividad específica de la 5α -reductasa a un efecto tóxico de la estreptozotocina y no considera su posible acción diabetogénica. Sin embargo, el hecho de que como se ha demostrado en el presente trabajo, la alteración sea revertida por tratamiento con insulina, indica que los cambios observados se deberían a la deficiencia de esta hormona más que a un efecto directo de la droga.

Por otra parte, en los animales diabéticos, la T es incapaz de aumentar la actividad específica de la enzima en próstata, lo que indicaría que la insulina es necesaria para la inducción por andrógenos de la actividad de la 5α -reductasa en este órgano.

La incapacidad de la T "per se" para normalizar la actividad de esta enzima, clave en el mecanismo de acción androgénica, podría explicar en parte la menor respuesta del tejido prostático a los andrógenos en los animales diabéticos.

Por el contrario, el epidídimo no parece tener un requerimiento estricto de insulina, ya que el tratamiento con PT en los

animales diabéticos normaliza la actividad de la 5α -reductasa con juntamente con una total recuperación del peso del órgano.

Con respecto a las alteraciones observadas en las actividades de las 3α y 3β -HDH en próstata ventral, se hace más difícil establecer sus posibles consecuencias fisiológicas. Como se ha mencionado en la Introducción, si bien se acepta que dichas enzimas contribuyen a controlar la concentración intracelular de DHT, a través de su conversión en 3α y 3β -diol, los posibles efectos de estos últimos no han sido aún plenamente establecidos.

El aumento en la 3β -HDH en la fracción microsomal de la próstata de los animales diabéticos, podría ser en parte debido a la reducción en la actividad de la 3α -HDH, con la consiguiente mayor disponibilidad de sustrato. Asimismo, tal como se ha discutido para el caso de la 5α -reductasa, el aumento aparente en la actividad específica puede ser una consecuencia de una alteración en la composición de las membranas que integran la fracción microsomal.

El efecto similar observado con la administración de insulina o de PT en la dosis de 500 ug, podría indicar que esta alteración está mediada en parte por la reducción en los andrógenos

circulantes.

En la fracción soluble, tanto la 3α como la 3β -IIDH se encontraron disminuídas en igual proporción. Esta disparidad en las alteraciones observadas en ambos compartimentos subcelulares podría reforzar la hipótesis de la existencia de isoenzimas, postulada por Clark y col. (47). Hasta el momento, sin embargo, esta sería la primera demostración de una diferencia en la regulación hormonal entre las enzimas solubles y las particuladas.

Dada la naturaleza de las alteraciones enzimáticas observadas, es difícil establecer una correlación entre las mismas y los valores séricos de los distintos metabolitos. No obstante, parece probable que dichos valores reflejen fundamentalmente el metabolismo testicular de la T. En este sentido, Tesone (232) había demostrado previamente un incremento en la conversión a metabolitos reducidos en el túbulo seminífero, que podría explicar el hallazgo de valores relativamente normales de 3α y 3β -diol a pesar del descenso en los niveles de T+DHT.

En lo referente al receptor citoplasmático, los resultados presentados confirmarían los hallazgos previos realizados en el laboratorio (232) mediante geles de agarosa y las observaciones

de Oksane y Tuohima (223) relativas a la disminución de la captación y retención de T-³H en animales diabéticos. El empleo de técnicas de intercambio ha permitido además demostrar que la alteración observada se debe a una disminución en el contenido total del receptor y no a una simple disminución en el número de sitios libres de unión. Por otra parte, el número de receptores en el núcleo estaría igualmente reducido en la próstata de los animales diabéticos, concordantemente con las alteraciones observadas en los pasos precedentes del mecanismo de acción androgénica.

En cuanto a las posibles causas de la disminución en el número de receptores, es probable que, al igual que en el caso de las enzimas estudiadas, ésta sea parcialmente debida a la disminución en los andrógenos circulantes. Esta suposición estaría basada, por una parte, en las demostraciones previas de la disminución en el contenido del receptor para andrógenos producida luego de la castración (105,106), y por otra en el hecho de que el tratamiento de los animales diabéticos con PT produjo una restauración considerable en la concentración de dichos receptores.

Por otra parte, el tratamiento con insulina produjo un incremento discreto en el contenido de receptores acorde con el res

tablecimiento parcial de los niveles de T.

Los resultados obtenidos en los estudios de unión de PRL-¹²⁵I a membranas de próstata indican que el número de receptores para esta hormona está disminuído en los animales diabéticos por estreptozotocina. Esta alteración sería debida no sólo a una disminución en el número de células sino también a una menor concentración de receptores por célula.

La insulina parece ser necesaria para la regulación por andrógenos de los receptores para PRL, ya que sólo en presencia de esta hormona se verifica un incremento en el número de sitios de unión por mg de proteína (que es una medida de la densidad de receptores en la membrana), por tratamiento con T. Por lo tanto, en los animales diabéticos, la T sería incapaz de incrementar la sensibilidad del tejido prostático hacia la PRL.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Smith y col (238) trabajando con un tumor mamario que responde a la PRL. Estos autores demostraron que el número de receptores para PRL en el tumor disminuye significativamente cuando el mismo es transplantado a ratas diabéticas por estreptozotocina. Esta disminución es también evidente comparando el número de recep-

tores para PRL en hígado de los animales diabéticos con los respectivos controles.

El requerimiento de insulina para la regulación de los receptores lactogénicos sería por lo tanto un mecanismo generalizado, cuyas implicaciones son por el momento difíciles de discernir.

Dada la complejidad de las interrelaciones entre los parámetros estudiados, esquematizadas en la Figura II. 20, es difícil establecer relaciones causales para las alteraciones observadas en el mecanismo de acción de los andrógenos en los órganos sexuales accesorios de los animales diabéticos.

No obstante, en primera instancia es posible discernir entre las alteraciones producidas por la disminución en los niveles de andrógenos, y que son por lo tanto revertidas por tratamiento con PT, y aquellas que sólo se normalizan por tratamiento con insulina, indicando un requerimiento estricto de esta última hormona. Al primer grupo pertenecerían por ejemplo la disminución del peso del epidídimo y su contenido de ABP y al segundo la actividad de la 5α -reductasa y los receptores para PRL en próstata.

Se ha comprobado además, que un mismo parámetro puede verse afectado de un modo diferente según el órgano estudiado. Así, la actividad de la 5α -reductasa en epidídimo parece estar principalmente bajo control androgénico, mientras que en la próstata el tratamiento exclusivo con andrógenos resulta insuficiente para normalizar dicha actividad.

El diferente comportamiento podría deberse al hecho de que la próstata es además tejido efector de otra hormona, la PRL, que ejercería un efecto modulador sobre la estimulación androgénica.

En la sección precedente se ha demostrado que esta hormona hipofisaria es capaz de modificar la concentración de receptores citosólicos para andrógenos en próstata y de estimular la actividad de la 5α -reductasa en dicho órgano pero no en epidídimo.

Siendo la insulina aparentemente necesaria para la mantención del receptor para PRL, una posible explicación para la falta de efectividad del PT para normalizar la actividad de la 5α -reductasa prostática en los animales diabéticos, podría estar dada por la falta del estímulo sinérgico de la PRL, que no sería ne-

cesario en el caso del epidídimo.

Sin embargo, no es posible excluir la posibilidad inversa, es decir que la alteración se produzca a nivel de la regulación por andrógenos del receptor para PRL. Aún cuando el mecanismo bioquímico responsable de esta regulación no ha sido establecido hasta el momento, es probable que la 5α -reducción de la T sea necesaria para que se manifieste su efecto estimulador sobre el número de receptores para PRL, como lo sugiere la alta efectividad de la DHT para aumentar la capacidad de unión de esta hormona (176).

De este modo, la disminución en la actividad de la 5α -reductasa se traduciría en una menor capacidad de la T para aumentar el número de receptores para PRL y por ende en una menor sensibilidad del tejido prostático para responder al estímulo trófico de esta última.

A las hipótesis mencionadas sería necesario agregar los posibles efectos de la insulina sobre la actividad biosintética de la próstata, que podrían afectar la síntesis de los receptores y/o enzimas metabolizantes de andrógenos.

Las alteraciones mencionadas no parecen limitarse, por

otra parte, a los órganos sexuales accesorios. Tanto la actividad de la 5α -reductasa como el contenido de receptores se encontraron alterados en hipófisis de los animales diabéticos.

En el caso de la 5α -reductasa de hipófisis, la disminución observada en su actividad no sería mediada por la reducción en los niveles séricos de andrógenos, ya que éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre esta enzima (52).

Las alteraciones observadas en la 5α -reductasa hipofisaria y en el contenido de receptores podrían contribuir a explicar las modificaciones en el mecanismo de retroalimentación por esteroides, posiblemente responsables de la disminución en la respuesta de la LH a la castración descrita en estos animales (171).

De los datos presentados se desprende que las alteraciones producidas por el estado diabético no se limitan a un nivel en particular, indicando que la insulina estaría involucrada no sólo en los procesos intracelulares conducentes a la síntesis de andrógenos, como ha sido anteriormente demostrado (230,231), sino también en los complejos mecanismos que condicionan la respuesta de sus tejidos efectoros.

III. EFECTOS DE LA ANDROGENIZACION

NEONATAL

Los efectos de los andrógenos sobre la diferenciación sexual, tendientes a la futura reproducción del individuo, se ponen en marcha ya durante la vida fetal, es decir aún antes de que éste haya comenzado su vida independiente (239). No obstante, la plena capacidad reproductiva se alcanza considerablemente más tarde, luego de un proceso de maduración que requiere la presencia de un conjunto hormonal sujeto a complejas interrelaciones, algunas de las cuales han sido analizadas en las secciones precedentes.

En los mamíferos, este proceso de maduración abarca un período considerable de la vida del animal, sin embargo, existe un intervalo crítico, inmediatamente después del nacimiento, durante el cual los andrógenos provocan cambios profundos e irreversibles tanto en la diferenciación de estructuras nerviosas como sobre los tejidos periféricos.

El efecto de los esteroides gonadales durante el período neonatal fue estudiado inicialmente en la hembra, donde la admi-

nistración de dosis farmacológicas de andrógenos o de estrógenos conduce a una supresión del ritmo cíclico de secreción de gonadotrofinas, dando una secreción tónica típica del macho (240).

En el macho, sin embargo, Moguilevsky y col (241) demostraron que la administración de PT en el segundo día de vida induce, en el animal adulto, niveles anormalmente altos de FSH y PRL, mientras que no produce cambios en los de LH y T.

Estos hechos permiten suponer que, durante el período neonatal, los andrógenos testiculares serían los responsables del proceso de diferenciación sexual del hipotálamo a través de un efecto de masculinización del sistema hipotálamo-hipofisario.

A nivel periférico, la administración neonatal de andrógenos produce cambios irreversibles en la actividad de determinadas enzimas metabolizantes de esteroides.

Ghraf y col (242) demostraron que la administración de T en el primer día de vida produce, cuando el animal llega a la adultez, una elevación de la 3α -HDH en riñón, mientras que el mismo tratamiento disminuye la actividad de la $\Delta^5-3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa en el testículo (243).

Por otra parte, la castración neonatal induce un aumento

mucho mayor de la 5α -reductasa adrenal que el observado luego de la castración del animal adulto (244), que indicaría igualmente un efecto crítico de los andrógenos durante los primeros días de vida.

En animales intactos, la administración de altas dosis de andrógenos en el período neonatal produce además una inhibición considerable del desarrollo sexual.

El tratamiento con PT de ratas machos, entre los 2 y 5 días después del nacimiento, inhibe el crecimiento corporal y causa atrofia de los testículos, próstata y vesículas seminales (245).

La espermatogénesis, sin embargo, no se ve mayormente afectada por este tratamiento, y los animales androgenizados conservan su fertilidad (246). No obstante, estos animales presentan una menor capacidad reproductiva, probablemente debida a los trastornos observados en su conducta sexual (247).

A pesar de las evidencias que se acaban de mencionar, que indican el papel fundamental de los andrógenos neonatales en los procesos de diferenciación y maduración sexual, poco es lo que se sabe respecto de las estructuras afectadas por su acción o sobre los mecanismos involucrados en la misma.

Se ha comprobado que los animales adultos, castrados neonatalmente, presentan una menor respuesta a los andrógenos que aquellos que fueron mantenidos con T desde el nacimiento (248-250). Este hecho indicaría que, de algún modo, durante el período neonatal, los andrógenos podrían condicionar la futura respuesta de sus tejidos efectores.

Por otra parte, el hecho de que la inhibición del desarrollo de los órganos sexuales accesorios de los animales intactos, androgenizados neonatalmente, se halle asociado a niveles normales de T circulante, sugiere la existencia de alteraciones en el mecanismo de acción de andrógenos, que podrían atribuirse a una falla en este mecanismo de "programación" durante los primeros días de vida.

Con el objeto de verificar esta hipótesis, se procedió a estudiar el contenido de ABP, la actividad de la 5α -reductasa y las $3\alpha/\beta$ -HDH y el contenido de receptores para andrógenos en ratas machos inyectadas con 1 mg de PT en el 2^{do} día de vida.

Asimismo, en un intento de localizar la causa de la secreción anormal de gonadotrofinas observada en estos animales (241), se midió la actividad de la 5α -reductasa y el contenido de re-

ceptores en hipófisis e hipotálamo.

RESULTADOS

La Tabla III. 1 muestra el efecto de la androgenización neonatal sobre el peso corporal, de testículo y de los órganos sexuales accesorios en animales de 27 y 90 días de edad.

En los animales inmaduros se observa una disminución significativa del peso corporal que, sin embargo, desaparece en los adultos.

El peso de testículo y órganos sexuales accesorios es sensiblemente menor en los animales androgenizados, tanto a los 27 como a los 90 días de edad. En los animales inmaduros esta diferencia es igualmente significativa cuando los resultados se expresan por g de peso corporal, lo que indica que no es debida simplemente a un retardo generalizado en el crecimiento.

Niveles séricos de andrógenos y de estradiol.

Como puede observarse en la Tabla III. 2, los niveles de T sérica no se encuentran significativamente alterados en los animales androgenizados. En cuanto a los niveles de 3α -diol, si

Tabla III.1. Peso corporal, de testículo y órganos sexuales accesorios en ratas androgenizadas neonatalmente.

	Adultas (90 días)		Inmaduras (27 días)	
	Controles (30)	Androgenizadas(30)	Controles (20)	Androgenizadas (27)
Peso corporal (g)	320 ± 15	305 ± 12	58,0 ± 1,3	51,0 ± 1,0*
Testículo (mg)	1500 ± 21	1090 ± 23**	192,8 ± 5,4	149,7 ± 2,3**
Epidídimo (mg)	467 ± 25	352 ± 25**	43,9 ± 0,2	32,4 ± 1,9**
Próstata (mg)	310 ± 15	227 ± 10**		

Las cifras entre paréntesis indican el número de animales. Los valores están dados como promedios ± E.S.. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$, comparado con los controles.

Tabla III.2. Esteroides séricos en ratas androgenizadas neonatalmente.

	Adultas (90 días)		Inmaduras (27 días)	
	Controles	Androgenizadas	Controles	Androgenizadas
T + DHT (ng/ml)	3,20 ± 0,70	2,70 ± 0,35	1,79 ± 0,20	1,56 ± 0,20
3 α -diol (ng/ml)	1,57 ± 0,15	2,60 ± 0,35*	2,09 ± 0,28	2,10 ± 0,15
Estradiol (ng/100 ml)	11,6 ± 1,1	9,2 ± 0,7		

Los valores están expresados como promedios ± E.S.. * = $p < 0,01$ cuando se compara con el control.

son normales en los animales de 27 días, en los adultos alcanzan valores significativamente mayores que los de los controles respectivos.

Los niveles séricos de estradiol, medidos en los animales adultos, no mostraron diferencias entre los androgenizados y los controles.

Niveles de ABP.

El contenido de ABP en epidídimo de ratas inmaduras es significativamente menor en los animales androgenizados (Figura III.1), sin embargo, cuando los niveles de esta proteína se midieron en testículo, estos no mostraron diferencias con respecto a los controles.

En los animales adultos, a pesar de la aparente disminución en el contenido de ABP en el epidídimo, expresado por órgano, ésta no resultó significativa, probablemente debido a la enorme variación individual en este parámetro (Figura III.2).

Actividades enzimáticas.

Los datos obtenidos en incubaciones de homogenatos tota-

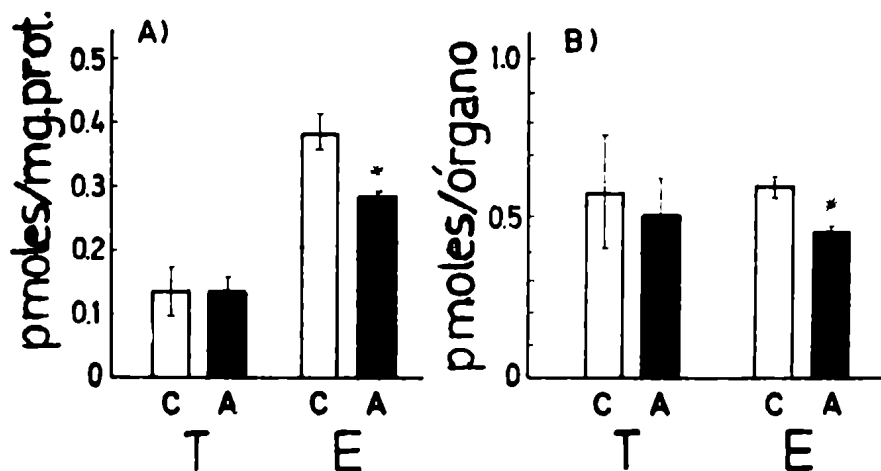


Figura III. 1. Concentración (panel A) y contenido total (panel B) de ABP en testículo (T) y epidídimo (E) de ratas inmaduras inyectadas neonatalmente con vehículo (C) o con 1 mg de PT (A). * = $p < 0,05$ comparado con el control.

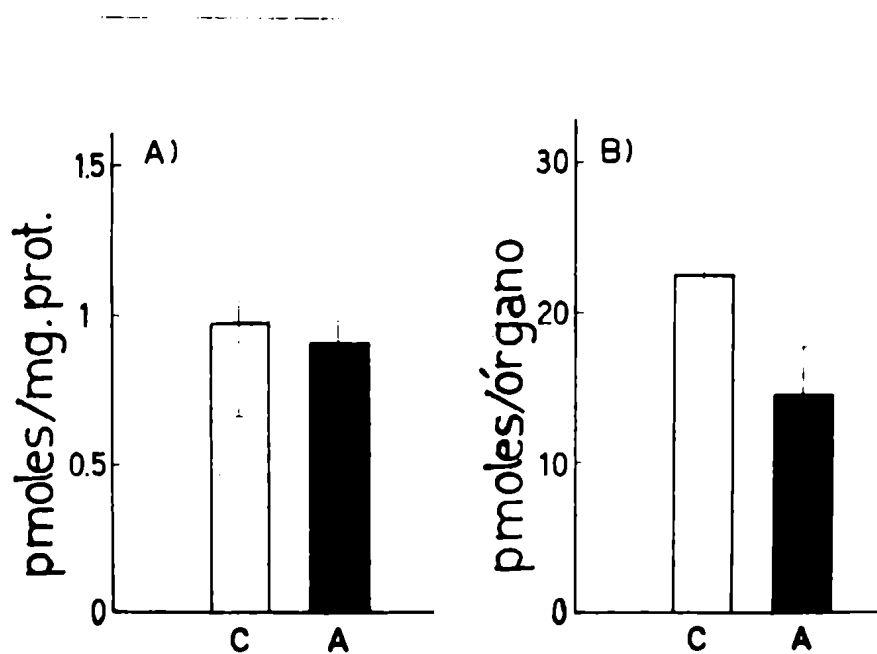


Figura III.2. Concentración (panel A) y contenido total (panel B) de ABP en epidídimo de ratas adultas control (C) y androgenizadas neonatalmente (A).

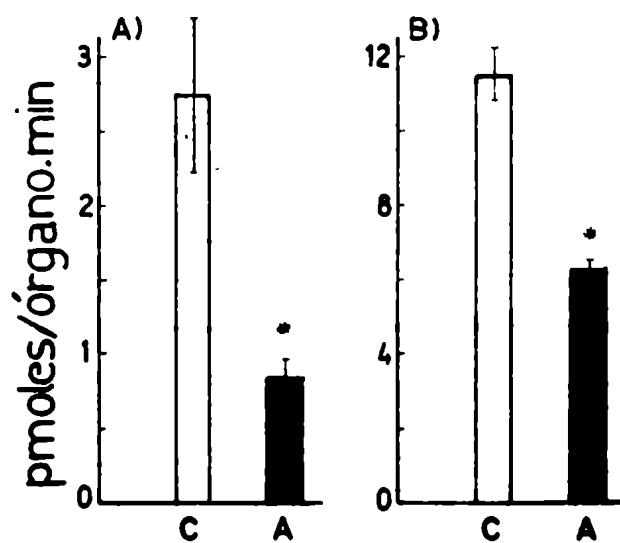


Figura III.3. Actividad de la 5 α -reductasa en homogenatos de próstata (panel A) y epidídimo (panel B) de ratas control (C) y androgenizadas (A). * = $p < 0,05$ comparado con los controles.

les de próstata y epidídimo, muestran una marcada disminución en la actividad total de la 5α -reductasa en los animales androgenizados (Figura III.3). En el caso de la próstata, ésta disminución se observa también en la actividad específica de la enzima (57 % del control, $p < 0,05$). En el epidídimo, sin embargo, la actividad específica de la 5α -reductasa no se encontró significativamente alterada (87 % del control, N.S.).

Las actividades de las 3α y 3β -HDH se determinaron en forma conjunta, dado que no se realizó la separación del 3α y 3β -diol.

Como puede observarse en la Figura III.4, en los animales adultos androgenizados, la actividad de las $3\alpha/\beta$ -HDH está significativamente disminuída tanto en la próstata como en el epidídimo .

A pesar de esta disminución en la actividad total, la actividad específica fue similar a la de los controles (120 y 95 % de los controles para la próstata y el epidídimo respectivamente)

En ninguno de los casos se observaron diferencias en el contenido de proteínas por mg de tejido.

Con respecto a las discrepancias entre la actividad total

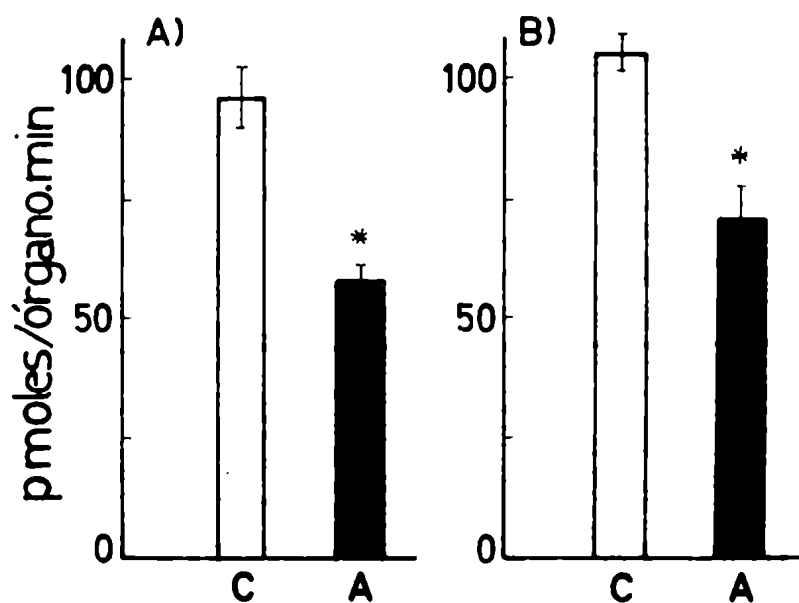


Figura III.4. Actividad de 3 α/β -HDH en la fracción soluble de próstata (panel A) y epidídimo (panel B) de animales control (C) y androgenizados (A). * = $p < 0,05$ comparado con los controles.

y la actividad específica, es necesario considerar que una disminución de la actividad de la 5α -reductasa traería aparejada una reducción en la capacidad estimuladora de la T sobre la síntesis de proteínas. Esta suposición se basa en la comprobación de que la inhibición "in vivo" de la 5α -reductasa produce una disminución considerable del efecto trófico de la T sobre el peso prostático (70). Es factible entonces que una disminución en la actividad de esta enzima se viese enmascarada si los datos se expresan por mg de proteína. Por lo tanto, la expresión de los resultados como actividad total por órgano parece más adecuada para detectar cambios en las actividades enzimáticas.

Receptores para andrógenos en próstata.

La androgenización neonatal no produce cambios apreciables en los receptores citoplasmáticos específicos para andrógenos en próstata, ya sea en los sitios totales de unión o en su grado de ocupación (Tabla III.3).

Alteraciones en hipófisis e hipotálamo.

Como puede observarse en la Figura III.5, la actividad

Tabla III.3. Comparación de los sitios citosólicos de unión para ^3H -R1881 en próstata entre ratas controles y androgenizadas.

	Controles	Androgenizadas
fmoles/mg proteína		
Libres	19,7 \pm 2,1	18,5 \pm 3,5
Totales	40,1 \pm 3,5	41,9 \pm 3,2
fmoles/órgano		
Libres	240 \pm 26	200 \pm 38
Totales	489 \pm 43	453 \pm 36

Las próstatas correspondientes a 5-6 animales adultos de cada grupo fueron reunidas y la fracción soluble correspondiente se procesó por triplicado. Los valores son promedios \pm S.E..

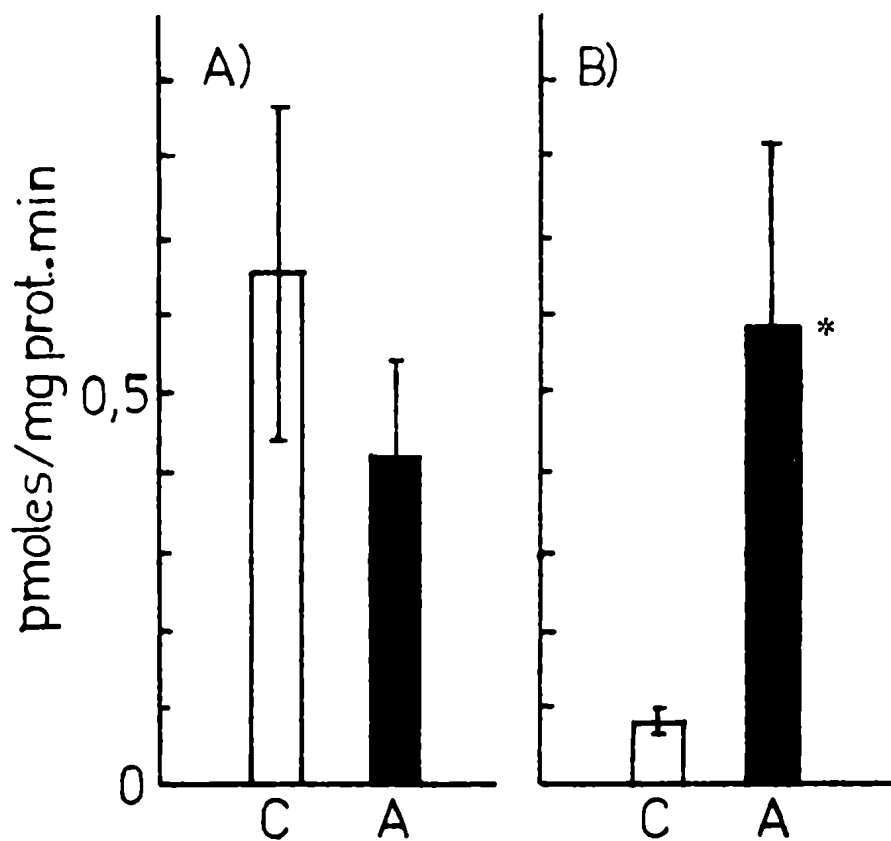


Figura III.5. Actividad de la 5α -reductasa en la fracción microsomal de hipófisis (panel A) e hipotálamo (panel B) de animales control (C) y androgenizados (A). * = $p < 0,05$ comparado con el control.

de la 5α -reductasa en hipófisis de los animales androgenizados no es significativamente distinta de la de los controles. En cambio en hipotálamo, esta actividad se halla notablemente elevada en los animales tratados.

Receptores para andrógenos y para estradiol.

Los estudios de unión de andrógenos en hipófisis e hipotálamo se realizaron usando T- 3 H, basándose en demostraciones previas que indicaban su mayor efectividad para determinar el contenido de receptores en estas estructuras.

Tanto en hipófisis como en hipotálamo de los animales androgenizados se observó una disminución significativa en el número de receptores citoplasmáticos para andrógenos (Tabla III.4). El número de sitios de unión en la fracción nuclear, en cambio no fue significativamente distinto en ambos grupos.

Los receptores citoplasmáticos para estradiol tampoco mostraron alteraciones en los animales tratados neonatalmente con PT. Sin embargo, los receptores nucleares para este esteroide en hipófisis se encuentran marcadamente disminuidos en los animales androgenizados (Tabla III.4). Esta alteración no se ob

Tabla III.4. Receptores para andrógenos y para estradiol en hipófisis e hipotálamo de ratas adultas androgenizadas. (A).

Ligando	Fracción	Hipófisis			Hipotálamo		
		C	A		C	A	
³ H-T	Citosol ^a	7,4 ± 0,8	4,0 ± 0,4 *		5,9 ± 0,6	3,9 ± 0,4 *	
	Núcleos ^a	11,9 ± 3,0	10,3 ± 3,0		8,9 ± 1,0	7,4 ± 0,9	
³ H-Estradiol	Citosol	39,9	49,0	N.S.	14,6	9,48	N.S.
	Núcleos	92,1 ± 6,6	48,9 ± 6,4*		22,6 ± 12,5	23,6 ± 10,3	

a : fmoles/mg de proteína ; * = p < 0,05 comparado con el control; N.S. = no significativo.

serva en hipotálamo.

DISCUSION

Los resultados presentados en esta sección indican que la administración de PT en el segundo día de vida, produce en la rata macho alteraciones importantes en los mecanismos de acción androgénica, tanto a nivel de los órganos sexuales accesorios como de las estructuras nerviosas.

Por otra parte, el menor peso corporal de los animales inmaduros indicaría una disminución de la velocidad de crecimiento corporal que coincidiría con lo previamente demostrado por otros autores (245), en animales tratados neonatalmente con altas dosis de esteroides.

A nivel testicular, la disminución en el contenido de ABP en el epidídimo en las ratas inmaduras, indicaría una alteración en el proceso de secreción de dicha proteína. Dado que la concentración testicular de ABP es normal, la disminución en su contenido epididimario podría ser atribuida, en primera instancia a una disminución en la luz del túbulo seminífero que dificultase el pasaje del fluido testicular hacia el epidídimo. Sin embargo, el estudio

histológico de los testículos de ratas inmaduras no mostró alteraciones apreciables del diámetro tubular ni en la morfología de los distintos tipos celulares (Dr. H.E. Chemes, comunicación personal).

No obstante, considerando que la síntesis de ABP en la rata inmadura es estimulable por FSH (17-20) y que los niveles de esta gonadotropina en los animales androgenizados se encuentran notablemente elevados, sería de esperar que estos animales presentasen niveles comparativamente altos de ABP. El hecho de que el contenido de ABP sea normal (o menor en el caso del epidídimo), indicaría una alteración en la sensibilidad de la célula de Sertoli al estímulo por FSH.

No es posible descartar, por otra parte, que la disminución observada en el contenido de ABP sea debida a una mayor velocidad de degradación en el epidídimo o a una mayor pasaje desde el testículo hacia la circulación periférica, como ha sido demostrado recientemente (251).

Dado que la célula de Sertoli es capaz de aromatizar la T (63) y que esta capacidad es estimulable por FSH (252), se consideró de interés la determinación de los niveles séricos de estra-

diol en los animales androgenizados. Dicho niveles no mostraron alteraciones significativas en los animales tratados, lo que indicaría además que las alteraciones observadas en el tracto reproductivo de los animales androgenizados no serían debidas a un efecto inhibitorio por altas concentraciones de este esteroide (253).

Con respecto a las modificaciones enzimáticas observadas, se ha demostrado que la administración de andrógenos durante el período neonatal produce una disminución en la actividad de varias enzimas testiculares metabolizantes de esteroides tales como la Δ^5 -3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (243) y la 17-oxido-reductasa (254).

En el caso de la adrenal, Goldman y col. (244) han llegado a proponer que los andrógenos podrían ejercer un control inhibitorio sobre la 5 α -reductasa de dos maneras: mediante una inhibición reversible en el adulto y a través de una programación irreversible durante el período neonatal.

En el caso de la próstata y el epidídimo, como se ha visto anteriormente, los andrógenos tienen un efecto estimulador sobre la 5 α -reductasa y sobre las 3 α / β -HDH. Sin embargo, los resultados presentados podrían indicar que estas enzimas se hallan su-

jetas igualmente a una "programación" neonatal por andrógenos.

Dado que el contenido del receptor para andrógenos no parece estar alterado en los animales androgenizados, la disminución del peso de los órganos sexuales accesorios, observada en estos animales, sería debida a la menor conversión de la T en sus metabolitos 5α -reducidos, con la consiguiente disminución de su capacidad estimuladora.

Las alteraciones enzimáticas demostradas, no permiten explicar si embargo el aumento en los niveles séricos de 3α -diol detectado en los animales adultos androgenizados neonatalmente. Dado que la contribución de la metabolización en los tejidos efectores es mínima, comparada con la de otros compartimentos tales como el hígado y el riñón, el aumento observado en las concentraciones del 3α -diol podría ser debido al aumento en la actividad de la 3α -HDH en este último órgano, como ha sido demostrado por Ghraf y col. (242).

Es interesante notar que el efecto inhibitorio de la inyección neonatal de PT, se opondría a las demostraciones previas, que indican que la administración de T a ratas castrada neonatalmente, aumenta la sensibilidad de los órganos sexuales accesorios

hacia los andrógenos, en el animal adulto (248-250).

Esta discrepancia podría deberse tanto a las diferencias en el medio hormonal entre los animales intactos y los castrados, como a las dosis más altas de T usadas en este caso. Esta última su posición se basaría en el hecho de que la administración de dosis más bajas de PT (250 ug) a ratas intactas, no produce alteraciones en el peso de testículo ni en el de los órganos sexuales accesorios en el animal adulto (255).

Estos resultados, conjuntamente con las alteraciones demostradas en la presente sección permiten postular que la "programación" normal de los tejidos efectores requiere niveles fisiológicos de andrógenos durante el período neonatal, mientras que la administración de dosis farmacológicas de T puede causar alteraciones irreversibles en este delicado mecanismo.

Por otra parte, las alteraciones demostradas en las estructuras nerviosas, podrían contribuir a explicar la secreción anormal de gonadotrofinas observada en los animales androgenizados.

Según el modelo actualmente aceptado para la regulación de la secreción de gonadotrofinas (256), la secreción de LH y FSH en hipófisis se produciría bajo el estímulo positivo de un único fac-

tor único de liberación hipotalámico, el LH-RH. Existen no obstante evidencias que indican una disociación en el mecanismo de control de ambas gonadotrofinas, atribuible a las diferencias en el efecto de los esteroides gonadales.

Experiencias "in vivo" han demostrado que el orden de efectividad para suprimir la secreción de LH en ratas castradas es: 3α -diol > DHT > T (257). Para la supresión de FSH, en cambio, se verifica el orden inverso y, a diferencia de lo observado con la LH, ni aún las dosis más altas de andrógenos consiguen reducir los valores séricos hasta el nivel de los animales intactos (257).

En cuanto al sitio de acción, implantes locales de andrógenos permitieron comprobar que éstos pueden actuar tanto sobre la hipófisis como sobre el hipotálamo. No obstante, en ambos casos el efecto producido es inhibitorio sobre la secreción de LH pero estimulador sobre la de FSH (257). Este efecto es particularmente evidente para la DHT, y ha sido corroborado en experiencias "in vitro" (258,259) y puede aún ser evidente "in vivo" en determinadas condiciones (259,260).

Por otra parte, el estradiol y los andrógenos aromatizables resultan comparativamente mucho más eficaces que los 5α -

reducidos para inhibir la secreción de FSH (261). Este hecho, conjuntamente con la presencia en el hipotálamo de enzimas capaces de aromatizar la T, demostrada por Naftolin (262), indican que, similarmente a lo postulado por este autor para ciertas acciones a nivel cerebral (263), el efecto inhibitorio de la T sobre la secreción de FSH podría verificarse a través de su conversión local a estradiol (264).

El efecto inhibitorio sobre la secreción de LH se produciría, sin embargo, a través del mecanismo clásico de acción, mediante la 5α -reducción de la T (257). La coexistencia de ambos mecanismos se apoyaría además en la existencia en el hipotálamo de receptores específicos tanto para DHT (265,266) como para estradiol (266,267).

Se ha comprobado además que en ratas machos castradas, la cantidad de estradiol-³H unido al receptor en hipotálamo disminuye por tratamiento con T pero no con DHT (264). Este último resultado se explicaría por la incapacidad de la DHT de ser aromatizada y por lo tanto de producir un aumento local de estradiol que pudiese desplazar al esteroide radiactivo (264).

Basándose en estos hechos, es posible suponer que el au-

mento detectado en la 5α -reducción de la T en el hipotálamo, limite su capacidad para ser aromatizada y por ende para suprimir la secreción de FSH a través de su conversión a estradiol. Esto explicaría los mayores niveles de FSH en los animales androgenizados.

No obstante, dado que este aumento de la 5α -reducción no se halló asociado a cambios evidentes en el receptor citoplasmático para estradiol, el efecto sobre los niveles de FSH parecería ser más bien debido a una acción estimulatoria directa de la DHT en el hipotálamo. Esta última posibilidad sería coherente con la disminución en los sitios libres de unión para andrógenos en el hipotálamo.

Es importante considerar, además, que la relación causal entre el aumento de la 5α -reducción y el de los niveles de FSH podría ser igualmente la inversa, ya que se ha comprobado que la administración de FSH produce un aumento significativo en la actividad de la 5α -reductasa en estructuras nerviosas (268).

Sin embargo, dado que la alteración de las enzimas metabolizantes de andrógenos parece ser un fenómeno generalizado en los animales androgenizados, parece probable que la falla pri-

maria se produzca a nivel de la 5α -reductasa hipotalámica.

Por otra parte, el aumento detectado en los niveles de 3α -diol circulante podría contribuir a explicar no sólo los mayores niveles de FSH sino también el hecho de que los animales androgenizados presenten una menor respuesta a la liberación de LH ante el estímulo con LH-RH (Dr. J. A. Moguilevsky, comunicación personal).

Con respecto a las alteraciones observadas en los receptores nucleares para esteroides en estructuras nerviosas, su interpretación es dificultosa, dado que su papel dentro del mecanismo de acción no está claramente definido. No obstante, el estudio de sus variaciones en distintas condiciones fisiológicas, tales como las que se han presentado en esta sección y las precedentes, puede resultar de utilidad para la futura interpretación de su significado biológico.

IV. MECANISMOS INTRACELULARES DE REGULACION

En las secciones precedentes se han considerado al receptor, a la 5α -reductasa y a las 3α - y 3β -HDH como entidades distintas. Esta suposición se fundamenta en la demostración realizada por Mainwaring (269) de las diferencias existentes entre el receptor citoplasmático y la 5α -reductasa y en la separación parcial efectuada por Unjhem (270) del receptor y la actividad de la 3α -HDH soluble. Ciertos hechos sugieren, sin embargo, que tanto el receptor como las enzimas metabolizantes de andrógenos no actúan en forma independiente, sino que están sujetos a estrechas interrelaciones, posibilitando la existencia de complejos mecanismos de regulación intracelular.

Nozu y Tamaoki (271), analizando el efecto de las distintas fracciones subcelulares sobre la 5α -reductasa microsomal, observaron que ésta era inhibida por agregado de una fracción soluble que contiene tanto al receptor como a la 3α -HDH. Estos autores (272), demostraron también que por incubación del complejo receptor-DHT- ^3H con una preparación de la 3α -HDH se produce una rápida conversión de la DHT unida a 3α -diol, con la consiguiente disociación del complejo hormona-receptor.

Por otra parte, Taurog, Moore y Wilson (43), llamaron la atención sobre el hecho de que la actividad de la 3α -HDH en próstata es aproximadamente diez veces mayor que la de la 5α -reductasa, lo que implicaría que prácticamente toda la DHT formada tendría que ser convertida a 3α -diol. Para posibilitar la acumulación de la DHT observada "in vivo", debe existir entonces algún mecanismo de control sobre la velocidad de 3α -reducción. Estos autores proponen una serie de factores que podrían regular la actividad de la 3α -HDH, tales como el contenido endógeno de cofactores, la unión de DHT a proteínas o la existencia de algún efector que module a dicha enzima.

Las posibilidades de regulación no se limitarían sólo a la interacción entre macromoléculas.

Charreau y Salmoral (273), demostraron que los fosfolípidos son esenciales para la actividad de la 5α -reductasa.

La actividad de esta enzima, en próstata y epidídimo de rata, es inhibible por cationes de metales pesados, tales como el Zn^{2+} en concentraciones del orden de 10^{-5} M (274,50). En próstata humana sin embargo, se ha demostrado que bajas concentraciones de Zn^{2+} ($5 \cdot 10^{-7}$ M) tienen un efecto estimulador sobre la 5α -

reducción en la fracción nuclear (275).

Por otra parte, el Zn^{2+} produce cambios en la constante de sedimentación del complejo receptor-DHT, sin afectar la cantidad de esteroide unido (97).

Los efectos del Zn^{2+} resultan de particular interés dadas las altas concentraciones de este catión en el tracto reproductivo masculino y su regulación por andrógenos (276). Más aún, en el caso de la próstata de rata se ha demostrado que la PRL, por sí misma, es capaz de regular el contenido de Zn^{2+} (151) y que éste disminuye significativamente por tratamiento con bromocriptina (184). Estos resultados brindan una atrayente posibilidad para el mecanismo de interacción entre la PRL y los andrógenos tratada en la primera sección.

Experiencias preliminares realizadas en el laboratorio habían indicado que el agregado de albúmina sérica bovina (BSA) al medio de incubación producía un incremento considerable en la actividad de la 5α -reductasa. En la presente sección se presentarán los resultados obtenidos en las experiencias tendientes a caracterizar este efecto, y se compararán con el producido por una fracción parcialmente purificada del receptor citoplasmático pa-

ra andrógenos.

RESULTADOS

En la Tabla IV.1 se muestran los resultados obtenidos al agregar BSA en una concentración de 2 mg/ml a las fracciones nuclear y microsomal. En ambas fracciones se observa un incremento de la actividad de la 5α -reductasa. La relación 3α - β -diol/DHT sin embargo no se ve alterada por el agregado de la BSA lo que indicaría que el efecto estaría localizado fundamentalmente a nivel de la 5α -reductasa.

Para tratar de comprobar si este efecto estimulador era privativo de la BSA o era simplemente debido a una protección de la acción de proteasas, se ensayó el agregado de otras proteínas al medio de incubación.

Como puede observarse en la Tabla IV.2 ninguna de las proteínas ensayadas, fuera de la BSA produjo un cambio apreciable en la actividad de la 5α -reductasa en la fracción microsomal.

Se procedió entonces a determinar la concentración óptima de BSA para lograr la máxima activación. La Figura IV.1 muestra el efecto del agregado de cantidades crecientes de BSA

Tabla IV.1. Efecto del agregado de BSA al medio de incubación sobre la actividad de la 5 α -reductasa (en pmoles/mg proteína. h).

	BSA	
	-	2 mg/ml
Núcleos		
DHT	19,25	26,98
3 α -diol	3,98	5,35
Total	23,24	32,33
Microsomas		
DHT	22,00	32,71
3 α -diol	6,69	9,70
Total	28,69	42,41

Tabla IV.2. Efecto del agregado de distintas proteínas al medio de incubación sobre la actividad de la 5α -reductasa en la fracción microsomal.

Proteína ^a	pmoles/mg prot. . h
Control	28,3
BSA	57,5
Gamma globulina humana	32,9
Mioglobina	27,5
Ovoalbúmina	31,6
Quimotripsinógeno	29,0
Apoferritina	31,3

a : la concentración fue en todos los casos de 3 mg/ml.

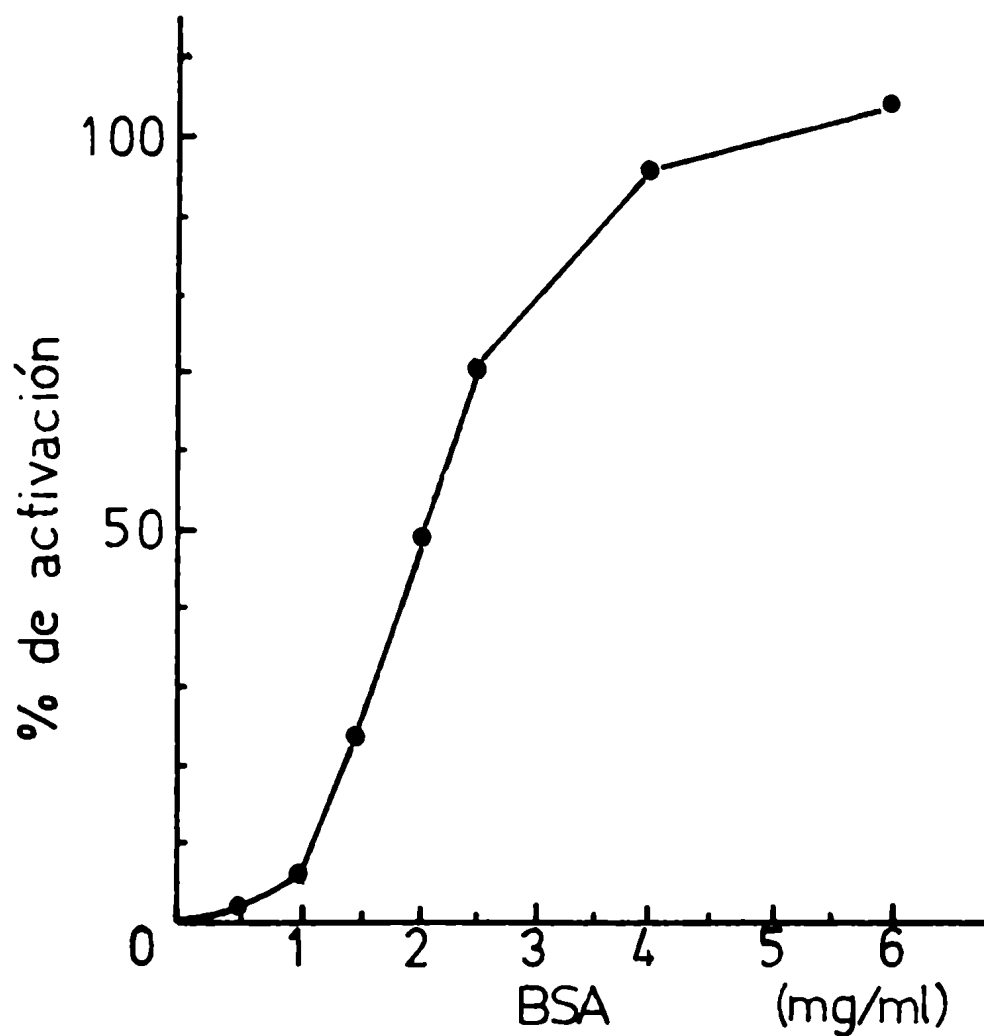


Figura IV.1. Efecto del agregado de cantidades crecientes de BSA al medio de incubación sobre la actividad de la 5α -reductasa microsomal de próstata de rata.

al medio de incubación. El porcentaje de activación aumenta progresivamente hasta alcanzar un máximo para una concentración de BSA entre 5 y 6 mg/ml. Esta última concentración fue usada en los ensayos posteriores.

Para tratar de dilucidar el mecanismo responsable de esta activación se estudió el efecto del agregado de BSA sobre los parámetros cinéticos de la enzima. Los resultados obtenidos se hallan representados en la Figura IV.2. En presencia de BSA se produce un incremento de la velocidad máxima de 1,2 a 2,2 pmol/mg.min. El valor de K_m hallado, $0,9 \cdot 10^{-7} M$, coincide con el determinado por Sandberg (237) en condiciones similares. Este valor no se modifica apreciablemente por agregado de BSA.

Por otra parte, el agregado de la fracción del citosol que precipita en el rango del 0-35% de saturación de sulfato de amonio, en la que se halla presente el receptor para andrógenos, aumenta notablemente la actividad de la 5α -reductasa en la fracción microsomal (Tabla IV.3). Sin embargo, a diferencia de lo observado en el caso de la BSA, en este caso se produce un incremento de la relación $3\alpha + 3\beta$ -diol/DHT, probablemente debido a la presencia de la 3α -HDH en la fracción ensayada.

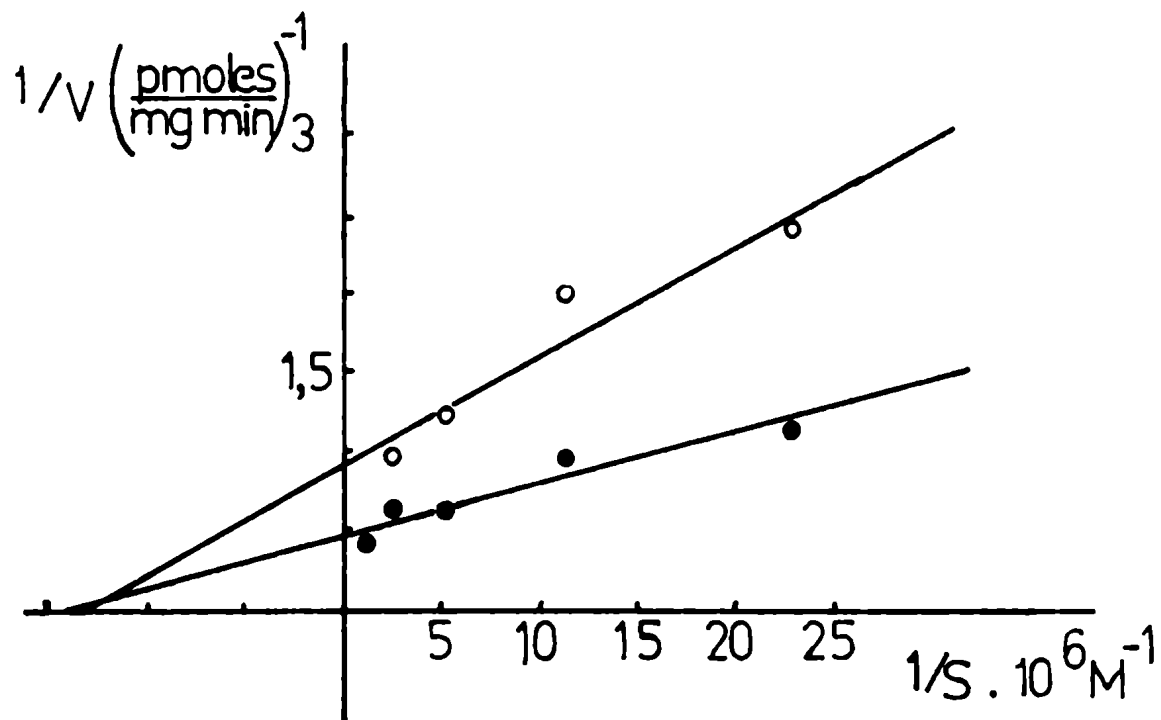


Figura IV.2. Efecto del agregado de BSA sobre los parámetros cinéticos de la 5α -reductasa en la fracción microsomal de próstata de rata. o : Controles
● : BSA 6 mg/ml.

Tabla IV.3. Efecto del agregado de la fracción citoplasmática que contiene al receptor (R) sobre la actividad de la 5 α -reductasa en la fracción microsomal de próstata de rata.

	-	R
Actividad total (pmoles/mg . h)	6,7 \pm 2,7	16,6 \pm 2,6
Relación 3 α -diol/ DHT	0,23	1,13

DISCUSION

Los resultados presentados indican que de las proteínas ensayadas la albúmina es la única que posee la propiedad de incrementar la actividad de la 5α -reductasa "in vitro".

Este hallazgo coincidiría con lo comunicado por Vreeburg y Scholte (277), quienes encuentran que la adición de BSA (10 mg/ml) al medio de incubación, aumenta en un 100% la actividad de la 5α -reductasa en homogenato de epidídimo, efecto que no se verifica por agregado de ovoalbúmina.

Es interesante notar que una de las propiedades que diferencian a la BSA del resto de las proteínas utilizadas es su capacidad de unir esteroides. La afinidad por los distintos esteroides varía además según la estructura de los mismos, hecho que ha sido exhaustivamente estudiado por Stoppani y col. (278).

La albúmina es por otra parte, la principal proteína transportadora de esteroides sexuales en la rata (10), habiéndose demostrado además que el 3α -diol se une en mayor proporción que la DHT (11).

Estas características podrían explicar la peculiaridad

de su acción sobre la 5α -reductasa. No obstante, el mecanismo por el cual produce esta activación resulta difícil de dilucidar.

Las variaciones observadas en los parámetros cinéticos de la enzima son similares a las esperadas en el caso de la remoción de un inhibidor no competitivo, aumentando la concentración de enzima disponible para el sustrato, sin alterar su afinidad. El mismo resultado se obtendría como consecuencia de una protección de la acción de proteasas, no obstante, esta posibilidad ha sido descartada dada la ineficacia de otras proteínas para reproducir este efecto.

Por otra parte, otro componente capaz de unir esteroides, la fracción citoplasmática que contiene al receptor para andrógenos, produjo igualmente un aumento considerable de la 5α -reductasa en la fracción microsomal.

Este efecto estimulador se contrapone con la inhibición de la enzima encontrada por Nozu y Tamaoki (271) en condiciones similares. Esta discrepancia podría ser debida parcialmente a la mayor proporción de proteínas de la fracción soluble con respecto a la microsomal usada por estos autores (6 veces mayor que en el presente trabajo).

Nozu y Tamaoki atribuyen el efecto inhibitorio del receptor al posible secuestro del sustrato. Esta hipótesis, sin embargo, no resulta sostenible considerando nuestro conocimiento actual de la capacidad de unión de andrógenos de la fracción citoplasmática, ya que en las condiciones por ellos usadas, sólo un ínfimo porcentaje (menor que el 0,5 %) de la cantidad total de sustrato podría estar unida al receptor.

Una complicación adicional para la interpretación de estos resultados, surge de la presencia de la 3α -HDH en la fracción citoplasmática usada que conduce, coincidentemente con lo hallado por los autores mencionados, a una mayor proporción de 3α -diol en los productos de reacción. Por lo tanto, la naturaleza de este fenómeno no parece ser posible de dilucidar hasta tanto no se cuente con una preparación suficientemente pura del receptor.

De todos modos , todo parece indicar que proteínas con capacidad de unir esteroides (ya sea la BSA, el receptor o la 3α -HDH), podrían ejercer un efecto regulatorio sobre la actividad de la 5α -reductasa.

En el caso del receptor, su interacción con la 5α -reductasa podría constituir un posible mecanismo para la formación del

complejo con la DHT aún en presencia de la 3α -HDH. Esta hipótesis ya había sido parcialmente considerada por Liao, basándose en experiencias que demostraban la posibilidad de aislar, de las membranas microsomales, una proteína con características similares a las del receptor (279,280).

Los resultados presentados en esta sección, si bien preliminares, sugieren la necesidad de reconsiderar el esquema de regulación de la acción androgénica, contemplando la posibilidad de complejos mecanismos de regulación intracelular.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo, ponen de manifiesto la extraordinaria complejidad de los mecanismos involucrados en el control de la acción androgénica y su estrecha dependencia con el estado fisiológico del individuo. Estas características dificultan notablemente el establecimiento de relaciones causales entre las alteraciones observadas en cada uno de los modelos experimentales. Más aún, la existencia de una verdadera red de interrelaciones entre los distintos parámetros, permite suponer que las modificaciones efectuadas sobre las concentraciones hormonales, no se transmiten en forma unívoca, sino que inducen modificaciones simultáneas en los distintos niveles, produciendo en unos casos un efecto compensatorio y en otros una ampliación del estímulo original.

No obstante, basándose en los datos obtenidos es posible extraer ciertas conclusiones que se enumeran a continuación:

- 1) El tratamiento con prolactina ovina (PRL_o) de los animales inmaduros, produce un aumento significativo en el peso del testículo y órganos sexuales accesorios. Por el contrario,

el peso de dichos órganos se reduce cuando se suprime la secreción hipofisaria de PRL mediante el tratamiento con el agonista dopaminérgico bromocriptina.

2) La administración de PRL aumenta los niveles séricos de 5α -androstano $3\alpha,17\beta$ -diol (3α -diol) sin modificar los de testosterona (T) más 5α -androstano 17β ol 3 ona (DHT). La hiperprolactinemia moderada inducida por sulpirida (antagonista de la dopamina) produce igualmente un aumento en el 3α -diol circulante, aunque asociado en este caso a un incremento de T+DHT. En forma inversa, los niveles de andrógenos disminuyen notablemente en los animales tratados con bromocriptina. Estos resultados indican que las variaciones en el peso de órganos sexuales accesorios podrían estar mediadas en parte por cambios de los niveles séricos de andrógenos.

3) La PRL podría incentivar la esteroideogénesis en las células de Leydig no sólo a través de un aumento en su sensibilidad al estímulo por LH, sino también aumentando los niveles circulantes de esta última gonadotropina. Este efecto es evidente cuando se administra PRL exógena y parecería ser revertido a altas concentraciones de esta hormona.

4) A nivel de los tejidos efectores de andrógenos, la PRL_o es capaz de modificar la concentración total de receptores citoplasmáticos para andrógenos (en próstata) y del grado de ocupación de los mismos.

5) La administración de PRL exógena produce un aumento de la actividad total de la Δ^4 -3-cetoesteroide, 5 α -reductasa (5 α -reductasa) en próstata. Este efecto no se verifica en epidídimo ni en túbulo seminífero (TS). No obstante la supresión de la PRL endógena mediante el tratamiento con bromocriptina, disminuye significativamente dicha actividad tanto en próstata como en TS. Esto indicaría el requerimiento de niveles fisiológicos de PRL para una actividad normal de la enzima en los tejidos efectores de andrógenos.

6) Los agentes dopaminérgicos tales como la bromocriptina, la sulpirida y la pimocida, a pesar de sus efectos disímiles sobre los niveles de PRL endógena, inducen aumentos semejantes en la actividad de la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 α -HDH). Esto sugiere que los efectos observados con estas drogas podrían deberse a una acción directa de las mismas sobre los tejidos andrógeno dependientes.

7) En el caso de la pimocida, se ha comprobado además que si bien esta droga se comporta como antagonista de la dopamina, en altas dosis es capaz de producir un descenso significativo en los valores séricos de la PRL.

8) La disminución del peso de testículo y epidídimo observada en los animales diabéticos, sería debida fundamentalmente al descenso en los niveles de andrógenos circulantes ya que esta alteración es revertida por tratamiento con propionato de testosterona (PT). El peso de próstata sin embargo sólo se normaliza por la administración conjunta de PT e insulina.

9) El tratamiento con PT de los animales diabéticos produce un aumento del tipo dosis-respuesta en el contenido epididimario de la proteína transportadora de andrógenos (ABP), alcanzando valores normales. Este resultado indica que la síntesis de esta proteína no tiene un requerimiento estricto de insulina.

10) En las ratas diabéticas se observa una hiperrespuesta en la producción de ABP ante el estímulo por FSH, que es atribuible ya sea a un retraso en el proceso de maduración o a una mayor proporción de células de Sertoli en el testículo de estos animales. Este resultado, conjuntamente con el anterior, permiten concluir

que la disminución en el contenido epididimario de ABP que se produce en los animales diabéticos, es debida fundamentalmente al descenso observado en los niveles de T circulante.

11) La actividad total de la 5α -reductasa se halló disminuída tanto en la próstata como en el epidídimo de los animales diabéticos. En este último, la actividad de la enzima se normaliza completamente por tratamiento con PT, mientras que en la próstata la T "per se" resulta insuficiente para el completo restablecimiento de la enzima, que se logra solamente en presencia de insulina.

12) La diabetes por estreptozotocina produce igualmente una disminución de la actividad de la 3α -HDH prostática, tanto en la fracción microsomal como en la soluble. La 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3α -HDH) se encuentra también disminuída en la fracción soluble, pero su actividad se halla anormalmente elevada en la fracción microsomal. Esta disparidad de comportamiento, apoyaría la hipótesis de la existencia de isoenzimas en ambos compartimentos subcelulares.

13) El contenido total del receptor citoplasmático para andrógenos, medido en condiciones de intercambio, es sensiblemente menor en los animales diabéticos. Este resultado confirma el obtenido anteriormente mediante técnicas semicuantitativas. Por otra

parte, se ha establecido que la disminución de receptores es observable igualmente en el núcleo, y que en ambos casos las alteraciones son revertidas tanto por tratamiento con PT como con insulina.

14) Las alteraciones observadas en la próstata de los animales diabéticos y la ineficacia de la T "per se" para normalizar algunos de los parámetros, podrían ser parcialmente debidas al menor contenido de receptores para PRL en dicho órgano y al requerimiento estricto de insulina para la completa restauración de los mismos.

15) A nivel central, la diabetes por estreptozotocina produce una disminución de la actividad de la 5 α -reductasa hipofisaria y una reducción concomitante en el contenido de receptores para andrógenos tanto en hipófisis como en hipotálamo. Estas alteraciones podrían ser responsables de las modificaciones observadas en estos animales en los mecanismos de retroalimentación por andrógenos de la secreción de gonadotrofinas.

16) La administración de PT en el período neonatal produce, en el animal adulto, una atrofia parcial del testículo y de los órganos sexuales accesorios, sin que se modifiquen apreciablemente los niveles de T circulante. La menor actividad total de la 5 α -

reductasa y de la 3α -HDH, detectada en próstata y epidídimo, y la falta de alteraciones en el receptor citoplasmático para andrógenos en próstata, permiten suponer que la disminución en el peso de órganos es debida a una menor conversión periférica de la T en sus metabolitos activos. Este resultado indicaría además que estas actividades enzimáticas podrían estar también sujetas a un proceso de "programación" neonatal por andrógenos.

17) A pesar de los niveles comparativamente altos de FSH demostrado por otros autores en los animales androgenizados, estos animales presentan, en el período prepuberal, un contenido de ABP normal en testículo y significativamente menor en epidídimo. Esta alteración, es aparentemente revertida al alcanzar la madurez, y podría indicar una menor capacidad de la célula de Sertoli para responder al estímulo por FSH.

18) La androgenización neonatal produce también un aumento de la actividad de la 5α -reductasa en hipotálamo, mientras que no altera dicha actividad en hipófisis. El efecto de la androgenización neonatal se observa también sobre los receptores para andrógenos y para estradiol, aunque el sentido y la magnitud de las alteraciones difieren en ambos tejidos. Estos resultados sugieren

que la conocida acción "masculinizante" de los andrógenos neonatales sobre el proceso de diferenciación hipotalámica, podría verificarse a nivel de los mecanismos de retroalimentación por esteroides, la alteración de estos mecanismos por la administración de dosis farmacológicas de T, podría ser una posible causa para la anormal secreción de gonadotrofinas que se observa en los animales androgenizados.

19) Con respecto a otros posibles mecanismos intracelulares de control de la acción androgénica, se ha determinado que la actividad de la 5α -reductasa de próstata puede ser modulada por la interacción con determinadas proteínas tal como lo sugiere la estimulación de esta enzima por el agregado de albúmina al medio de incubación. Este efecto no fue observado con otras proteínas, y los estudios cinéticos indican que la albúmina actuaría aumentando la cantidad de enzima disponible para el sustrato sin modificar significativamente su afinidad por el mismo.

20) El aumento en la actividad de la 5α -reductasa "in vitro" se produjo también por agregado de la fracción citoplasmática que contiene al receptor para andrógenos, lo que plantea la posibilidad de una interrelación entre ambos.

Más allá de su posible aporte al conocimiento teórico de los mecanismos de regulación de la acción androgénica, algunos de estos resultados podrían ser de utilidad en el esclarecimiento de la etiología de las alteraciones reproductivas asociadas a ciertos estados patológicos.

Así por ejemplo, se ha establecido que la PRL ejerce un profundo efecto sobre el proceso de maduración sexual y que puede actuar a tres niveles distintos : controlando la secreción de LH, actuando sinérgicamente con esta hormona en la estimulación de la síntesis de andrógenos y modulando la acción de la T en los tejidos efectores. Este efecto trófico de la PRL indicaría que el hipogonadismo asociado a la hiperprolactinemia en el hombre, no sería debido a una acción antigonadotrófica de la PRL "per se" , sino más bien a la supresión de la secreción de LH producida por altas concentraciones de esta hormona.

Por otra parte, el efecto estimulador de los agentes dopaminérgicos sobre la 3α -HDH, además de constituir la primera demostración de un factor regulador para dicha actividad fuera de los andrógenos, plantea la interesante posibilidad de un control nervioso del mecanismo de acción androgénica.

Los efectos inhibitorios de la bromocriptina sobre los niveles de andrógenos y sobre la actividad de la 5 α -reductasa, podrían explicar además el hecho de que esta droga resulte ineficaz para restablecer la función reproductiva en ciertos pacientes hiperprolactinémicos.

Es interesante notar, por otra parte, que la sulpirida es usada corrientemente como antipsicótico y que otras drogas tales como la cimetidina, administrada para el tratamiento de trastornos gástricos, y antihipertensivos como la reserpina, son capaces de inducir aumentos significativos en los niveles séricos de PRL. En todos estos casos se han descrito alteraciones reproductivas asociadas al tratamiento prolongado que son generalmente atribuidas a la discreta hiperprolactinemia. No obstante, basándose en los resultados presentados en este trabajo, sería necesario considerar un posible efecto de estas drogas sobre los tejidos efectores de andrógenos.

En cuanto a las alteraciones observadas en las ratas diabéticas por estreptozotocina, ya se ha discutido la similitud existente entre los trastornos reproductivos demostrados en estos animales y los que acompañan al estado diabético en la especie huma-

na. La elección de dicho modelo parece entonces adecuada para el estudio de las posibles causas de las alteraciones en la esfera sexual en pacientes diabéticos.

Los resultados obtenidos demuestran la importancia crítica de la insulina en el mecanismo de acción androgénica. El requerimiento de insulina se manifiesta no sólo a nivel de la célula de Leydig para la síntesis de andrógenos, sino también a nivel de determinados tejidos efectores, tales como la próstata, para la completa expresión del efecto trófico de la T.

Sin embargo, se ha visto también que, en el caso de las células de Sertoli y en el del epidídimo, los andrógenos constituyen el estímulo primordial, siendo las alteraciones observadas en las ratas diabéticas sólo una consecuencia indirecta de la falta de insulina, producidas a través del descenso en la producción de T.

La posible correlación clínica de las alteraciones demostradas en los animales androgenizados resulta más difícil de establecer, ya que si bien se reconoce la importancia fundamental de los andrógenos durante el período perinatal para el proceso de diferenciación sexual, no se han comunicado hasta el momento patologías asimilables a la observada en estos animales. No obstan-

te, pueden resultar de interés las observaciones preliminares efectuadas por Gorski (281) en cuanto a las alteraciones en la conducta de niños cuyas madres fueron tratadas con dietilbestrol durante el embarazo.

Resulta evidente que ninguno de los temas tratados en este trabajo ha quedado completamente agotado sino que por el contrario en cada caso se plantea una multitud de nuevos interrogantes y es probable que muchos de los conceptos vertidos necesiten ser reconsiderados a la luz de futuras investigaciones.

Más importante que el comprender los fenómenos vitales es que la razón esté puesta al servicio de la Vida.

REFERENCIAS

- 1 . - Berthold, A.A. - Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med. 16:42 (1849).
- 2 . - Leydig, F. - Z. Wiss. Zool. 2:1 (1850).
- 3 . - David, K, Dingemanse, E, Freud, J y Laqueur, E.-Z. Physiol. Chem. 233:281 (1935).
- 4 . - Mainwaring, W.I.P. - The Mechanism of Action of Androgens (F. Gross, M.M. Grumbach, A. Labhart, M.B. Lipsett, T. Mann, L.T. Samuels, J. Zander; Eds) Springer-Verlag, N. Y., 1977.
- 5 . - Johnson, B.H. y Ewing, L.L. - Science 73:635 (1971).
- 6 . - Odell, W.D., Swerdloff, R.S., Jacobs, M.S. y Hescox, M. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 61:529 (1968).
- 7 . - Odell, W.D. y Swerdloff, R.S. - Recent Progress in Horm. Res. Vol 32, 1976, p 245.
- 8 . - Bardin, C.W., Allison, J.E., Stanley, A.J. y Grumbreck, L.G. - Endocrinology 84:435 (1969).
- 9 . - Rivarola, M.A., Forest, M.G. y Migeon, C.J. - J. Clin. Endocrinol Metab. 28:34 (1968).
- 10 . - Corvol, P y Bardin, C.W. - Biol. Reprod. 8:277 (1973).
- 11 . - Clark, A.F., Calandra, R.S. y Bird, C.E. - Clin. Biochem. 4:89 (1971).
- 12 . - Purvis, K. y Diczfalusy, E. - En: Sperm Action, Fifth International Seminar on Reproductive Physiology and Sexual Endocrinology, (P.O. Hubinont; Ed.) A. Karger, Basel, 1976, p. 89.

13. - Setchell, B.P. y Waites, M.H. - En: Handbook of Physiology, Sect.V, Male Reproductive System, (R. O. Greep y D. W. Hamilton; Eds), Waverly Press, Baltimore, 1975, p.143.
14. - Setchell, B.P. y Main, S. J. -En: Hormonal Regulation of Spermatogenesis, (F. S. French, V. Hansson, E. M. Ritzen y S. N. Nayfeh; Eds), Plenum Press, N. Y., 1975, p. 223.
15. - Hansson, V., Ritzen, E. M., French, F. S. y Nayfeh, S. N. - En: Handbook of Physiology, Sect. V, Male Reproductive System, (R. O. Greep y D. W. Hamilton, Eds), Waverly Press, Baltimore, 1975, p.173.
16. - Weddington, S. C., Brandtzaeg, P., Hansson, V., French, F. S., Petrusz, P., Nayfeh, S. N. y Ritzen, E. M. -Nature, Lond. 258:257 (1975).
17. - Hansson, V., Reusch, E., Trygstad, O., Torgersen, O., Ritzen, E. M. y French, F. S. - Nature (New Biol.) 246:56 (1973).
18. - Vernon, R. G., Kopec, B. y Fritz, I. B. - Mol. Cell. Endocr. 1:167 (1974).
19. - Means, A. R., Fakunding, J. L, Huckins, C., Tindall, D. J. y Vitale, R. - Rec. Prog. Horm. Res. 32:477 (1976).
20. - Sanborn, B. M., Elkington, J. S. H., Chowdhury, M., Tcholakian, R. K. y Steinberger, E. - Endocrinology 96:304 (1975).
21. - Elkington, J. S. H., Sanborn, B. M., Martin, A. K., Chowdhury, M. y Steinberger, E. - Mol. Cell. Endocr. 6:203 (1977).
22. - Weddington, S. C., Hansson, V., Ritzen, E. M., Hagenas, H., French, F. S. y Nayfeh, S. N. - Nature 254:145 (1975).
23. - Louis, B. G. y Fritz, J. B. - Mol. Cell. Endocr. 7:9 (1977).
24. - Weddington, S. C., Hansson, V., Purvis, K., Varaas, T., Verjans, H. L., Eik-Nes, K. B., Ryan, W. H., French, F. S.

- y Ritzen, E. M. - *Mol. Cell. Endocr.* 5:137 (1976).
- 25.- Steimberger, A., Heindel, J. J., Lindsey, J. N., Elkington, J. S. H., Sanborn, B. M. y Steinberger, E. - *Endocr. Res. Commun.* 2:261 (1975).
- 26.- Fritz, I. B., Rommerts, F. G., Louis, B. G. y Dorrington, J. H. - *J. Reprod. Fertil.* 46:17 (1976).
- 27.- Hansson, V., Trygstad, O., French, F. S., Mc. Lean, W. S., Smith, A. A., Tindall, D. J., Weddington, S. C., Petrusz, P., Neyfeh, S. N. y Ritzen, E. M. - *Nature, Lond.* 250:387 (1974).
- 28.- Steinberger, A., Thanki, K. H. y Siegal, B. - En: *Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis*, (M. L. Dufau y A. R. Means; Eds), Plenum Press, N. Y., 1974, p. 177.
- 29.- Fakunding, J. L. y Means, A. R. - *Endocrinology* 101:358 (1977).
- 30.- Steinberger, A. - *Physiol. Rev.* 51:1 (1971).
- 31.- Hansson, V., French, F. S., Weddington, S. C., Nayfeh, S. N. y Ritzen, E. M. En: *Hormonal Binding and Target Cell Activation in the Testis* (M. L. Dufau y A. R. Means; Eds), Plenum Press, N. Y., p. 287 (1974).
- 32.- Hansson, V., Weddington, S. C., Mc Lean, W. S., Smith, A. A., Nayfeh, S. N., French, F. S. y Ritzen, E. M. - *J. Reprod. Fertil.* 44:363 (1975).
- 33.- Tindall, D. J., Mena, C. R. y Means, A. R. - *Endocrinology* 103:589 (1978).
- 34.- Purvis, K., Calandra, R. y Hansson, V. - En: *Androgens and Antiandrogens*, (L. Martini y M. Motta; Eds), Raven Press, N. Y., 1977, p. 37.

- 35.- Kotite, N.J., Nayfeh, S.N. y French, F.S. -Biol. Reprod. 18: 65 (1978).
- 36.- Guerrero, R., Ritzen, E.M., Purvis, K., Hansson, V, y French, F.S. -En: Hormonal Regulation of Spermatogenesis (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh Eds.) Plenum Press, N.Y., 1975, p.213.
- 37.- Bartke, A., Steele, R-E, Musto, N. y Caldwell, B.V. -Endo crinology 92: 1223 (1973).
- 38.- Rommerts, F.F.G., Grootegoed, J.A. y Van der Molen, H. J. -Steroids 28: 43 (1976).
- 39.- Bruchovsky, N. y Wilson, J.D. -J. Biol. Chem. 243: 2012 (1968).
- 40.- Nozu, K. y Tamaoki, B.I. -Biocem. Biophys. Acta 34: 321 (1974).
- 41.- Mirsky, A.E. y Osawa, S. -En: The Cell (A.E. Mirsky y J. Brachet Eds.) Academic Press, N.Y., Vol 2, p.677, 1961.
- 42.- Frederiksen, D.W. y Wilson, J.D. -J. Biol. Chem. 246:2584 (1971).
- 43.- Taurog, J.D., Moore, R.J. y Wilson, J.D. - Biochemistry 14: 810 (1975).
- 44.- Inano, H., Hayashi, S. y Tamaoki, B.I. - J. Steroid Biochem. 8:41 (1977).
- 45.- Van Doorn, E.J., Bird, C.E. y Clark, A.F. -Endocrine Re- search Communications 2: 471 (1975).
- 46.- Levy, C., Marchut, E., Baulieu, E.E. y Robel, P. -Steroids 23: 291 (1974).
- 47.- Clark, A.F., Van Doorn, E.J. y Bird, C.E. -J. Steroid Bio- chem 5: 346 (1974).

- 48.- Gloyna, R.E. y Wilson, J.D. -J. Clinical. Endocr. Metab. 29: 970 (1969).
- 49.- Djoseland, O., Hansson, V. y Haugen, H.N. -Steroids 21: 773 (1973).
- 50.- Monsalve, A. y Blaquier, J.A. -Steroids 30: 41 (1977).
- 51.- Hastings, C.D. y Hansson, V. -International Journal of Andrology 2: 263 (1979).
- 52.- Massa, R., Stupnicka, E., Kniewald, Z. y Martini, L. - J. Steroid Biochem. 3: 385 (1972).
- 53.- Rivarola, M.A., Podestá, E.J., Chemes, H.E. -Endocrinology 91: 537 (1972).
- 54.- Podestá, E.J. y Rivarola, M.A. -Endocrinology 95: 455 (1974).
- 55.- Yamada, M., Yasue, S. y Matsumoto, K. - Acta Endocr. 71: 393 (1972).
- 56.- Yoshizaki, K., Matsumoto, K., Samuels, L.T. -Endocrinology 102: 918 (1978).
- 57.- Van der Molen, H.J., Grootegoed, J.A., de Greef-Bijleveld, M.J., Rommerts, F.F.G. y van der Vusse, G.J. - En: Hormonal Regulation of Spermatogenesis (F.S. French, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh Eds.), Plenum Press, N.Y., 1975, p.3.
- 58.- Rivarola, M.A., Podestá, E.J., Chemes, H.E. y Cigorraga, S. - En: Hormonal Regulation of Spermatogenesis (F.S. French, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh Eds.), Plenum Press, N.Y., 1975, p.25.
- 59.- Peng, W.W., Wisner, J.R. y Warren, D.W. -Steroids 34: 2460 (1979).

- 60.- Moger, W.H. -Endocrinology 100: 1027 (1977).
- 61.- Dorrington, J.H. y Fritz, I.B. -En: Hormonal Regulation of Spermatogenesis (F.S. French, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh Eds.), Plenum Press, N.Y., 1975, p. 37.
- 62.- Dorrington, J.H. , Roller, N.F. y Fritz, I.B. -Mol. Cell. Endocrinol. 3: 57 (1975).
- 63.- Armstrong, D.T. , Moon, Y.S. , Fritz, I.B. y Dorrington, J.H. -En: Hormonal Regulation of Spermatogenesis (F.S. French, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh Eds.), Plenum Press, N. 1975, p. 85.
- 64.- Van Nimmen, D. , Echaute, W. , Lacroix, E. , Demeester, G. y Leusen, I. - J. Steroid Biochem. 10:505 (1979).
- 65.- Inano, H. , Suzuki, K. , Wakabayashi, K. y Tamaoki, B.I. - Endocrinology 97: 22 (1973).
- 66.- Fang, S. y Liao, S. -Mol. Pharmacol 5: 420 (1969).
- 67.- Bruchovsky, N. y Wilson, J.D. - J. Biol. Chem. 243: 5953 (1968).
- 68.- Bartsch, W. , Krieg, M. y Voigt, K.D. -J. Steroid Biochem. 13: 259 (1980).
- 69.- Gloyna, R.E. , Siiteri, P.K. y Wilson, J.D. -Journal of Clinical Investigation 49: 1746 (1970).
- 70.- Kao, L.W.E. y Weisz, J. -J. Endocrinol. 81: 209 (1979).
- 71.- Imperato-McGinley, J. , Guerrero, L. , Gautier, T. y Peterson, R.E. -Science 186: 1213 (1974).
- 72.- Nozu, K. y Tamaoki, B.I. -J. steroid Biochem. 6: 57 (1975).
- 73.- Baulieu, E-E, Lasnitzki, I y Robel, P. - Nature (London), 219: 1155 (1968).

- 74.- Ahmad, N. y Warren, D.W. -International Journal of Andrology Suppl 2,1(1978).
- 75.- Lubicz-Nawrocki, C.M. -J. Endocrinol. 58: 193 (1973).
- 76.- Purvis, K., Calandra, R.S., Hang, E. y Hansson, V. - Cell. Endocr. 7: 203 (1977).
- 77.- Eldridge, J.C. y Mahesh, V.B. -Biol. Reprod. 11: 385 (1974).
- 78.- Krieg, M., Horst, H-J. y Sterba, M.L. - Acta Endocrinol. Suppl. 193: 50 (1975).
- 79.- Lee, D.K.H., Bird, C.E. y Clark, A.F. -J. Steroid Biochem. 5: 609 (1974).
- 80.- de Larminat, M.A., Monsalve, A., Charreau, E.H., Calandra, R.S. y Blaquier, J.A. - J. Endocrinol. 79: 157 (1978).
- 81.- Karr, R.Y., Kirdani, R.Y., Murphy, G.P. y Sandberg. A. A. -Endocrinology 90: 1245 (1972).
- 82.- Oshima, H., Sarada, T., Osahi, K. y Tamaoki, B. -Endocrinology 86: 1215 (1970).
- 83.- Nayfeh, S.N., Coffey, J.C., Hansson. V. y French, F.S. - J. Steroid Biochem. 6: 329 (1975).
- 84.- Colby, H.D., Witorsh, R.J., Coffey, J.L. y Kitay, J.I. - Acta Endocr. 74: 568 (1973).
- 85.- Bonne, C. y Raynaud, J.P. -Biochimie 55: 227 (1973).
- 86.- Robaire, B., Covey, D.F., Robinson, C.H. y Ewing, L.L. - J. Steroid Biochem. 8: 307 (1977).
- 87.- Shimazaki, J., Kato, N., Nagai, H., Yamanaka, H. y Shida, K. -Endocr. Japon. 14: 97 (1972).
- 88.- Pujol, A. y Bayard, F. -Steroids 31: 485 (1978).

- 89.- Djoseland, O. - Steroids 67: 203 (1975).
- 90.- Robaire, B., Erwing, L.L., Zirkin, B.R. e Irby, D.C. - Endocrinology 101: 1379 (1977).
- 91.- Welsh, M.J. y Wiebe, J.P. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 69: 936 (1976).
- 92.- Mainwaring, W.I.P. -J. Endocr. 45: 531 (1969).
- 93.- Baulieu, E.E. y Jung, I. -Biochem. Biophys. Research. Commun. 38: 599 (1970).
- 94.- Mainwaring, W.I.P. e Irwing, R.A. - Biochem. Journal. 134: 113 (1973).
- 95.- Ritzen, E.M., Nayfeh, S.N., French, F.S. y Dobbins, M.C. -Endocrinology 89: 143 (1971).
- 96.- Tymoczko, J.L. y Liao, S. -Biochem. Biophys. Acta 252: 607 (1971).
- 97.- Liang, T., Tymoczko, J.L., Chan, K.M. B., Hung, S.C. y Liao, S. -En : Androgens and Antiandrogens (L. Martini y M. Motta Eds.), Raven Press, N.Y., 1977, p. 77.
- 98.- Blaquier, J.A. -Biochem Biophys. Res. Commun. 45: 1076 (1971).
- 99.- Wilson, E.M. y Smith, A.A. -En : Hormonal Regulation of Spermatogenesis (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh Eds.), Plenum Press, N.Y., 1975, p.281.
- 100- Liao, S., Liang, T., Fang, S., Castañeda, E. y Shao, T.C. -J. Biol. Chem. 248: 6154 (1973).
- 101- Liao, S., Howell, D.K. y Chang, T.M. -Endocrinology 94: 1205 (1974).

- 102- Davies, P. y Griffiths, K. -Biochem. J. 140: 565 (1974).
- 103- Bullock, L.P. y Bardin, C.W. -En : Androgens and Antian-
drogens (L. Martini y M. Motta Eds.), Raven Press, N.Y. ,
1977, p. 91.
- 104- Robel, P. , Blondeau, J.P. , Baulieu, E.E. -Biochem. Bio-
phys. Acta 373: 1 (1974).
- 105- Van Doorn, E. , Craven, S. , Bruchovsky, N. -Biochem. J.
160: 11 (1976).
- 106- Blondeau, J.P. , Corpechot, L. , Le Gascogne, C. , Baulieu,
E.E. y Robel, P. - Vitamines and Hormones 33: 319 (1975).
- 107- Sullivan, J.N. y Strott, C.A. -J. Biol. Chem. 248: 3202 (1973).
- 108- Danzo, B. y Eller, B. -Steroids 25: 507 (1975).
- 109- Tindall, D.J. , Hamsson, V. , Sar, M. , Stumpf, W.E. ,
French, F.S. y Nayfeh, S. -Endocrinology 95: 1119 (1974).
- 110- Calandra, R.S. , Purvis, K. , Attramadal, A. y Hansson, V.
-J. Steroid Biochem. 8: 1205 (1977).
- 111- Podestá, E.J. , Calandra, R.S. , Rivarola, M.A. y Blaquier,
J.A. -Endocrinology 97: 399 (1975).
- 112- Calandra, R.S. , Blaquier, J.A. , Castillo, E.J. del, Riva-
rola, M.A. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 67: 97 (1975).
- 113- Pujol, A. y Bayard, F. -J. Reprod. Fertil. 56: 217 (1979).
- 114- Tezón, J.G. y col. (Manuscrito en preparación).
- 115- Fluckinger, E. y Wagner, H.R. -Experientia 24: 1130 (1968).
- 116- Corvol, P.L. , Chrambach, A. , Rodbard, D. y Bardin, C.
W. -J. Biol. Chem. 246: 3435 (1971).

- 117- Ritzen, E.M. , French, F.S. , Weddington, S.C. , Nayfeh, S. N. y Hansson, V. -J. Biol. Chem. 249: 6597 (1974).
- 118- Davis, B.J. - Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 404 (1964).
- 119- Mendelson, C. , Dufau, M.L. y Catt, K.J. -J. Biol. Chem. 250: 8818 (1975).
- 120- Okita, G. T. - Nucleonics 15: 111 (1957).
- 121- Kousnetzova, B. y Dray, F. - J. Steroid Biochem. 9: 359 (1978).
- 122- Bonne, C y Raynaud, J.P. -Steroids 27: 497 (1976).
- 123- Katzenellenbogen, J.A. , Johnson, H.S. , Carlson, K.E. - Biochemistry 12: 409 (1973).
- 124- Thorell, J.J. y Johansson, B.G. -En : Structure Activity relationships of proteins and Polypeptide Hormones (M. Margolies y F.C. Greenwood Eds.), Excerpta Medica, Amsterdam, 1971.
- 125- Lowry, O.H. , Rosebrough, N.S. , Farr, A.L. y Randall, A. J. -J. Biol. Chem. 193: 265 (1951).
- 126- Burton, K. -Biochem. J. 62: 315 (1956).
- 127- Scatchard, G. -Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660 (1949).
- 128- Li, C.C. - En : Introducción a la estadística experimental, Omega, 1969, p.454.
- 129- Blum, V. -Acta Endocr. Suppl. 193: 149 (1975).
- 130- Hafiez, A.A. , Bartke, A. y Lloyd, C.W. -J. Endocr. 53: 223 (1972).
- 131- Hafiez, A.A. , Lloyd, C.W. y Bartke, A. -J. Endocr. 52: 327 (1972)

- 132- Johnson, D.C. -Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 145: 610 (1974).
- 133- Charreau, E.H. , Attramadal, A. , Torjesen, P.A. , Purvis, K. , Calandra, R.S. y Hansson, V. -Mol. and Cell. Endocr. 6: 303 (1977).
- 134- Grayhack, J. T. , Bunce, P.L. , Kearns, J.W. y Scott, W.W. - Bull. Johns Hopkins Hosp. 96: 154 (1955).
- 135- Negro-Vilar, A. , Saad, W.A. y McCann, S.M. -Endocrinology 100: 729 (1977).
- 136- Hostetter, M.W. y Piacsek, B.E. -Biol. Reprod. 17: 574 (1977).
- 137- Asano, M. , Kanzaki, S. , Sckiguchi, E. y Tasaka, T. -J. Urol. 106: 248 (1971).
- 138- Fang, V.S. , Refetoff, F.S. y Rosenfeld, R.L. -Endocrinology 95: 991 (1974).
- 139- Bartke, A. , Smith, M.S. , Michael, S.D. , Peron, F.G. y Dalterio, S. -Endocrinology 100: 182 (1977).
- 140- Celotti, F. , Massa, R. y Martini, L. -Neuroendocrinology 26:41 (1978).
- 141- Folis, G y Van Vliet, S. -Clinical Research 24: 279 A (1976).
- 142- Thorner, M.O. , Mc Neilly, A.S. , Hagan, L. y Besser, G. M. -Brit. Med. J. 2: 419 (1974).
- 143- Ambrosi, B. , Travaglini, P. , Beck-Peccoz, P. , Bara, R. , Elli, R. , Parracchi, A. y Faglia, G. -J. Clin. Endocrinol. Metab. 43: 700 (1976).
- 144- Magrini, G. , Ebner, J.R. , Burkhalt, D. y Felber , J.P. - J. Clin. Endocrinol. Metab. 43: 944 (1976).

- 145- Rubin, R. T. , Gouin, P. R. , Lubin, A. , Poland, R. E. y Pirke, K. M. -J. Clin. Endocrinol. Metab. 40: 1027 (1975).
- 146- Rubin, R. T. , Poland, R. E. , Tower, B. B. - J. Clin. Endocrinol. Metab. 42: 112 (1976).
- 147- Sheth, A. R. , Mugatwala, P. P. , Shah, G. V. , Rao, S. S. - Fertil. Steril. 27: 1292 (1976).
- 148- Shah, G. V., Desai, R. B. , Sheth, A. R. -Fertil. Steril. 27: 1292 (1976)
- 149- Pechon, N. y Griner, J. -Fertil. Steril. 29: 428 (1978).
- 150- Lasnitzki, I. -En : Prolactin and Carcinogenesis, Fourth Tenovus Workshop, Cardiff (A. R. Boyns y R. Griffiths Eds.), Alpha Omega Alpha, Cardiff, 1972.
- 151- Moger, W. H. y Geschwind, I. I. -Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 141: 1017 (1972).
- 152- Lloyd, J. W. , Thomas, J. A. y Mawhinney, M. G. - Steroids 22: 473 (1973).
- 153- Baker, H. W. G. , Worgul, T. J. , Santen, R. J. , Jefferson, L. S. y Bardin, C. W. -En: The testis in normal and infertile men, (P. Troen y H. R. Nankin Eds.), Raven Press, N. Y. , p. 379.
- 154- Morris, P. L. , Saxena, B. B. , Peterson, R. E. -En : The Endocrine Society, 62nd Annual Meeting, 1980, Libro de resúmenes Abst, 712, p. 252.
- 155- Mawinney, M. G. , Belis, J. A. , Thomas, J. A. y Lloyd, J. W. - J. Pharmacol. exp. Ther. 192: 242 (1975).
- 156- Yamanaka, H. , Kirdani, R. Y. , Saroff, J. , Murphy, G. P. y Sandberg, A. A. - Am. J. of Physiol. 229: 1102 (1975).
- 157- Shain, S. A. , Boesel, R. N. , Lamm, P. L. y Radwin, H. M. - Steroids 31: 541 (1978).

- 158- Wilson, E.M. y French, F.S. -J. Biol. Chem. 251: 5620 (1976).
- 159- Gupta, D. , Zarzycki, J. y Rager, K. -Steroids 25: 33 (1975).
- 160- Cigorraga, S. , Podestá, E.J. , Chemes, H.E. , Rivarola, M. A. y Charreau, E.H. -J. Steroid Biochem. 8: 747 (1977).
- 161- Welsh, M.J. y Wiebe, J.P. -Endocrinology 103: 8383(1978).
- 162- de Larminat, M.A. , Cuasnicú, P.S. y Blaquier, J.A. -J. Steroid Biochem. (En prensa).
- 163- Negro-Vilar, A. , Krulich, L. y McCann, S.M. -Endocrinology 93: 660 (1973).
- 164- Dohler, K.D. y Wuttke, W. -Endocrinology 94: 1003 (1974).
- 165- Ojeda, S.R. , Jameson, H.E. y McCann, S.M. -Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 151: 310 (1976).
- 166- Ravault, J.P. y Courot, M. -J. Reprod. Fertil. 42: 563 (1975).
- 167- Aragona, C. y Friesen, H.G. -Endocrinology 97: 677 (1975).
- 168- Orgebin-Crist, M.C. y Djiane, J. -Biol. Reprod. 21: 135 (1979).
- 169- Orgebin-Crist, M.C. y Hoffman, L.H. -En : Regulatory Mechanisms of Male Reproductive Physiology (C.H. Spilman, T.J. Lobly y K. T. Kirton Eds.), Excerpta Medica, Amsterdam, 1976, p. 141.
- 170- Purvis, K. , Clausen, O.P.F. , Olsen, A. , Maug, E. y Hansson, V. - Archives of Andrology 3: 219 (1979).
- 171- Calvo, J.C. , Regulación Hormonal de la Función Testicular, Tesis doctoral, F.C.E.N. , U.B.A. , 1979.
- 172- Morris , P.L. y Saxena, B.B. -En: The Endocrine Society,

- 61st Annual Meeting, 1979, Libro de resúmenes Abst. 164.
- 173- Martini, L. Celotti, F., Massa, R. y Motta, M. - J. Steroid Biochem. 9: 411 (1978).
- 174- McNeilly, A.S., Sharpe, R.M., Davidson, D.N. y Fraser, H.M. -J. Endocrinol. 79: 59 (1975).
- 175- Bartke, A. -En : The testis in normal and infertile men, (P. Troen y H.R. Nankin Eds.), N.Y., Raven Press, 1977, p. 367.
- 176- Charreau, E.H., Attramadal, A., Torjesen, P.A., Calandra, R.S., Purvis, K. y Hansson, V. -Mol. Cell. Endocrinol. 7:1 (1977).
- 177- Gluckman, P.D., Marti-Hemmenberg, C., Thomsett, M. J., Kaplan, S.L., Rudolph, A.M. y Grumbach, M.M. -Endocrinology 105: 1173 (1979).
- 178- Koenig, M.P., Zuppinger, K. y Liechti, B. -J. Clin. Endocrinol. Metab. 45: 825 (1979).
- 179- Jacobi, G.H., Sinterhauf, K., Kurth, K.H. y Altwein, J.E. - The Journal of Urology 119: 240 (1978).
- 180- Bartke, A. -Acta Endocr. Suppl. 177: 22 (1973).
- 181- Debeljuck, L., Rozados, R., Daskal, H., Villegas Vélez, C. y Mancini, A.M. - Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 148: 550 (1975).
- 182- Czyba, J.C., Cottinet, D., Dams, R. y Curet, M. -C.R. Soc. Biol. 165: 1624 (1971).
- 183- Tahiri-Zagret, C. y Oria, A. - Ann. Endocr. (Paris) 40: 129 (1979).
- 184- Harper, M.E., Danutra, V., Chandler, J.A. y Griffiths, K. Acta Endocr. 83: 211 (1976).

- 185- Ojeda, S.R. , Harms, P.G. y McCann, S.M. -Endocrinology 94: 1650 (1974).
- 186- Blake, C.A. -Endocrinology 98: 99 (1976).
- 187- Doherty, P.C. , Smith, M.S. y Bartke, A. - The Endocrine Society, 62nd Annual Meeting, 1980, Libro de resúmenes Abst. 704.
- 188- Oshima, H. , Sarada, T. , Ochiai, K. y Tamaoki, B.I. -Endocrinology 86: 1215 (1970).
- 189- Gustafsson, J.A. y Stenberg, A. -Acta Endocr. 78: 545 (1975).
- 190- Debeljuk, L. , Khar, A. y Justisz, M. -Mol. Cell. Endocrinol. 10: 159 (1978).
- 191- MacLeod, R.M. y Lamberts, S.W.J. - Endocrinology 103: 200 (1978).
- 192- West, B. y Dannies, P.S. -Endocrinology 104: 877 (1979).
- 193- Lawson, D.M. y Gala, R.R. -Endocrinology 96: 313 (1975).
- 194- Thorner, M.O. -Lancet 1: 662 (1975).
- 195- Heindel, J.J. , Steinberger, A. y Strada, S.J. -The Endocrine Society, 61st Annual Meeting, 1979, Libro de Resúmenes Abst. 724.
- 196- Vermes, I. ,y Telegdy, G. -International Journal of Andrology 1: 523 (1978).
- 197- Shah, P.G. y Sheth, A.R. -Experientia 35: 1555 (1979).
- 198- Di Carlo, F. , Reboiani, C. , Conti, G. , Portaleone, P. , Viani, L. y Genazzo, E. -En : Pharmacological Modulation of Steroid Action, (E. Genazzani, F. Di Carlo y W.I.P. Mainwaring Eds.), Raven Press, N.Y. , 1980, p. 61.

- 199- Babbot, D. , Rubin, A. y Ginsburg, S.J. -Diabetes 7: 33 (1958).
- 200- Rubin, A. -Ann. J. Obst. Ginec. 76: 25 (1958).
- 201- Irisawa, S.H. , Shirai, M. , Matsushita, S.H. , Kagayama, M. , Ichijo, S. -Tohoku J. Exp. Med. 88: 311 (1966).
- 202- Schoffling, K. , Federling, K. , Scmitt, W. y Pfeiffer, E. , -Acta Endocr. 54: 335 (1967).
- 203- Schoffling, K. , Federling, K. , Ditschunheit, H. y Pfeiffer, E.I. -Diabetes 12: 519 (1963).
- 204- Villanueva, A. , García, G. , Hernández, P. , Cesarman, E. , -Rev. Invest. Clin. (México) 16: 31 (1964).
- 205- Warren, S.J. y Le Compte, P.M. -Lea & Febiger, Phila. , Vol I (1952).
- 206- Salama-Benarrech, I. -Rec. Clin. Española 95: 309 (1964).
- 207- Horstmann, L. -Acta Endocr. 5: 262 (1958).
- 208- Miller, S. y Masson, M.L. -J. Clin. Invest. 5: 220 (1945).
- 209- Soulairac, A. , Desclaux, P. -Ann. d'Endocr. 9: 333 (1948).
- 210- Faerman, I. , Vilar, O. , Rivarola, M. , Rosner, J.M. , Jadzinsky, M. , Fox, D. , Perez Lloret A. , Saraceni, D. y Bernstein Mahn, L. -Diabetes 21: 123 (1972).
- 211- Kent, J.R. -Diabetes 15: 537 (1966).
- 212- Antonioni, F.M. y Petruzzi, E. - Acta VII Internat. Diabetes Federation Congress, Buenos Aires , 1970.
- 213- Von Mering, J. y Minkowski, O. -Arch. Exper. Path. 26: 371 (1889).

- 214- Foglia, V.G. -Rev. Soc. Arg. Biol. 20: 21 (1944).
- 215- Foglia, V.G. -Rev. Soc. Arg. Biol. 21: 45 (1945).
- 216- Foglia, V.G. -Brit. Med. J. II: 844 (1958).
- 217- Foglia, V.G., Basabe, J.C. y Chieri, R.A. -Diabetología 5: 258 (1969).
- 218- Foglia, V.G., Chieri, R.A. y Peralta Ramos, M.C. -Horm. Metabolic. Research 2: 76 (1970).
- 219- Chieri, R.A., Pivetta, O.H. y Foglia, V.G. -Fertil. Steril. 20: 661 (1969).
- 220- Soulairac, A., Desclaux, P. y Katz, R.P. -C. R. Soc. Biol. (Paris) 142: 311 (1948).
- 221- Angerwall, L., Hesselsjo, R., Nilsson, S. y Tisell, L.E. -Diabetología 3: 395 (1967).
- 222- Sufrin, G. y Prutkin, L. -Invest. Urol. 11: 361 (1974).
- 223- Oksanen, A. y Tuohimaa, P. -Hormone Res. 6: 138 (1975).
- 224- Calame, S.S. y Lostroh, A.J. -Endocrinology 75: 451 (1964).
- 225- Lostroh, A.J. -Endocrinology 88: 500 (1971).
- 226- Franks, L.M. -Exp. Cell. Res. 22: 56 (1961).
- 227- Johansson, R. -Acta Endocr. 80: 761 (1975).
- 228- Santii, R.S., y Johansson, R. -Exp. Cell. Res. 77: 111 (1973).
- 229- Tesone, M., Biella de Souza Valle, L., Foglia, V.G. y Charreau, E.H. -Acta Physiol. Latinoam. 26: 387 (1976).
- 230- Calvo, J.C., Biella de Souza Valle, L., Barañao, J.L., Tesone, M. y Charreau, E.H. -Horm. Metab. Res. 11: 161 (1979).

- 231- Charreau, E.H. , Calvo, J.C. , Tesone, M. , Valle, L.B.S. , y Barañao, J.L.S.-J. Biol. Chem. 253: 250 (1978).
- 232- Tesone, M. -Regulación Hormonal de la Función Testicular en la Diabetes Experimental, Tesis doctoral, F.C.E.N. , U.B.A. , 1978.
- 233- Cunningham, G.R. y Huckins, C. -Endocrinology 105: 177 (1979).
- 234- Garfield, S.A. y Cardell, R.R. -The Endocrine Society, 62nd Annual Meeting, 1980, Libro de resúmenes. Abst. 554.
- 235- Howland, B.E. y Zebrowsky, E.J. -Horm. Metab. Res. 6:121 (1974).
- 236- _____ y _____ -Horm. Metab. Res. 8: 465 (1976).
- 237- Sandberg, A.A. -Vit. and Hormones 33: 155 (1975).
- 238- Smith, R.D. , Hilf, R. y Senior, A.E. -Cancer Research 37: 595 (1977).
- 239- Jost, A. -Phil. Trans. B. 259: 119 (1970).
- 240- Barraclough, C.A. -Rec. Prog. Horm. Res. 22: 503 (1966).
- 241- Moguilevsky, J.A. , Scacchi, P. y Rubinstein, L. -J. Endocr. 74: 143 (1977).
- 242- Ghraf, R. , Hoff, H.G. , Lax, E.R. y Schriefers, H. -J. Endocr. 67: 317 (1975).
- 243- Kincl, F.A. , Folch Pi, A. , Maqueo, M. , Herrera Lasso, L. Ori 1, A. y Dorfman, E.I. -Acta Endocr. 46: 25 (1965).
- 244- Goldman, A.S. , Gustafsson, J.A. y Stenberger, A. -Acta Endocr. 76: 719 (1974).

- 245- Swanson, H.E. y van der Verff ten Bosch, J. J. -J. Endocr. 26: 197 (1963).
- 246- Maqueo, M y Kincl, F.A. -Acta Endocr. 46: 25 (1964).
- 247- Booth, J.E. -J. Endocr. 72: 135 (1977).
- 248- Morrison, R.L. y Johonson, D.C. -J. Endocr. 34: 117 (1966).
- 249- Dixit, V.P. y Niemi, M. -J. Endocr. 59: 379 (1973).
- 250- Chung, L.W.K. y Ferland- aymond, G. -Endocrinology 97: 145 (1975).
- 251--Gunsalus, G.L. , Musto, N.A. y Bardin, C.W. -International Journal of Andrology Suppl. 2: 482 (1978).
- 252--Dorrington, J.H. , Fritz, I.B. y Armstrong, D. T. -Mol. Cell. Endocr. 6: 117 (1976).
- 253- Robaire, R. , Ewing, L.L. , Irby, D.C. y Desjardins, C. - Biol. Reprod. 21 : 455 (1979).
- 254- Joseph, A.A. y Kincl, F.A. -J. Steroid Biochem. 5: 2271 (1974).
- 255--Frick, J, Chang, C.C. y Kincl, F.A. -Steroids 13: 21 (1969).
- 256- Labrie, F., Lagacé, L. , Ferland, L. , Baulieu, M. , Massicotte, J. y Raymond, V. -Annals of Clinical Research 10: 109 (1978).
- 257- Juneja, H.S. , Motta, M. , Vasconi, F. y Martini, L. -En : Androgens and Antiandrogens, (L. Martini y M. Motta Eds.) Raven Press, N.Y. , 1977, p. 127.
- 258- Kao, L.W.K. y Weisz, J. -Endocrinology 96: 253 (1975).
- 259- Labrie, F. , Lagacé, L. , Ferland L. , Kelly, P.A. , Drouin, J. , Massicotte, J. , Bonne, C. , Raynaud, J.P. y Dorrington,

- J.H.-International Journal of Andrology Suppl. 2: 1 (1978).
- 260- Kalra, P.S., Fawcett, C.P., Krulich, L. y McCann, S.M. -
Endocrinology 92: 1256 (1973).
- 261- Mahesh, V.B., Muldoon, T.G., Eldridge, J.C. y Korach,
K.S. -J. Steroid Biochem. 6: 1025 (1975).
- 262- Naftolin, F., Ryan, K.J., Davies, I.J., Reddy, V.V., Flores,
res, F., Petro, Z., Kuhn, M., White, R.J., Takaoka? Y.
y Wolin, L. -Rec. Prog. Horm. Res. 31: 295 (1975).
- 263- Naftolin, F. y Ryan, K.J. -J. Steroid Biochem. 6: 993 (1975).
- 264- Ogrein, L, Vertes, M y Woolley, D. -Neuroendocrinology
21: 350 (1976).
- 265- Kato, J. -J. Steroid Biochem. 7: 1179 (1976).
- 266- Kniewald, J., Caia, S., Mildner, P. y Kniewald, Z. -J. Ste-
roid Biochem. 7: 1077 (1976).
- 267- Vértés, M. y King, R.J.B. - J. Endocr. 51: 27 (1971).
- 268- Martini, L. -En : Subcellular Mechanisms in Reproductive
Neuroendocrinology, (F. Naftolin, I.J. Davies y K.J. Ryan
Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1977.
- 269- Maiwaring, W.I.P. -Biochem Biophys. Res. Commun. 40:
192 (1970).
- 270- Unhjem, O. -Acta Endocr. 65: 525 (1970).
- 271- Nozu, K. y Tamaoki, B.I. -Acta Endocr. 73: 585 (1973).
- 272- Nozu, K. y Tamaoki, B.I. - J. Steroid Biochem. 6: 1319 (1975).
- 273- Charreau, E.H. y Salmoral, E.M. -Endocrine Res. Commun.
4: 85 (1977).

- 274- Richardson, G.S. y Axelrod, L.R. -Endocrinology 88: 890 (1971).
- 275- Grant, J.K., Minguell, J., Taylor, P. y Weiss, M. -Biochem. J. 125:21P (1971).
- 276- Habib, F.K., Hammond, G.C., Stitch, S.R. y Dowson, J. B. -J. Endocr. 65: 34 (1975).
- 277- Vreeburg, J.T.M. y Scholte, H.R. -Acta Endocr. Suppl. 77: 67 (1973).
- 278- Margineda Romeu, A. y Stoppani, A.O.M. - Anales de la Asociación Química Argentina 63: 113 (1975).
- 279- Fang, S., Anderson, K.M. y Liao, S. -J. Biol. Chem. 244: 6584 (1969).
- 280- Fang, S. y Liao, S. -Mol. Pharmacol. 5: 420 (1969).
- 281- Gorski, R.A. -En; Quest, Vol II, 1980, p. 89 .

Joe L. B...

G. Blaneau