

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS DOCTORAL

**Mecanismo de producción de testosterona por el testículo :  
influencia de la prolactina**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Montserrat Puente Cueva**

DIRECTOR:

**Aniceto Charro Salgado**

Madrid, 2015

Montserrat Puente Cueva

TP  
1980  

---

094



\* 5 3 0 9 8 5 3 6 3 4 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-044251-4

MECANISMO DE PRODUCCION DE TESTOSTERONA POR EL TESTICULO.  
INFLUENCIA DE LA PROLACTINA

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1980



BIBLIOTECA

© Montserrat Fuente Cueva

Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8

Madrid, 1980

Xerox 9200 XB 480

Depósito Legal: M-19931-1980

MECANISMO DE PRODUCCION  
DE TESTOSTERONA POR EL TESTICULO.  
INFLUENCIA DE LA PROLACTINA

MONTSERRAT PUENTE CUEVA

A MIS PADRES, a quienes debo todo cuanto soy.

AGRADECIMIENTOS

En breves palabras quisiera expresar mi gratitud más sincera a cuantos de alguna manera han hecho posible la realización de este trabajo.

Al Profesor D. Arturo Fernández-Cruz Liñán, Catedrático de Patología General, bajo cuya tutela me inicié en el estudio de la Endocrinología experimental.

Al Profesor D. Aniceto L. Charro Salgado, Jefe de Servicio de Metabolismo y Nutrición del Hospital Clínico, por toda la ayuda tanto de carácter científico como humano, que me ha prestado en estos años de mi formación.

Al Profesor D. Angel Martín Municio, Catedrático de Bioquímica, por haber aceptado gustosamente la corrección y presentación de esta tesis.

Al Profesor D. Hipolito Durán Sacristán, Catedrático de Patología Quirúrgica, por haber contribuido durante todos estos años, y quizás sin darse cuenta, a darme el apoyo moral necesario.

#### IV

A mis compañeros de laboratorio, Guillermo López del Campo, Elena Bordiú Obanza, Alicia López Maciá, Raquel - Fernández Durango, Virgilio Pérez-Infante, Fátima Montiel Casado, Andrés Bedate Gutierrez, Isabel Runkle, Ignacio - Torres, Lucio Cabrerizo, Marcelo Cordero y Fernando Dujo, con quienes he tenido la suerte de formar un equipo de -- trabajo en el que la amistad cuenta de una manera impor-- tante.

A Mary Carmen Salmerón Urrea, por su esmerada y desinteresada labor mecanográfica.

A los Señores A. Sarasquete, A. Casado y F. Ormeño, - por su colaboración en la iconografía.

Y a la Fundación General Mediterránea, que por medio del Patronato de Investigaciones Endocrinometabólicas, ha contribuido de una manera especial a la existencia de nuestro grupo de investigación.

I N D I C E

I.	INTRODUCCION GENERAL.....	1
	1. Mecanismo de acción de la LH en la Gonada Masculina.....	1
	A) Introducción.....	1
	B) Receptores de Gonadotropinas.....	4
	C) Sistema adenil ciclasa-AMPC.....	11
	D) Activación de proteínas quinasas y síntesis proteica.....	20
	E) Lugar de acción de la LH en la esteroidogénesis.....	28
	2. Regulación hormonal de la síntesis de Andrógenos.....	33
	A) Influencia de la FSH.....	33
	B) Influencia de la PRL.....	36
	C) Influencia de la Hormona de Crecimiento.....	39
	D) Influencia de los Estrógenos y Andrógenos.....	42
	3. Objeto de la Tesis.....	46

II. MATERIAL Y METODOS.....	49
1. Materiales.....	50
2. Aparatos.....	50
3. Modelo experimental utilizado.....	51
3.1 Animales.....	51
3.2 Obtención de células Intersticiales.	51
3.3 Incubaciones y extracción de AMPc, - GMPc y Testosterona.....	54
3.4 Cromatografía en resina cambiadora - de iones.....	55
4. Métodos analíticos para la determinación de AMPc, GMPc y Testosterona.....	55
4.1 Determinación de AMPc.....	55
4.1.1 Obtención de la proteína recep tora y Titulación.....	56
4.1.2 Método de saturación.....	56
4.1.3 Preparación de las muestras ..	58
4.2 Determinación de GMPc.....	58
4.2.1 Acetilación de las muestras...	59
4.2.2 Método de radioinmunoensayo...	59
4.3 Determinación de Testosterona.....	61
4.3.1 Extracción de las muestras....	61
4.3.2 Método de radioinmunoensayo...	61

VII

5.	Incubaciones en presencia de LH y determinación de AMPc, GMPc y Testosterona.....	63
6.	Incubaciones en presencia de PRL, LH y evaluación de AMPc y Testosterona.....	65
7.	Estudio estadístico de los resultados.....	65
III	RESULTADOS.....	67
1.	Determinación de AMPc por "Protein Binding"	68
1.1	Titulación de proteínas.....	69
1.2	Evaluación de la curva estandar: precisión, sensibilidad, constante de asociación y especificidad.....	69
1.3	Técnica de saturación.....	76
1.4	Precisión del ensayo.....	79
2.	Determinación del GMPc por radioinmunoensayo.....	86
2.1	Evaluación de la curva estandar: precisión, sensibilidad, constante de asociación y especificidad.....	88
2.2	Precisión del ensayo.....	95
3.	Determinación de Testosterona por radioinmunoensayo.....	98
3.1	Evaluación de la curva estandar: sensibilidad precisión y especificidad.....	98
3.2	Técnica del RIA.....	101
3.3	Precisión del ensayo.....	104

VIII

4.	Efecto de la LH sobre los niveles de GMPc, AMPc y Testosterona en células intersticiales de tejido testicular.....	107
4.1	Curvas dosis-respuesta.....	108
4.2	Curvas de tiempo.....	112
5.	Efecto de la PRL sobre la Testosterona estimulada por la LH en células de Leydig...	118
5.1	Experimentos con ratas adultas.....	120
5.2	Experimentos con ratas inmaduras.....	127
IV	DISCUSION.....	132
1.	Técnicas.....	133
2.	Incubaciones con LH.....	143
3.	Incubaciones con LH y PRL.....	149
V	CONCLUSIONES.....	157
VI	BIBLIOGRAFIA.....	161

ABREVIATURAS

LH	- hormona luteinizante
FSH	- hormona foliculo estimulante
PRL	- prolactina
GH	- hormona de crecimiento
ACTH	- hormona adrenocorticotropa
hCG	- gonadotropina coriónica humana
ABP	- proteína transportadora de andrógenos
DHT	- 5 $\alpha$ dihidrotestosterona
AMPc	- 3'-5' adenosin monofosfato cíclico
GMPC	- 3'-5' guanosin monofosfato cíclico
ATP	- adenosin trifosfato
GTP	- guanosin trifosfato
E <sub>2</sub>	- estradiol
T	- testosterona
PK	- proteína quinasa
K <sub>a</sub>	- constante de asociación
RNA	- ácido ribonucléico
NADPH	- nicotinamidadenin dinucleótido fosfato reducido
NADP <sup>+</sup>	- nicotinamidadenin dinucleótido fosfato oxidado

X

$^{125}\text{I}$ ScGMPc-TME	- $^{125}$ yodo succinil guanosin monofosfato cíclico tirosina metil éster
RIA	- radioinmunoensayo
KRBG	- krebs ringer bicarbonato glucosa
Ci/mmol	- curios/milimol
C.V.	- coeficiente de variación
EDTA	- ácido etilen diaminotetraacético
SEM	- error estandar de la media
S.D.	- desviación estandar

INTRODUCCION

Y

OBJETO DE LA TESIS



## 1.- MECANISMO DE ACCION DE LA LH EN LA GONADA MASCULINA

### A.- Introducción

El testículo al igual que el ovario, realiza una -  
doble función. De una parte endocrina, dando lugar a  
la formación de hormonas esteroideas (1) y de otra par  
te germinal con la producción de espermatozoides (2).-  
La espermatogénesis tiene lugar en los túbulos seminí-  
feros, fuertemente enrollados unos sobre otros y ro-  
deados del tejido conectivo que contiene las células -  
de Leydig (3). En estas células, con excelente aporte  
sanguíneo, es donde se realiza la esteroidogénesis. -  
Todo el testículo se encuentra rodeado de una capsula  
blanca densa, la túnica albugínea.

Las funciones endocrina y germinal del testículo -  
están controladas por las dos hormonas tróficas LH(hor  
mona luteinizante, también llamada hormona estimulante  
de las células intersticiales ICSH)y FSH aunque es po-  
sible que otras hormonas hipofisarias, tal vez la PRL

y la GH puedan ejercer alguna influencia sobre la gónada masculina. La FSH (4), juntamente con los andrógenos, actúan sobre los túbulos seminíferos posibilitando la espermatogénesis y a su vez la LH controla la esteroidogénesis de las células de Leydig estimulando la biosíntesis y secreción de andrógenos (5) -- (Véase Fig. 1).

El mecanismo por el cuál la hormona luteinizante controla la secreción de andrógenos testiculares y esteroides ováricos es similar al mecanismo por el cuál el ACTH regula la producción de corticosteroides en la corteza adrenal (6). Debido a que ambas hormonas ejercen por una parte acción trófica (prolongada) y por otra parte una acción rápida sobre la esteroidogénesis, es importante distinguir entre estos dos aspectos de la acción hormonal cuando se analizan los mecanismos por los cuales estas hormonas estimulan la producción de esteroides de una manera aguda.

Los diversos efectos de las hormonas peptídicas en sus tejidos y células diana están mediados por una

### CONTROL DE LA ESTEROIDOGENESIS

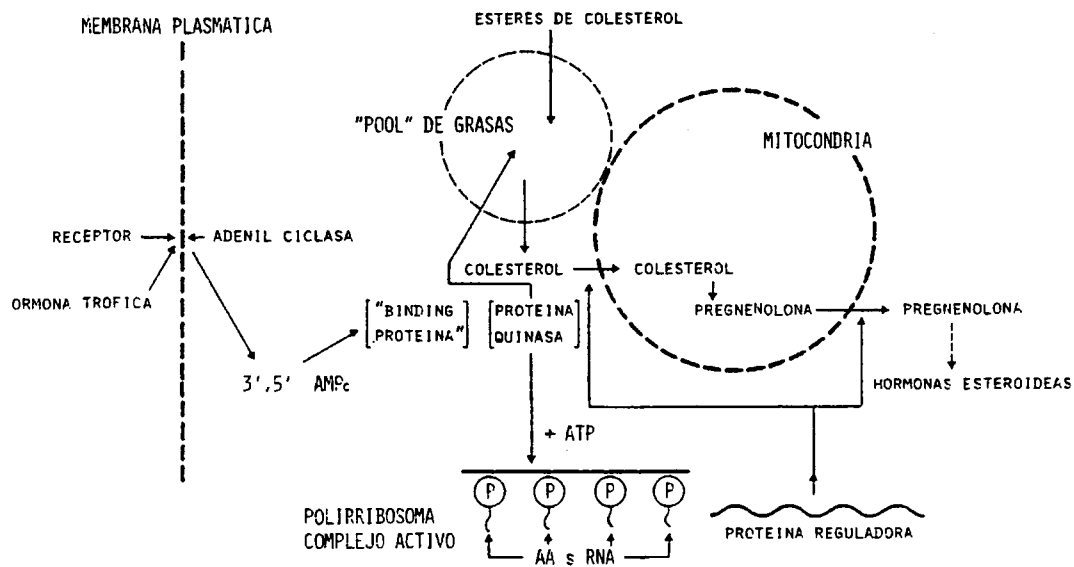


Fig. 1

serie de procesos bioquímicos que se inician por la unión de la hormona a receptores específicos (7). En la células de Leydig la acción de la gonadotropina coriónica origina, después de esa unión hormona-receptor (8), la activación del sistema adenil ciclasa (9). El aumento del AMPc inducido hormonalmente, da lugar a la activación del sistema proteína quinasa (10), con la consiguiente fosforilación de sustratos proteicos que probablemente regulan los primeros pasos de la esteroidogénesis gonadal. (Véase Fig. 2).

#### B.- Receptores de Gonadotropinas

Un aspecto común de las hormonas peptídicas es su habilidad para unirse a receptores específicos en la membrana plasmática de sus células diana. La ocupación de dichos receptores específicos en la membrana, es seguida de una rápida activación de las respuestas celulares que van desde la síntesis de proteínas reguladoras específicas, pasando por cambios en la permeabilidad celular, hasta la secreción de los productos formados y estímulo del crecimiento celular.

## ACCION DE HORMONAS TROFICAS EN EL TESTICULO

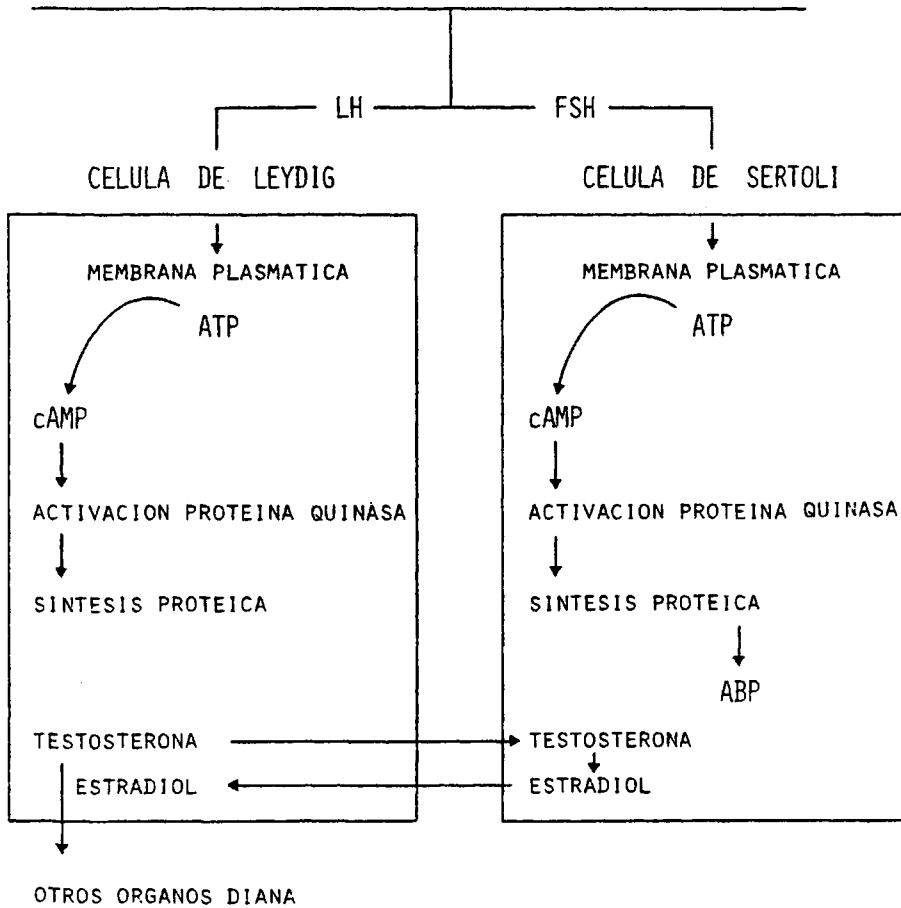


Fig. 2

En algunos estudios, se han detectado uniones de hormonas peptídicas a tejidos diferentes de aquellos -- usualmente aceptados como tejidos diana. La importancia biológica de tales uniones, que no pueden estar - relacionadas con una respuesta celular adecuada, es - dudosa. Por esta razón no ha existido un acuerdo general acerca de la definición exacta de receptor hormonal y se ha propuesto el término "receptor específico hormonal" como la definición más exacta de todo - aquello que pueda comprender receptores, lugares de - almacenamiento y sistemas de degradación.

Existen sin embargo una serie de características operacionales que nos pueden definir los receptores - hormonales. Estas incluyen las propiedades físicas - necesarias para la unión de bajas concentraciones de hormonas (generalmente  $10^{-10}M$ ) tales como: especificidad estructural, afinidad elevada, capacidad limitada (generalmente), saturabilidad, cinética rápida y - un cierto grado de reversibilidad, así como especificidad de tejido y correlación de la unión con una respuesta hormonal apropiada (11).

El primer paso pues de la acción gonadotropa en la esteroidogénesis, es la unión de la hormona a receptores de afinidad elevada en la membrana plasmática. Dichos receptores que son específicos para la LH y gonadotropinas similares (12 y 13), han sido extraídos tanto de testículo como de ovario por medio de detergentes no iónicos. Los receptores de gonadotropinas constan principalmente de una porción proteica y de otra porción lipídica en menor cuantía pero de considerable importancia (14). Los receptores de LH en el testículo, han sido purificados hasta un grado de purificación de un 50% y están compuestos de dos subunidades con un peso molecular de 90.000 (15); se han estudiado en células de Leydig obtenidas de testículo de rata por tratamiento enzimático con colagenasa, y se ha comprobado que cada célula contiene alrededor de 5000 receptores de LH/hCG, que poseen una afinidad elevada por la hormona ( $K_a=10^{-10}M^{-1}$ ) y que se comportan como una única clase de lugares de unión (16).

Para la unión efectiva de la hormona al receptor es necesaria la presencia de la molécula completa y se

ha comprobado que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de LH y hCG - no compiten con ella en esa unión (17 y 18). Además en la esteroidogénesis "in vitro" la molécula nativa estimula la producción de testosterona, mientras que sus subunidades son incapaces de conseguir un estímulo similar (17).

Cuando las subunidades de LH se asocian para formar la hormona original (19), existe entre ellas una considerable movilidad relativa, lo que hace que nos preguntemos acerca de los condicionamientos de la hormona nativa para unirse al receptor. ¿Persiste esta movilidad entre las subunidades en el mismo grado después de la unión al receptor?. Sino es así eso implicaría una transferencia apreciable de energía entre la hormona y el receptor, y por último esa transferencia de energía ¿juega algún papel en la activación del sistema adenil ciclasa o en otros procesos asociados a membrana?.

Tampoco se conoce mucho acerca de la función -- que desempeña la porción carbohidrato de la molécula

de LH en su unión al receptor. Tsuruhara y col. (20) -- han comprobado que la unión a los receptores testicular -- res no se veía perjudicada cuando de la molécula de hCG se quitaban el ácido sialico terminal y la galactosa, -- aunque la estimulación "in vitro" de testosterona en células de Leydig se encontraba disminuida.

Cuando se estudian los efectos de la modificación química de los grupos tirosina y amino de la LH ovina (21 y 22) en la unión a los receptores de las células de Leydig en ratas, se encuentra que la nitración de una tirosina de la molécula nativa reduce esa unión en un 60% mientras que la nitración de dos tirosinas reduce esa actividad en un 90%. Esas tirosinas parecen estar localizadas en la subunidad  $\alpha$  puesto que las dos tirosinas de la subunidad  $\beta$  no son susceptibles de nitración en la molécula nativa. Estos y otros estudios han sugerido que 1) dos grupos amino de la subunidad  $\beta$  de la LH ovina están implicados en la unión y que -- deben ser neutros o estar positivamente cargados y 2) que de dos a ocho aminoácidos de la subunidad  $\alpha$  están --

implicados en la unión al receptor, aunque eso no signifique que esas tirosinas y grupos amino estén exactamente en el lugar de unión de la hormona al receptor, puesto que esas modificaciones químicas pueden haber producido cambios conformacionales que afecten indirectamente a esa unión.

La existencia y desarrollo de los receptores de LH es parcialmente dependiente de la acción trófica de la LH endógena y probablemente de otras hormonas pituitarias. Aunque ha sido descrita una acción sinérgica de la FSH en la esteroidogénesis provocada por la LH en testículo perfundido (23), no ha sido posible detectar efecto alguno de la FSH, PRL y ACTH sobre la producción de testosterona "in vitro" tanto en células intersticiales como en testículo de rata (24). Sin embargo la administración de FSH a ratas inmaduras aumenta la respuesta testicular a la LH, atribuyéndose este efecto a una acción directa de la FSH sobre los receptores de LH de las células de Leydig (25 y 26).

Recientemente se ha comprobado que los receptores de LH tanto en testículo como en ovario están regulados por la gonadotropina coriónica circulante (27 y 28). La inyección de 50 IU de hCG a ratas adultas es seguida de una pérdida de sus receptores testiculares como se comprueba por ensayo de receptores, pérdida que se mantiene durante 5 días después de la inyección alcanzando al séptimo día la concentración original. Paralelamente se ha encontrado una disminución de la respuesta del AMPc al estímulo hormonal lo que muestra que la pérdida de receptores se acompaña de una inactivación del sistema adenil ciclasa. En estudios similares con ovarios de ratas luteinizadas también la actividad del sistema adenil ciclasa disminuía al mismo tiempo que ocurría la pérdida de receptores de LH (29).

#### C.- Sistema adenil ciclasa-AMPc

Se ha demostrado que la mayoría de las hormonas peptídicas activan la enzima adenil ciclasa, siendo éste el primer proceso bioquímico que sigue a la unión de los péptidos a receptores de membrana. Sin embargo la naturaleza de las relaciones físicas y funcionales entre los

receptores y el sistema adenil ciclasa está todavía - por aclarar a pesar de los estudios realizados en los últimos diez años sobre esta materia.

Entre los diversos modelos propuestos para explicar esta relación destaca el de Cuatrecasas (30) donde receptores y enzima se consideran como estructuras separadas que se supone pueden asociarse cuando por movimientos de difusión a lo largo del plano de la membrana celular llegan a encontrarse. Este encuentro conduce a una activación enzimática sólo cuando el receptor ha sido ocupado por la hormona. En otros modelos (31) el sistema adenil ciclasa consta de tres sitios de unión a los que diferentes ligandos se acoplan para modificar la actividad enzimática; estos tres sitios son: el receptor hormonal, la porción catalítica que reacciona con ATP y Mg y la porción reguladora dependiente de nucleótidos cíclicos la cual reacciona preferentemente con nucleótidos derivados de la guanina. En estudios cinéticos sobre los efectos de estos nucleótidos en la activación de la adenil ciclasa hepática por el glucagón, se ha propuesto, que el complejo adenil ciclasa -

puede existir en diferentes formas o conformaciones - intercambiables entre sí debido a la acción de la hormona y el guanosín monofosfato, sugiriendo que las diversas conformaciones tienen diferentes afinidades - por el sustrato, con lo que se obtienen distintos grados de activación dependiente de la combinación de - hormona y nucleótido presentes en cada caso.

En otros tejidos se han encontrado también efectos similares. Utilizando análogos de los nucleótidos de guanina resistentes a la hidrólisis se ha comprobado que activan el sistema adenil ciclasa, lo que parece indicar que estos compuestos no funcionan como donadores de grupos fosfatos sino más bien como activadores alostéricos de la enzima adenil ciclasa (32). Estos efectos del GTP y análogos sugieren que la modulación de la interacción del nucleótido con la unidad catalítica del sistema adenil ciclasa, puede constituir un procedimiento general del modo de actuar de las hormonas peptídicas.

En la mayoría de los tejidos en los que los efectos hormonales están mediados por el AMPc se demuestra que la unión de la hormona al receptor lleva asociada un incremento de la actividad de la adenil ciclasa.

Sin embargo a pesar de los considerables aumentos de AMPc en tejido testicular producidos por la LH se han conseguido una activación mínima del sistema adenil ciclasa. Que esos aumentos de AMPc no se deben a cambios en la velocidad de degradación del nucleótido, se demuestra por el hecho de no existir efecto alguno de la gonadotropina en la actividad de la fosfodiesterasa en las células de Leydig; atribuyéndose esos aumentos inducidos por la hormona gonadotropa a la activación del sistema adenil ciclasa en células intactas, a pesar de la falta de respuesta de este sistema en fragmentos celulares (33).

No ocurre lo mismo con el tejido ovárico donde se ha observado estímulo de la adenil ciclasa por la hCG en preparaciones ováricas solubilizadas con detergentes no iónicos (33).

La participación del AMPc como segundo mensajero - en la esteroidogénesis, se observó por primera vez con los trabajos de Haynes y col. (34), en los que se demostró que el ACTH producía incremento del contenido de AMPc en cortes de tejido adrenal y que el adenosin monofosfato cíclico exógeno estimulaba la producción de corticoides en adrenales de rata. Mas recientemente otros autores (35), han corroborado esta teoría con células de corteza adrenal.

Por lo que se refiere a las gonadotropinas numerosos estudios en testículo y ovario apuntan hacia una mediación del AMPc en el mecanismo de acción tanto de la LH como de la FSH.

En el ovario se han descrito aumentos en el contenido de AMPc tras el estímulo con LH en el cuerpo lúteo (36), folículos de Graaf (37) y tejido intersticial (38). También la FSH parece ser que ejerce su acción en células de la granulosa, en ovario, teniendo al adenosin monofosfato como intermediario (39). Estas obser

vaciones tienden a indicar que casi todos los efectos de las gonadotropinas en el ovario parecen necesitar de la formación del AMPc en la célula diana o en el compartimento ovárico apropiado.

En el testículo la biosíntesis de testosterona está mantenida y estimulada preferentemente por la LH (40 y 41). En el tejido intersticial y más concretamente en las células de Leydig es donde tiene lugar la síntesis de testosterona, síntesis que "in vitro" se ve estimulada únicamente por la LH, (22) aunque parece ser que otras hormonas pituitarias potencian "in vivo" la acción de ésta gonadotropina (42).

El mediador intracelular de la acción de la LH en el tejido intersticial se piensa que es también el AMPc (43). Hacia ello apunta: 1) La LH incrementa los niveles de testosterona y AMPc en células de Leydig. 2) El aumento de los niveles de AMPc precede al incremento de los niveles de testosterona. 3) El dibutiril AMPc (derivado del nucleótido) incrementa también los niveles de testosterona.

Aunque existen evidentes demostraciones de que la hormona luteinizante controla la actividad de las células de Leydig estimulando la producción de AMPc, no siempre ocurre una perfecta correlación entre formación de AMPc y producción de testosterona.

Tanto en células de Leydig obtenidas por tratamiento enzimático como en testículo intacto, la LH o hCG (44 y 45) estimulan la producción y secreción de testosterona a concentraciones muy bajas, mientras que para la formación y secreción de AMPc son necesarias dosis más altas de hormona gonadotropa (46).

Tales observaciones sugieren que si el AMPc es el mediador intracelular de la LH, ejercería tal acción por cambios en su concentración indetectables con la metodología existente, o bien porque de algún modo se produciría una traslocación del nucleótido de un compartimento celular a otro.

En un intento de aclarar el problema se ha estudiado la activación de la enzima proteína quinasa en célu-

las de Leydig estimuladas con diferentes concentraciones de LH al mismo tiempo que se hacían determinaciones del AMPc y testosterona producidos, encontrándose una estrecha correlación entre activación de la proteína quinasa y producción de testosterona, con la salvedad de que la máxima cantidad de testosterona se alcanzaba a concentraciones de LH menores que las necesarias para conseguir estimulación de proteína quinasa al máximo (47). Estos resultados que difieren de los de Podesta y col. (48), en los que los cambios de actividad de la enzima proteína quinasa producidos por la hormona gonadotropa no eran paralelos a la respuesta esteroideogénica de las células de Leydig, apoyaban la obligatoriedad de la mediación del AMPc en la acción de la LH.

Son varios los ejemplos de hormonas que actúan a través del AMPc promoviendo su formación intracelular y que lo hacen en una cantidad mayor que la necesaria para originar una respuesta biológica en la célula diana, y tal es el caso de la hormona proteica LH. La presencia de un exceso de receptores (receptores de repuesto)

para la respuesta esteroidogénica a la LH en células de Leydig, se ha visto confirmada por los estudios de unión hormona-receptor, observándose que esa unión se acompaña de una progresiva estimulación de la síntesis de testosterona que alcanza su punto máximo cuando solamente una pequeña porción (un 1%) de los receptores se han ocupado (49).

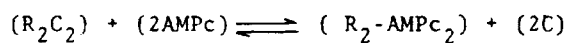
La respuesta biológica de estas células en términos de producción de AMPc sin embargo es algo diferente. La formación de AMPc no se detecta hasta que la producción de testosterona va llegando al máximo, comenzando entonces su síntesis y secreción que corre paralela a la ocupación de los receptores por la LH hasta que todos los sitios de unión se han saturado.

Por lo tanto no existen en las células de Leydig un exceso de receptores de LH en relación con la adenil ciclasa, puesto que se necesita la ocupación total de los mismos para producir una respuesta máxima en términos de producción de AMPc.

La existencia de ese exceso de receptores en relación a la respuesta esteroidogénica de las células, pudiera servir como mecanismo para aumentar la sensibilidad celular a bajas concentraciones de hormona o pudiera también funcionar como una fuente de reserva de receptores en el testículo.

D.- Activación de Proteína Quinasa y Síntesis Proteica

El único mecanismo conocido por el cual el AMPc actúa en células eucarióticas es a través del sistema enzimático proteína quinasa. La activación de este sistema viene dada por la reacción.



En células no estimuladas la mayor parte de la enzima está presente en su forma inactiva ( $R_2C_2$ ). La adición de AMPc exógeno o las elevaciones de AMPc endógeno causan disociación de la holoenzima dando lugar al complejo ( $R_2-AMPc_2$ ) y a la subunidad catalítica activa (C) iniciándose así por esta porción liberada, la fosforilación de sustratos.

La enzima proteína quinasa se encuentra predominante en el citosol de las células y se ha demostrado su existencia en casi todos los tejidos animales, siendo escasa su presencia tanto en plantas como en bacterias.

Debe tenerse en cuenta que la caracterización y estudio de las proteínas quinasas se ha basado en el empleo de las histonas como sustratos enzimáticos y que los verdaderos sustratos para la proteína quinasa se encuentran solamente definidos en tres sistemas. Hasta el momento estos sustratos son, la fosforilasa quinasa, la glicogeno sintetasa y la triglicerido lipasa (50).

Utilizando también las histonas como sustratos exógeno han sido caracterizadas en el testículo tanto en células de Leydig como en células de Sertoli, las proteínas quinasas dependientes de AMPc.

En células intersticiales (51), se ha comprobado por cromatografía en DEAE celulosa, la existencia de dos formas de PK con pesos aproximados de 47.000 y -

95.000 siendo los coeficientes de sedimentación 4S y 6.5S respectivamente.

La activación de proteína quinasa durante las incubaciones de células intactas con concentraciones fisiológicas de hCG ( $10^{-11}$ M) o la activación enzimática por el AMPc va seguida de una conversión de esas formas enzimáticas a otra con coeficiente de sedimentación 2.9, que corresponde precisamente al de la subunidad catalítica.

Estos resultados indican que ambos tipos de enzimas poseen diferentes subunidades reguladoras y una misma subunidad catalítica.

Al igual que en células de Sertoli (52) donde se ha propuesto que la FSH activaría vía AMPc solamente una de las formas de proteína quinasa, la presencia de dos diferentes PK en células de Leydig significaría la posibilidad de una fosforilación diferencial de distintas proteínas reguladoras durante la estimulación

de las respuestas celulares con concentraciones crecientes de hormona gonadotrópica.

La demostración de la activación "in vitro" de la enzima PK con dosis crecientes de LH o hCG (48) y su correlación con el estímulo en la producción intracelular de AMPc y testosterona (47) apuntan hacia una participación activa de la proteína quinasa en la esteroidogénesis.

Incluso con dosis pequeñas de LH donde el interrogante sobre la participación del AMPc-proteína quinasa persistía, se ha comprobado en recientes estudios del grupo de Dufau y col. (53), utilizando células de Leydig con un elevado grado de purificación, que se produce estímulo de AMPc intracelular y que este estímulo se acompaña de incrementos significativos de la actividad de la proteína quinasa.

Por otra parte aunque no ha sido posible demostrar un efecto directo de la LH sobre la síntesis de proteínas por el tejido intersticial y preparaciones celulares -

"in vitro" las incubaciones de células de Leydig con inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida, puromicina) y de RNA (actinomicina D) originan una rápida y completa abolición de la síntesis de testosterona estimulada por la hCG (54).

La estimulación de la síntesis de AMPc por gonadotropinas sin embargo, no se ve afectada por la cicloheximida o actinomicina D. La situación del sistema enzimático adenil ciclasa en la membrana plasmática y su sensibilidad a los estímulos hormonales en una gran variedad de sistemas de fragmentos celulares indican que la síntesis proteica no debe ser necesaria para la formación del AMPc por la célula intacta durante la transmisión del mensaje hormonal al receptor.

De esos resultados se desprende que la esteroidogénesis en células de Leydig requiere de la síntesis continuada de RNA y proteínas durante la estimulación aguda con gonadotropinas. Parece ser que una proteína (o proteínas) reguladoras sintetizadas en el citoplasma sería necesaria en los primeros pasos de la cadena de

reacciones que tienen como resultado final la formación de testosterona y que su función estaría relacionada -- con la unión y traslocación del colesterol hacia la mitocondria.

Dicha proteína reguladora tiene una vida media de 13 minutos como máximo (55) valor que concuerda con los encontrados en otros tejidos esteroidogénicos como la adrenal y el cuerpo luteo (56).

En los mismos experimentos (55) se ha comprobado -- que la cicloheximida no afecta para nada la producción basal de testosterona por lo que en ese aspecto el tejido testicular parece ser diferente de la glándula adrenal y los folículos ováricos donde el tratamiento con -- cicloheximida o actinomicina D disminuyen la producción basal tanto de corticosterona como de progesterona. -- Puede ello deberse, puesto que se ha propuesto como -- una de las funciones de la proteína reguladora el transporte del colesterol a la mitocondria, a que la célula de Leydig disponga de ese sustrato en cantidades sufi -- cientes para que la biosíntesis basal de testosterona no se vea afectada por los inhibidores de la síntesis proteica.

A este respecto Van der Vusse y col. (57) han demostrado que las preparaciones mitocondriales de tejido intersticial de ratas adultas producen grandes cantidades de pregnenolona y que esa producción puede incluso incrementarse si los animales son tratados con LH antes del aislamiento de las mitocondrias.

Otro tipo de estudios han contribuido a la creencia de la necesidad de síntesis de proteínas y de RNA por parte de las células de Leydig durante la estimulación de la síntesis de testosterona por la gonadotropinas LH y hCG.

Cuando se incuban células intersticiales con inhibidores de la fosfodiesterasa, como teofilina (1 mM) o Mix (0.1 mM) se observa un incremento de los valores basales de AMPc y testosterona e igualmente se incrementan el AMPc y la testosterona estimulados por la hCG (58). Sin embargo cuando las concentraciones de estos inhibidores se hacen diez veces mayores se produce una disminución de la testosterona inducida por la hCG al mismo tiempo que se origina una reducción de la síntesis de RNA y pro

teínas. El AMPc estimulado por la hCG aumenta al tratamiento con los inhibidores enzimáticos, lo que implica que el bloqueo de la esteroidogénesis provocado con esas dosis, ocurre a un nivel distante del sistema adenil ciclasa y que más bien parece ser secundario a una inhibición de la síntesis de RNA y/o proteínas puesto que ambos se ven disminuídos.

Recientemente, empleando electroforesis en gel de poliacrilamida se ha demostrado, en células de Leydig, la existencia de dos diferentes proteínas, que pudieran ser importantes en la regulación de la síntesis de testosterona por la LH (59). Una de ellas es dependiente de LH, existiendo una estrecha relación entre las dosis de LH necesaria para la máxima producción de testosterona y aquella que se requiere para estimular su síntesis (60). Esto iría en apoyo de la participación de esta proteína en la biosíntesis aguda esteroidea, pero el hecho de que tenga una larga vida media (30 minutos) y -- que su aparición se detecte a las dos horas de incubación de las células con LH no favorece esta hipótesis, puesto que la producción de testosterona se puede incluso apre-

ciar a los cinco minutos de incubación. No se descarta sin embargo la posibilidad de que esta proteína ejerza un papel importante en los efectos crónicos de la hormona gonadotropa sobre las células de Leydig.

E.- Lugar de acción de la LH en la esteroidogénesis

Puesto que la esteroidogénesis se ve modulada por las hormonas tróficas en el paso de colesterol a pregnenolona (61 y 62) es posible que sea ahí precisamente -- donde los sustratos fosforilados por la proteína quina- sa tengan su esfera de acción.

Tales proteínas podrían muy bien ser necesarias para el transporte del colesterol hacia las mitocondrias o para la actividad enzimática del sistema colesterol pregnenolona.

Pudiera ser también que su influencia se ejerciera en un estadio anterior, puesto que se ha comprobado, -- tanto en testículo como en ovario, que la LH e incluso la PRL, afectan la síntesis y metabolismo de los ésteres de colesterol (63).

En el testículo de ratón el tratamiento con PRL promueve la acumulación de ésteres de colesterol y origina incrementos en la producción de andrógenos en presencia de LH (64). Una vez formado el colesterol libre en el citoplasma se une probablemente a una proteína transportadora y se introduce en la mitocondria para su conversión a pregnenolona (65). Dentro del citocromo P450 - dos son los lugares que participan en la reacción enzimática para la conversión de colesterol a pregnenolona. Esta reacción enzimática depende de una compleja mezcla de oxidasas que inserta grupos oxidrilo en los C20 y C22 de la molécula de colesterol antes del comienzo de la cadena de reacciones que tienen como resultado final la producción de pregnenolona (66).

La fosforilación "in vitro" de sustratos de este sistema enzimático por la proteína quinasa dependiente de AMPc, produce incremento en su actividad (67), siendo éste un posible modo de control de la síntesis de esteroides dependientes de la LH. (Véase Fig. 3).

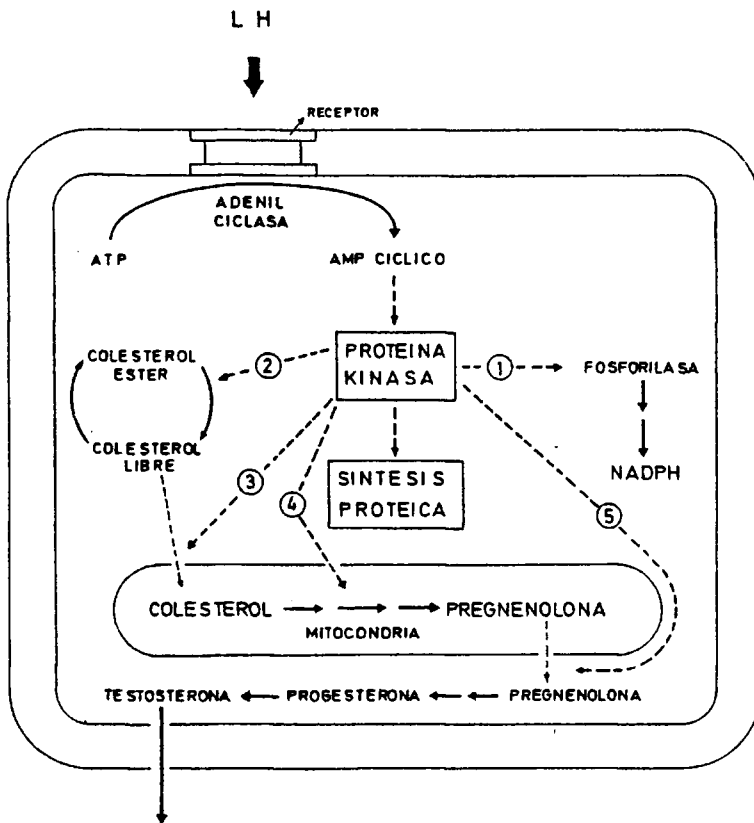
La conversión de pregnenolona a testosterona, que tiene lugar en el retículo endoplásmico liso necesita por lo menos de 5 reacciones enzimáticas:  $17\alpha$ hidroxilasa

sa, 17-20 liasa, 17  $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa, 3  $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa y  $\Delta$  5-3 ceto isomerasa.

En la Fig. 4 se puede observar un esquema más amplio de la producción de T a partir de los precursores de colesterol. En testículo de rata la pregnenolona se convierte en testosterona vía progesterona, 17 $\alpha$  hidroxiprogesterona y androstendiona a través de la ruta llamada  $\Delta$  4 (68).

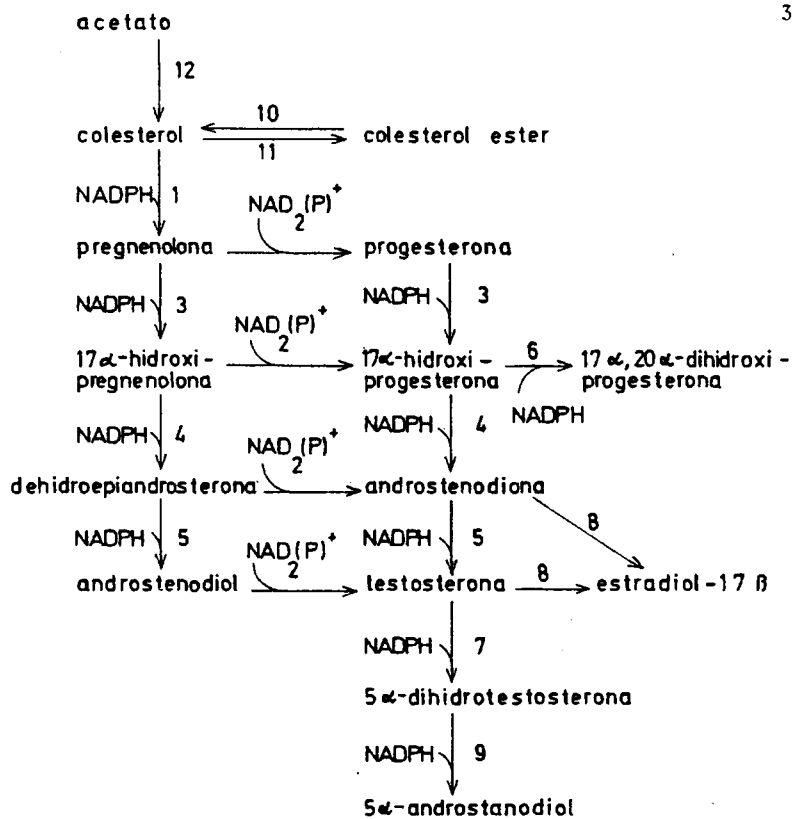
Por el contrario la vía  $\Delta$  5 a través de la 17  $\alpha$  hidroxipregnenolona y dehidroepiandrosterona parece ser el camino más importante para la formación de andrógenos en el testículo humano (69).

La secuencia enzimática y las contribuciones de las dos rutas biosintéticas  $\Delta$  4 o  $\Delta$  5 dependen de las diferentes especies, pero todos los pasos de la síntesis androgénica pueden estar estimulados por el tratamiento prolongado con LH o hCG. Sin embargo, tales efectos de las gonadotropinas son manifestaciones de la acción trófica de la LH en el testículo, y no están necesariamente relacionados con la regulación aguda de la secreción de esteroides por las células intersticiales.



-- POSIBLES LUGARES DE ACCION DE LA LH Ó hCG EN LA ESTEROIDOGENESIS DE LA CELULA DE LEYDIG.

Fig. 3



- Leyendas :
- 1 cadena enzimatica colesterol  $\rightarrow$  pregnenolona
  - 2 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
  - 3 17 $\alpha$ -hidroxilasa
  - 4 17 $\alpha, 20$ -liasa
  - 5 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
  - 6 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
  - 7 5 $\alpha$ -esteroide reductasa
  - 8 aromatasa
  - 9 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
  - 10 colesterol esterasa
  - 11 colesterol ester sintetasa
  - 12 sistema colesterol sintetasa

Fig. 4

## 2. REGULACION HORMONAL DE LA SINTESIS DE ANDROGENOS

Aunque los estudios "in vitro" demuestran claramente que la hormona luteinizante LH es la única hormona capaz de estimular la esteroidogénesis testicular en ausencia de otras hormonas, hay que hacer constar que bajo condiciones fisiológicas la regulación de la síntesis de andrógenos por el testículo depende de un complejo de hormonas entre las que cabe destacar a las hormonas pituitarias FSH, PRL y GH y algunos esteroides como  $E_2$  y T.

### A.- Influencia de la FSH

Disponemos en la actualidad de abundantes datos que hablan en favor de la influencia de la FSH en la acción de la LH sobre los niveles plasmáticos de testosterona y sobre el crecimiento de las glándulas reproductivas andrógeno-dependientes. Sin embargo, la interpretación de estos datos se ve complicada por el hecho de que una gran mayoría de las preparaciones de FSH disponibles están contaminadas en mayor o menor grado con pequeñas cantidades de LH.

La mayoría de los experimentos que se han llevado a cabo en este sentido han supuesto el tratamiento de ratas hipofisectomizadas con diversas dosis de FSH. - En unos casos el tratamiento con FSH produce un estímulo de la respuesta testicular a la LH "in vivo" (42) y en otros casos lo que se origina es un incremento en la cantidad de testosterona producida "in vitro", así como un aumento del número de receptores para la LH - (70).

Sin embargo si se tratan las preparaciones de FSH con anticuerpo anti-LH, para eliminar la LH contaminante, la estimulación de la cantidad de andrógenos producidos por las células de Leydig de animales pretratados con FSH se ve suprimida (71).

Esto y el hecho de que las células de Leydig no contengan receptores para FSH hacen cuestionable, para algunos autores, la importancia de esta hormona en el mantenimiento de la función esteroideogénica testicular.

Por el contrario, en recientes trabajos con ratas inmaduras hipofisectomizadas pretratadas con hormona -

FSH altamente purificada, se ha encontrado que la respuesta del testículo a la LH, evaluada determinando la cantidad de testosterona secretada a la circulación, se encuentra incrementada (72).

Los mismos resultados obtienen Chen y col. (73) donde no sólo la respuesta esteroidogénica a la LH se encuentra incrementada sino que ésta se acompaña de un aumento en el número de receptores para la LH.

No hay que olvidar tampoco que se ha postulado la existencia de mecanismos que controlan la regulación del número de receptores diferentes de aquellos que controlan la función esteroidogénica testicular (73).

Lo que si parece cierto, por todos los cambios que se apuntaban anteriormente, y puesto que existe en rata incremento del número de receptores de LH paralelo al aumento plasmático de los niveles de FSH entre los días 15 y 35, (74), es que la hormona FSH desempeña un papel importante en la formación de los receptores de LH durante la aparición de la pubertad.

#### B.- Influencia de la PRL

Se sabe que las células de Leydig poseen receptores de PRL (75 y 76) y existen diversos trabajos que apuntan hacia una estrecha relación entre las alteraciones de los niveles endógenos de PRL y la función testicular (77), aunque el mecanismo por el cual la PRL afecta la maquinaria esteroidogénica de las células de Leydig es desconocido hasta el momento.

Por una parte parece ser que la PRL ejerce sus acciones en el testículo a través de la inducción del número de receptores de LH, incrementando su número, puesto que la PRL actúa potenciando los efectos de la LH tanto sobre la espermatogénesis como sobre la síntesis y secreción de testosterona (78). Así, se ha comprobado que la PRL aumenta el número de receptores de LH en ratón dwarf (PRL deficiente) y en hamsters sometidos a períodos cortos de luz (79, 80 y 81).

Por otra parte según Purvis y col. (71) el tratamiento de ratas hipofisectomizadas con PRL no modifica,

con respecto a los animales control, la máxima respuesta esteroidogénica aunque en todos los casos ese tratamiento produce incremento en el número de receptores de LH.

Más recientemente se ha comprobado que la PRL actúa sinérgicamente con la LH para estimular "in vitro" la respuesta máxima esteroidogénica en testículos descapsulados de ratas hipofisectomizadas (82).

Otro posible mecanismo de acción de la PRL en el testículo nos lo sugiere el hecho de que el tratamiento de ratones normales y ratones PRL y GH deficientes con PRL, incrementa la concentración de colesterol esterificado en el testículo (83) y se sabe que los ésteres de colesterol constituyen el principal "pool" de precursores para la esteroidogénesis.

Es posible también que la PRL aún actúe en el testículo estimulando directamente las enzimas esteroidogénicas  $3\beta$  y  $17\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasas (85).

Además de estas posibles acciones directas de la PRL sobre las células de Leydig, probablemente sea, - esta hormona, capaz de afectar la esteroidogénesis de una manera indirecta, ya que se ha comprobado que en ratón dwarf (86) y ratas hembra inmaduras (87) pretratadas con PRL, los niveles periféricos de FSH se encuentran incrementados.

También es importante señalar que las acciones - de la PRL en el testículo podrían estar restringidas a un cierto período en el desarrollo puberal ya que - en ratas inmaduras los niveles plasmáticos de PRL aumentan entre los días 30 y 55 paralelamente a los incrementos de testosterona, al aumento del número de receptores de LH y a la mayor capacidad del testículo para responder a la LH en términos de producción de - testosterona (77, 88 y 89).

Es interesante hacer notar que cuando las células de Leydig se ven expuestas a elevadas concentraciones de prolactina como ocurre en ratas, por tumores productores de PRL (90) o en humanos en situaciones de hiper

prolactinemia (91), la función esteroidogénica se ve disminuída, aunque el mecanismo por el cuál este efecto negativo tiene lugar es todavía desconocido. Podiera ser que estos efectos estuvieran mediados por la adrenal. Se sabe que las adrenales contienen gran cantidad de receptores de PRL (92), que la hiperprolactinemia está asociada con una hipertrofia adrenal (93) y que los esteroides adrenales pueden inhibir la producción de testosterona por el testículo (94 y 95).

#### C.- Influencia de la hormona de crecimiento

Teniendo en cuenta la similitud estructural entre la GH y la PRL y el solapamiento de sus actividades biológicas podría esperarse que ambas hormonas tuvieran efectos comparables en la función testicular.

Se ha comprobado en ratón dwarf con deficiencia congénita de GH y PRL que la administración de cualquiera de las dos hormonas puede estimular la espermatogénesis (96) e inducir fertilidad. Así mismo en hamster con regresión testicular provocada por sometimiento de los

animales a períodos cortos de luz, el tratamiento con GH incrementa la unión de la LH a los preparados testiculares, así como los niveles plasmáticos de testosterona (97). Aunque son varios los investigadores que aceptan la influencia positiva de la GH en las células de Leydig, todavía no se sabe si es ésta una acción directa o si está mediada indirectamente por otros factores como la Somatomedina.

En recientes estudios (82) se ha comprobado que el tratamiento de ratas hipofisectomizadas con GH corrige la disminución de receptores de LH que normalmente tiene lugar tras la hipofisectomía. Parece pues que la hormona de crecimiento al igual que la PRL, lo que hace es regular el número de receptores de LH por célula de Leydig, aunque es posible que su acción sea por un mecanismo diferente al de la PRL, puesto que en esos mismos experimentos se ha visto que la GH a diferencia de la PRL, es incapaz de mantener el número de receptores de LH en ratas intactas o hipofisectomizadas que habían sido tratadas con diferentes dosis de LH.

Así como la PRL y la GH parecen ser necesarias para el mantenimiento de una concentración normal de receptores de LH en el testículo, la respuesta testicular a la LH medida en términos de producción de testosterona parece depender principalmente de la hormona luteinizante. Sin embargo, algunos autores han observado efectos positivos de la GH y no de la PRL en la respuesta testicular a la LH (82).

Es posible que estos efectos de la hormona de crecimiento sean de una mayor importancia fisiológica durante la pubertad puesto que en ratas inmaduras hipofisectomizadas la administración de GH potencia significativamente la respuesta testicular a la LH exógena (98).

En cualquier caso ya que hasta el momento no se ha demostrado la existencia de receptores específicos de GH en las células de Leydig el efecto directo de esta hormona sobre las células intersticiales sigue siendo mera especulación.

D.- Influencia de los Estrógenos y Andrógenos

La administración de esteroides gonadales tanto a hombres normales como en animales intactos provoca una disminución de la producción de andrógenos, atribuyéndose este efecto a la inhibición de la secreción de gonadotropinas con acciones secundarias sobre la función endocrina testicular (99, 100 y 101).

Mientras que éste es realmente el mecanismo que podría explicar la acción de andrógenos y estrógenos sobre la secreción de testosterona, la presencia de receptores de estradiol (102) y testosterona (103) en células intersticiales y el hecho de que los cambios plasmáticos de LH no se relacionen con la reducción de la producción de testosterona (104) son compatibles con la idea de que los estrógenos y andrógenos puedan ejercer una acción inhibitoria directa en la función de la célula de Leydig.

De hecho el tratamiento de ratas hipofisectomizadas con propionato de testosterona origina una reducción considerable de la cantidad máxima de andrógenos

producidos "in vitro" en respuesta a la hCG (105). Estos cambios no se acompañan de alteración alguna en el número de receptores de LH y parecen constituir un efecto crónico de los andrógenos sobre las enzimas esteroideogénicas.

Por otra parte con la administración crónica de estrógenos tanto a sujetos normales (106) como a ratas -- (107) se consigue disminuir los niveles de testosterona sin que ocurran cambios detectables en los niveles plasmáticos de LH. También el tratamiento "in vitro" de testículo de rata con estradiol da lugar a una reducción -- significativa de la acumulación de testosterona estimulada por la hCG (108).

Más recientemente Van Beurden y col. (109) han demostrado que el tratamiento de ratas hipofisectomizadas con estradiol, contrarresta el efecto estimulador de la FSH sobre la respuesta de las células de Leydig a la LH, efecto que se lleva a cabo a través de una inhibición -- directa de la actividad de la enzima  $17\alpha$  hidroxilasa -- resultando así una conversión reducida de pregnenolona a

esteroides  $C_{19}$  y una mayor producción de  $3\alpha$  hidrox- $5\alpha$  pregnan-20-ona.

En el mismo sentido se han realizado los estudios de Dufau y col. (110), confirmandose en ratas inmaduras hipofisectomizadas, la acción inhibitoria directa de los estrógenos sobre la función esteroidogénica de la célula de Leydig. El hecho de que no se detecten modificaciones en el AMPc producido por testículos de ratas tratadas con estrógenos mientras que la respuesta esteroidogénica en esos mismos tejidos se encuentra significativamente disminuída, apoya la idea de que la acción inhibitoria de los estrógenos en la célula de Leydig se ejerce en un estadio distante de la activación del receptor y de la formación del AMPc. y que como se apuntaba anteriormente esta acción se ejerce sobre enzimas específicas responsables de la biosíntesis de testosterona.

Aunque varios estudios han indicado que los estrógenos pueden ser sintetizados por las células de Leydig (111), las observaciones de Jong y col. (112) muestran

que el estradiol es sintetizado en los túbulos seminíferos y acumulado principalmente en el tejido intersticial.

También se ha comprobado que cultivos de células de Sertoli son capaces de aromatizar testosterona a estradiol en un proceso que es FSH dependiente (111).

Sin embargo, a pesar de las dudas existentes acerca de la contribución relativa de los dos compartimentos testiculares en la producción de estrógenos, lo que es un hecho evidente es que éstos desempeñan un papel importante en la regulación intratesticular de la función de la célula de Leydig.

#### OBJETO DE LA TESIS

La intervención del AMPc como segundo mensajero de la acción de la LH en la célula de Leydig, estaba ampliamente documentada (111, 113 y 115). Existían sin embargo dudas sobre la posibilidad de que algún otro mensajero participara de la acción intracelular de la LH puesto que se habían observado discrepancias entre la cantidad de LH necesaria para estimular la producción de testosterona y aquella que originaba un aumento significativo de la síntesis de AMPc (47 y 48).

El objetivo del presente estudio fué investigar la posibilidad de que otro nucleótido, el GMPc, fuera el responsable de la acción de la LH sobre la esteroidogénesis, cuando se utilizan concentraciones pequeñas de hormona gonadotropa para conseguir los estímulos en la producción de testosterona.

Ya se había propuesto para el GMPc una acción parecida en células aisladas de adrenales donde los niveles de corticosterona y AMPc producidos tras la estimulación con dosis bajas de ACTH, mostraban esa misma disociación (35).

La utilización de células de Leydig, obtenidas por tratamiento de testículos descepsulados con colagenasa y posterior purificación de las suspensiones celulares con Ficoll y Dextrano (116) nos proporcionaba el medio ideal, uniforme y específico, para el estudio de los procesos de la célula de Leydig que eran dependientes de la LH.

Las valoraciones del contenido celular de testosterona y AMPc se llevaron a cabo según las técnicas ya anteriormente descritas. Par la determinación del GMPc sintetizado por estas células, fué necesaria la estandarización del método de Radioinmunoensayo, con las modificaciones necesarias para detectar el bajo contenido celular.

Hemos querido también estudiar la influencia de la PRL sobre la secreción de testosterona estimulada por la LH. La importancia de esta influencia sobre la regulación de la función de las células de Leydig se desprende de observaciones varias. Por ejemplo el tratamiento de ratón PRL deficiente con PRL restaura la fertilidad en estos

animales (117), la administración de inhibidores de la secreción de PRL a ratón macho hace disminuir los niveles plasmáticos de testosterona (78) y en hombres normales se ha comprobado que las elevaciones periféricas de testosterona durante el sueño, se acompañan de las correspondientes elevaciones plasmáticas de la PRL -- (118).

Puesto que es posible que la hipotética acción directa de la PRL sobre la síntesis de testosterona por el compartimento intersticial esté limitada a un cierto período del desarrollo sexual, hemos estudiado además el efecto de la PRL sobre la producción de testosterona en ratas inmaduras. Se sabe que en ratas jóvenes los niveles de PRL aumentan considerablemente entre los días 30 y 55 de edad (77) aumentos que se acompañan de incrementos del número de receptores de LH y de la concentración plasmática de testosterona (74).

En ambos casos se han determinado la testosterona y el AMPc producidos por las células (con o sin PRL) tras dos horas de incubación en presencia de LH.

MATERIAL Y METODOS

## 1. MATERIALES

- Las hormonas oLH (NIH-LH-S20; 1.19 IU/mg) y bPRL - (NIH-P-B5; 32.2 IU/mg) han sido donadas por National Institutes of Health, Bethesda, Md, (U.S.A.).
- Los nucleótidos  $^3\text{H}$ -AMPc,  $^3\text{H}$ -GMPc y  $^3\text{H}$ -Testosterona con actividades específicas 26, 27 y 26 Ci/mmol respectivamente se obtuvieron de Radiochemical Centre. Amersham.
- La resina cambiadora de iones Dowex (200-400 mesh), y el inhibidor de la fosfodiesterasa, Mix (3 isobutil - 1 metil xantina) procedían de Serva. (Alemania).
- La colagenasa era de Worthington (U.S.A.).
- El inhibidor de Tripsina (lima bean, tipo II), la Albúmina bovina (BSA, fracción V), los nucleótidos AMPc y GMPc y la testosterona, se obtuvieron de Sigma (U.S.A.).
- El Ficoll 400 se obtuvo de Farmacia (Suecia).

## 2. APARATOS

- Incubador-Agitador (LAB-Line/Dubnoff) de velocidad y temperatura graduables con doble entrada para gases.

- Microscopio (CARL-ZEISS) Laboval 2.
- Sonicator cell Disruptor, W 185-F<sub>2</sub> (Heat Systems Ultrasonics) de frecuencia 20 KHZ.
- Guillotina.
- Contador de centelleo líquido, Packard Mod. 3255
- Contador de radioactividad  $\gamma$ , Packard Mod. 5210
- Centrifuga refrigerada, Sorvall RC5

### 3. MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO

#### 3.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar adultas de 8 a 10 semanas con pesos comprendidos entre 300 y 340 gramos y ratas púberes de 6 a 7 semanas con pesos que variaron entre los 200 y 400 gramos. Los animales permanecieron bajo condiciones controladas de luz (14 horas luz y 10 oscuridad) y temperatura (20-22°C) con acceso libre a una dieta normal estandar.

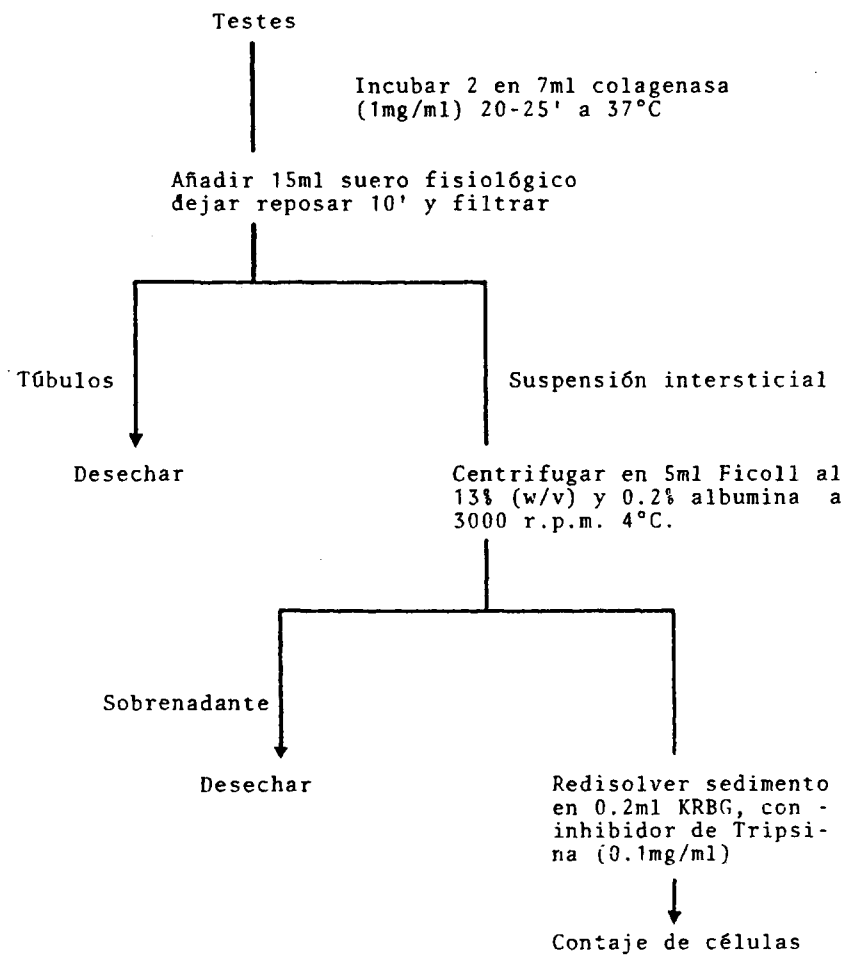
#### 3.2 Obtención de células intersticiales

Las ratas fueron decapitadas siempre entre las 10 y

12 de la mañana y los testículos extraídos y descapsulados de su túnica albugínea. Los testículos se incubaron de dos en dos con 7 ml de colagenasa (1mg/ml) según el método descrito por Janszen y col. (116). Después de la centrifugación de las células en una solución de Ficoll al 13% (w/v) y 0.2% de albúmina para incrementar el porcentaje de células de Leydig, el sedimento se resolvió en buffer KRBG pH 7.4, conteniendo 0.1mg/ml de inhibidor de tripsina. (Véase Tabla 1).

La densidad de la suspensión celular se determinó contando las células nucleadas en un hematocrito, utilizando en algunos casos como marcador de las células métodos histoquímicos para la demostración de la existencia de la enzima  $3\beta$ hidroxisteroide deshidrogenasa (119 y 120).

T A B L A 1



### 3.3 Incubaciones y extracción de AMPc, GMPc y Testosterona

Una vez obtenida la suspensión celular, las incubaciones ( $1.10^6$ - $3.10^6$  células nucleadas/ml) tienen lugar en un volumen total de 0.25 ml, por un período de dos horas, a 32°C, en atmósfera de  $O_2:CO_2$  (95:5%v/v) y agitando a una velocidad de 76 ciclos/minuto. La adición de la hormona se realiza en buffer KRBG, en presencia de -- MIX (3 isobutil-1 metilxantina) 0.5mM., un inhibidor de la fosfodiesterasa, enzima que degrada los nucleótidos cíclicos. La reacción se paró colocando los tubos en -- hielo y las células fueron así homogeneizadas por sonicación durante 5" a 20 KHz con una amplitud de 5um, después de la adición de  $^3H$ -AMPc,  $^3H$ -GMPc y  $^3H$ -Testosterona -- (+ 20.000 dpm) para controlar las posibles pérdidas por el proceso de extracción.

Las proteínas se precipitaron con acetona y después de la extracción de la testosterona con éter, el residuo acuoso se cromatografió en una columna cambiadora de -- iones para separar el AMPc del GMPc.

### 3.4 Cromatografía en resina cambiadora de iones

Como resina cambiadora se utiliza Dowex II<sup>+</sup> form - (200-400 mesh). Las columnas, de 2.5 cm de altura, se preparan en pipetas Pasteur empleando una para cada tubo de incubación y pasando 3 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada antes de proceder a la cromatografía (121).

A las muestras se les precipita las proteínas con acetona (2 ml x 3) y después de secar en corriente de N<sub>2</sub> a 45°C el extracto acuoso se extrae con eter (2 x 3 ml) llevándose más tarde hasta 1 ml con H<sub>2</sub>O bidestilada.

La elución de la muestra (1 ml) se hace en el mismo medio, desechando el primer ml. La porción que contiene GMPc aparece en los 0.9 siguientes, siendo los 3 ml posteriores los que contienen el AMPc.

## 4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMPc GMPc Y TESTOSTERONA

### 4.1 DETERMINACIÓN DE AMPc

Las determinaciones de AMPc se hicieron mediante - competición del nucleótido marcado y no marcado por una proteína dependiente de AMPc "Competitive Binding Assay".

#### 4.1.1 Obtención de la proteína receptora y titulación

Para la obtención de la proteína se ha seguido esencialmente el método descrito por Brown y col. (122). El tejido, adrenales bovinas, (56.5 g), se homogeniza en -- tampón TRIS 50 mM pH 7.4, conteniendo 0.25M de Sacarosa, 25mM de KCl y 5 mM de Mg Cl<sub>2</sub>, en una proporción de 1.5 - peso/volumen. El extracto resultante, después de centrifugar a 5000g durante 15 minutos a 4°C se guarda en porciones de 0,5 ml a - 20°C.

La titulación de proteínas, se lleva a cabo añadiendo diferentes diluciones de proteína (1/4, 1/8, 1/16, -- 1/32 y 1/64), a una misma cantidad de <sup>3</sup>H-AMPc (± 0.5 pm). El volumen final de incubación y el tiempo son los utilizados en el ensayo de saturación.

#### 4.1.2 Método de saturación

El método utilizado está esquematizado en la Tabla N°. 2.

T A B L A 2PROCEDIMIENTO PARA EL ENSAYO DE SATURACION DE AMPc

- 
- La curva estandar abarca desde 156 a 2.500 pg/tubo
  - Muestras a analizar en 150 ul
  - Añadir 50 ul de la solución de  $^3\text{H}$ -AMPc ( $\pm$  9000 cpm)
  - Añadir 100 ul de la proteína dependiente de AMPc. Dilución 1/30
  - Completar volúmen hasta 300 ul con buffer TRIS-HCl pH 7.5
  - Incubar durante 90 minutos a 4°C
  - Añadir 100 ul de una suspensión de carbón animal (1g/10ml) con albúmina al 2%
  - Incubar durante 10 minutos a 4°C
  - Centrifugar por espacio de 15 minutos a 3000 rpm a 4°C
  - Contar 100 ul del sobrenadante para determinar la fracción unida a la proteína
-

#### 4.1.3 Preparación de las muestras

El eluato que contiene el AMPc se lleva hasta un volumen de 5 ml con etanol y de ahí se toman 500  $\mu$ l para determinar la recuperación. Los volúmenes a ensayar dependen de la cantidad que se espera encontrar. Se toman normalmente entre 2 y 1 ml para las muestras con bajo contenido de AMPc y de 0.5 a 0.25 ml para aquellas cuya concentración es mayor.

Se secan a 45°C en corriente de  $N_2$  y el extracto se redisuelve en 150  $\mu$ l de buffer TRIS-HCl para ensayar.

#### 4.2 DETERMINACION DE GMPc

Las valoraciones de GMPc se han llevado a cabo con el método de Radioinmunoensayo. El anticuerpo empleado (anti-GMPc) se ha obtenido en conejo por la inyección de Succinil-GMPc conjugado con albúmina humana (123).

Con el fin de incrementar la sensibilidad del ensayo se ha introducido la modificación de Harper y col. (124), acetilando las muestras y estándares para poder detectar

las pequeñas cantidades de este nucleótido presentes en las células.

#### 4.2.1 Acetilación de las muestras

La acetilación se hace directamente sobre el eluato de la columna que contiene GMPc, añadiendo a temperatura ambiente 20 ul de trietilamina e inmediatamente 10 ul de anhídrido acético. La mezcla, después de agitar durante 20", se seca en corriente de N<sub>2</sub> a 50°C y el extracto seco se redisuelve en 300 ul de buffer acetato 50 mM pH 6.2, e inmediatamente se determina el contenido de GMPc. Todos los tubos de la curva estandar se acetilan en las mismas condiciones.

#### 4.2.2 Método de Radioinmuncensayo

El método que está esquematizado en la Tabla N° 3, es básicamente el mismo que se describe en el Kit comercial, sólo que nosotros hemos introducido una modificación para separar las fracciones libre y ligada. En lugar de 2° anticuerpo se ha utilizado una suspensión de carbón animal a la concentración señalada.

T A B L A 3PROCEDIMIENTO PARA EL RADIOINMUNOENSAYO DE GMPC

- 
- La curva estandar abarca desde 10 a 1000 fentomoles/tubo
  - Acetilar muestras y estandars a 25°C
  - Añadir 100 ul de  $^{125}\text{I}$ -ScGMP-TME ( $\pm$  12000cpm)
  - Añadir 100 ul de anti-GMPC (Dilución 1/100000) conteniendo BSA (10-30 mg/ml)
  - Completar volúmen hasta 500 ul con buffer acetato 50 mM pH 6.2
  - Incubar la mezcla durante 18-20 horas a 4°C
  - Separar las fracciones libre y ligada por la adición de 100 ul de una suspensión de carbón animal en buffer acetato (2mg/ml) y 2.5 mg/ml de albúmina
  - Incubar durante 15 minutos a 4°C
  - Centrifugar a 3500 rpm a 4°C durante 10 minutos
  - Contar 1 ml del sobrenadante para determinar la radioactividad unida al anticuerpo
-

#### 4.3 DETERMINACION DE TESTOSTERONA

Para las determinaciones de testosterona por RIA - (125) se ha utilizado el anticuerpo producido en conejos por la testosterona 3-(0-carboximetil)-oxima conjugada - con albúmina sérica bovina según la reacción de condensación de Erlanger y col. (126).

##### 4.3.1 Extracción de las muestras

Las muestras procedentes del homogeneizado celular, se extraen con éter (3x2 ml), secando inmediatamente en corriente de  $N_2$  a 32°C la fase etérea. El extracto seco se redisuelve en 1 ml de etanol, tomando 0.5 ml para control de la recuperación. Para el ensayo se utilizan diferentes volúmenes que varían desde 200  $\mu$ l para las muestras con menor contenido de testosterona hasta 10 y 20  $\mu$ l para aquellas en las que se espera una mayor concentración. Se seca nuevamente en corriente de  $N_2$  y se redisuelve en 250  $\mu$ l de buffer borato para ensayar.

##### 4.3.2 Método de Radioinmunoensayo

El procedimiento de Radioinmunoensayo está esquematizado en la Tabla N° 4.

T A B L A 4PROCEDIMIENTO PARA EL RADIOINMUNOENSAYO DE TESTOSTERONA

- 
- Añadir 20.000 dpm de  $^3\text{H}$ -Testosterona/20 ul a todos los tubos
  - Preparar curva estandar con 0, 50, 100, 150, 250 y 500 pg de Testosterona en duplicado
  - Añadir 250 ul de anticuerpo (dilución 1/2000 en - buffer borato 0.05 M pH 8) conteniendo 0.06% BSA y 0.05%  $\gamma$ -Globulin
  - Incubar durante 16 horas a 4°C
  - Separar las fracciones libre y ligada por la adición de 500 ul de una suspensión de carbón animal (250 mg/100ml en buffer borato) con Dextrano T 250 (25mg/100ml)
  - Incubar durante 10 minutos a 4°C
  - Centrifugar por espacio de 10 minutos a 3000 rpm y contar 500 ul del sobrenadante en contador de - centelleo
-

5. INCUBACIONES EN PRESENCIA DE LH Y DETERMINACION DE  
AMPC GMPc Y TESTOSTERONA

Las células obtenidas por dispersión en colagenasa se preincuban durante 2 horas a 32°C en atmosfera de O<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub> (95/5% v/v) con agitación de 75 ciclos/minuto.

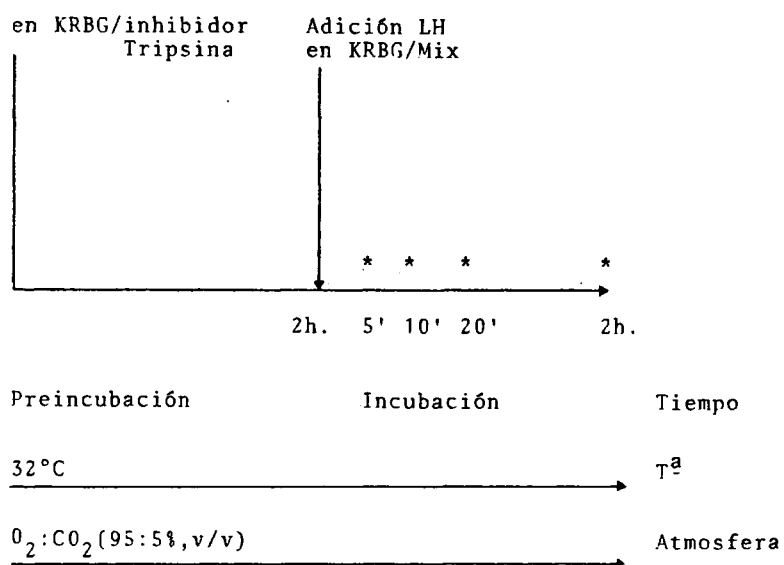
Las incubaciones, en presencia de LH ovina, con -- cantidades comprendidas entre 0.1, 1, 10, 100 y 1000 ng/ml son por períodos de tiempo variables (5,10,20 minutos y dos horas).

Tras la incubación la reacción se para en hielo y se determinan el AMPC, GMPc y la testosterona producidos en las diferentes condiciones. El primero de ellos se determina por "Protein Binding", expresando los resultados en pm/10<sup>6</sup> cel. Las evaluaciones de GMPc y testosterona se hacen por RIA y los resultados se dan en fentomol/10<sup>6</sup> y ng/10<sup>6</sup> células respectivamente. (Véase Tabla N° 5).

T A B L A 5

\* Se detiene la reacción y después de la extracción se determina la producción de AMPc, GMPc y T.

$0.4-0.8 \times 10^6$  cel/tubo



6. INCUBACIONES EN PRESENCIA DE PRL Y LH Y DETERMINACION DE AMPc Y TESTOSTERONA

Las células se preincubaban durante dos horas con diferentes dosis (60 y 600 ng/tubo) de bPRL e inmediatamente se incubaban por un período de otras dos horas en presencia de 0.5, 10 y 100 ngLH/ml, siempre a 32°C y en atmósfera de O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>.

Al final del período de incubación se analizan el AMPc y la testosterona producidos como se ha descrito anteriormente y expresando los resultados en pm/10<sup>6</sup> y ng/10<sup>6</sup> células respectivamente. (Véase Tabla N° 6).

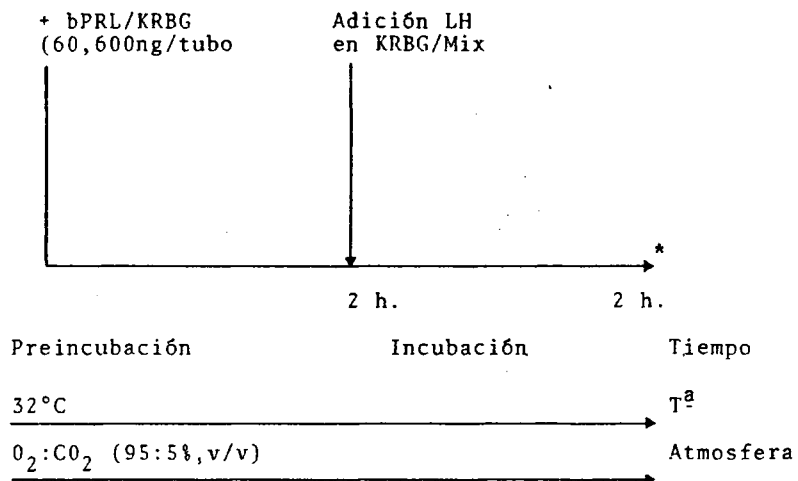
7. ESTUDIO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

En todos los experimentos fué realizado el estudio estadístico de los grupos "control" frente a los grupos "tratados" aplicando el test de la "t" de student y observando la significación estadística mediante el cálculo de "p".

T A B L A 6

\* Se detiene la reacción y después de la extracción se determina la producción de AMPc y T.

$0.4-0.8 \times 10^6$  cel/tubo



RESULTADOS

1. DETERMINACION DE AMPc POR "PROTEIN BINDING"

Los métodos más extendidos en la valoración de AMPc se basan en la competición del nucleótido marcado y el no marcado por anticuerpos específicos o proteínas receptoras. En corteza de adrenales bovinas y otros tejidos, existen proteínas de una gran afinidad por el AMPc. Por la facilidad de su preparación es por lo que se han elegido las adrenales como la fuente de obtención de una proteína que nos ha servido para la determinación de AMPc tanto en extractos celulares como en plasma y orina.

El desarrollo de este tipo de ensayos competitivos, supone primeramente un estudio de la dilución idonea del agente ligante (anticuerpo o proteína) para pasar más adelante a la comprobación de que el ensayo reúne características mínimas como buena sensibilidad (detección de pequeñas cantidades de muestra problema) y precisión (con variaciones intra e interensayo aceptables) así como una elevada especificidad (no interferencia en compuestos similares) y constante de asociación en los límites deseados.

Todo ello ha sido verificado para nuestro ensayo - de AMPc.

### 1.1 Titulación de Proteínas

La titulación de proteínas se ha llevado a cabo como se ha descrito en el capítulo anterior escogiendo diluciones que varían desde 1/4 hasta 1/64 (Fig. 5).

La mayoría de las determinaciones se han realizado con la proteína P3 de la que podemos observar (Fig. 6) -- que se han hecho diferentes curvas estandar con tres de las diluciones señaladas.

### 1.2 Evaluación de la curva estandar: precisión, sensibilidad, constante de asociación y especificidad.

#### a) Precisión

En la Fig. 7A están representados los perfiles de precisión de las curvas estandar con diluciones 1/15 y 1/30.- Con la dilución 1/30 vemos que se alcanzan C.V. menores de un 12% a todo lo largo de la curva estandar, especialmente en la zona comprendida entre 256 y 625 pg/tubo donde tiene

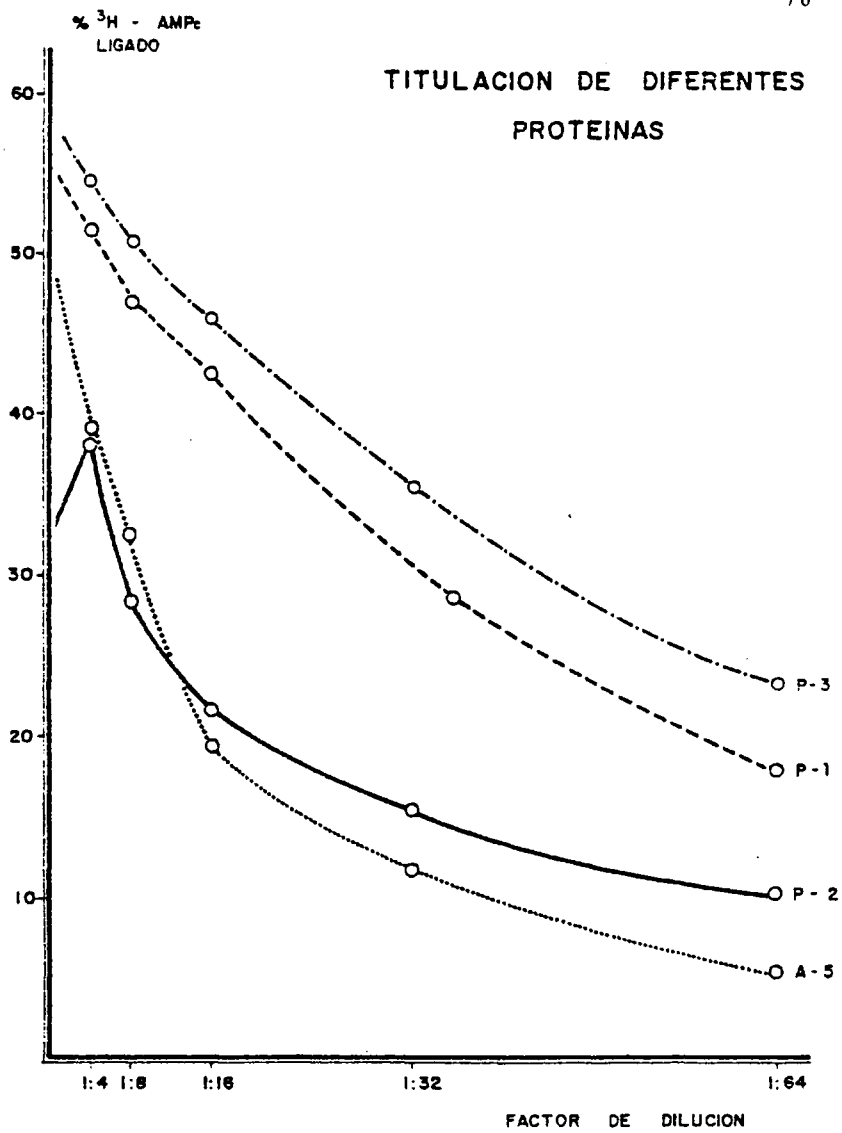


Fig. 5.- Curva de titulación de proteínas. El porcentaje de  $^3\text{H}$ -AMPc ligado a la proteína se calcula dividiendo las c.p.m. unidas a la proteína por las c.p.m. totales.

% B/T

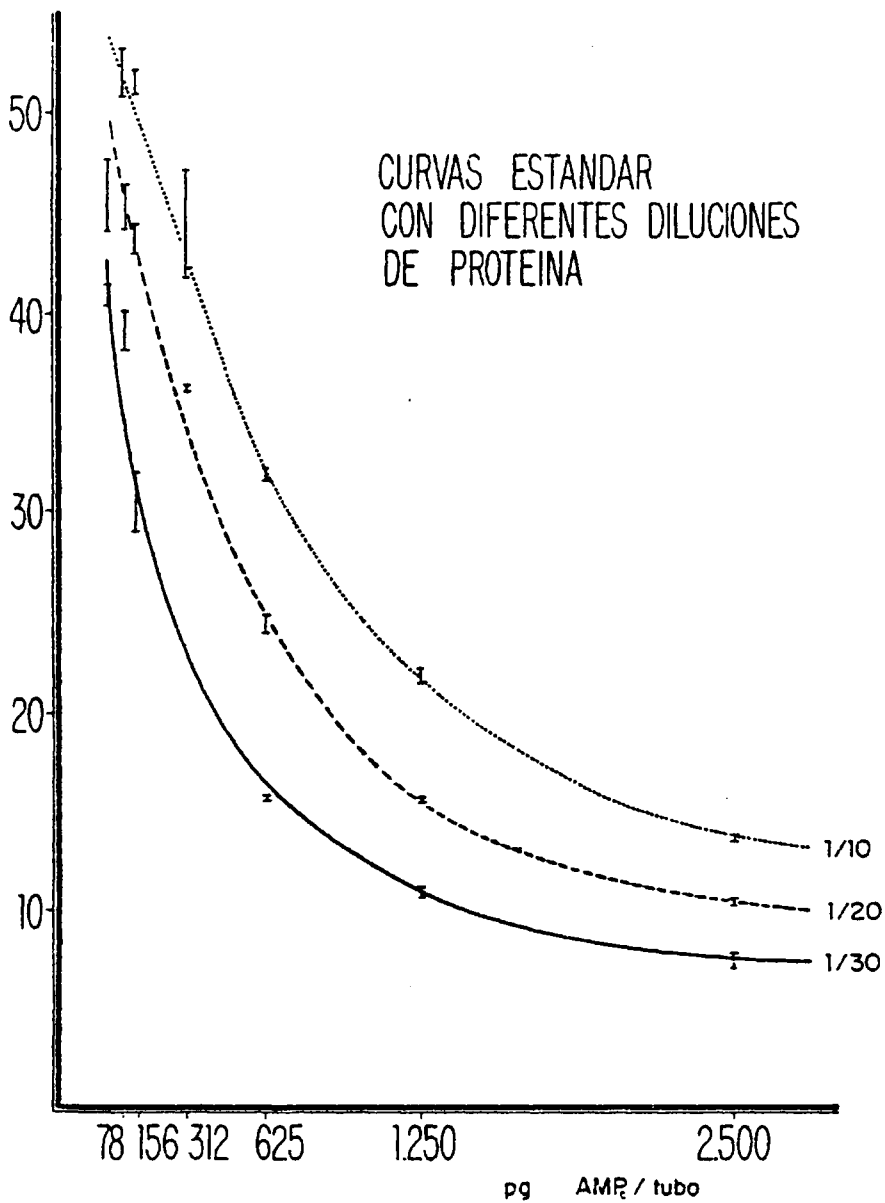


Fig. 6.- Curvas estandar con 100 ul de proteina a diluciones 1/10, 1/20 y 1/30. El cociente B/T se calcula dividiendo la radioactividad unida a la proteina por las c.p.m. totales.

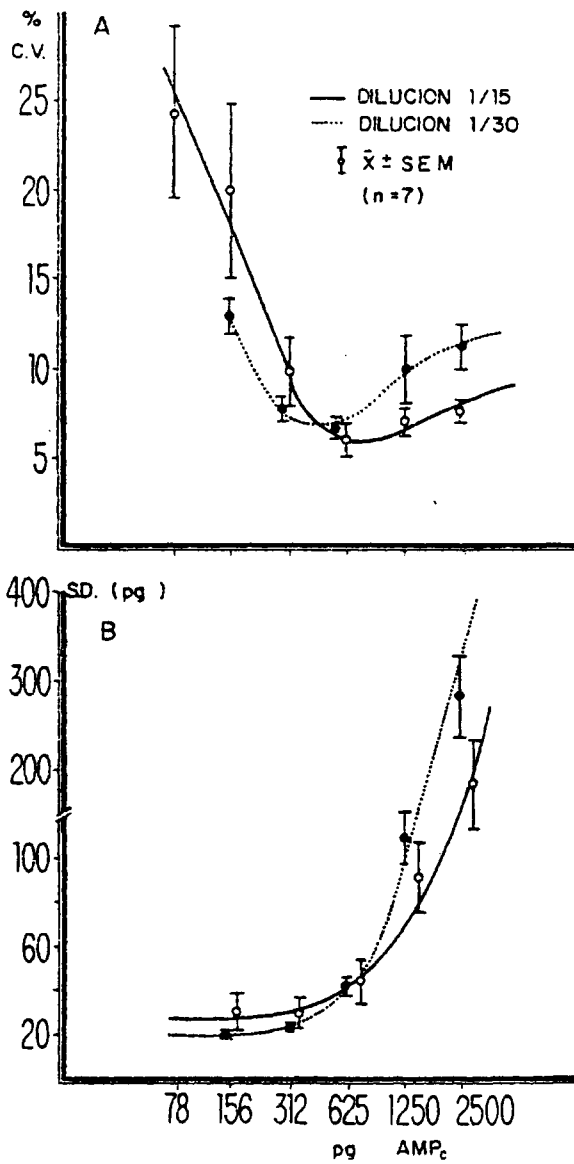


Fig. 7.- Perfil de precisión de la curva estandar. Estan representados los coeficientes de variación (A) y las correspondientes S.D. (B) para cada una de las dosis de la curva estandar.

lugar la mayoría de las lecturas de nuestras muestras - problema, por lo que ha sido la dilución escogida para todos nuestros ensayos.

b) Sensibilidad y constante de asociación

La sensibilidad (dos desviaciones estandar respecto del nivel cero de la curva de calibración) es también ligeramente mayor con la dilución 1/30 (Fig. 7B). La sensibilidad alcanzada es 0.25 pm.

Para esta dilución la determinación de la constante de asociación según el método de Scatchard y col. (127 y 128) ha dado  $0.5 \times 10^9$  litros/Mol, siendo la concentración de proteína receptora  $q=1,1 \times 10^{-9}$  Mol/litro (Fig. 8).

La Fig. 9 muestra una media de 8 curvas estandar de todas las realizadas en el período de dos años consecutivos en las condiciones descritas en la sección de métodos. El tiempo de contaje de las muestras es de 5 minutos con una actividad total de AMPc tritiado de  $\pm 9000$  c.p.m.

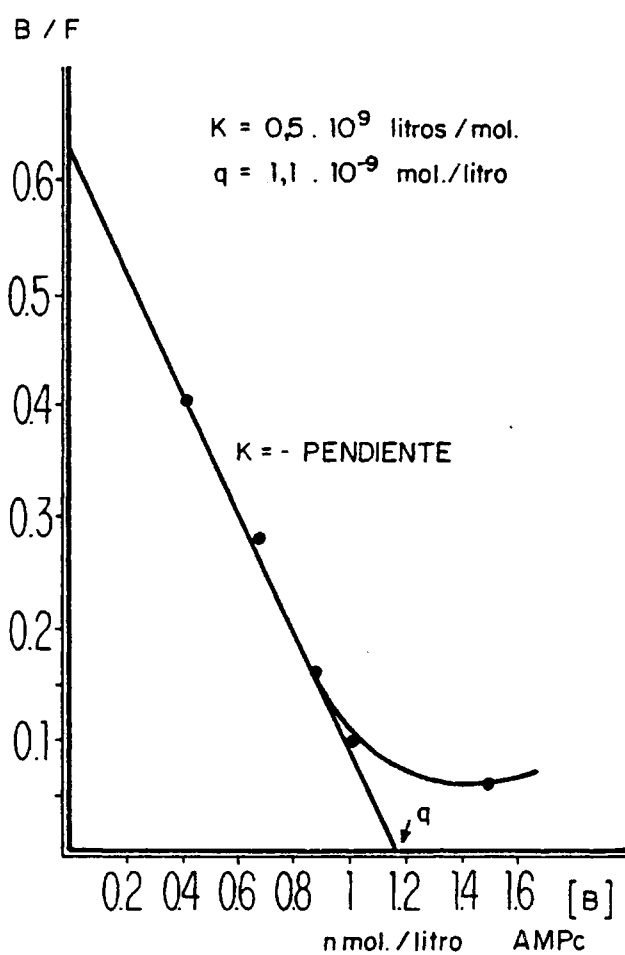


Fig. 8.- Representación Scatchard de una curva estandar. B es la porción de AMPc unido a la proteína y F la porción libre. La pendiente nos proporciona la constante de afinidad de la proteína y el -- corte con el eje de las X la concentración total de los lugares de unión.

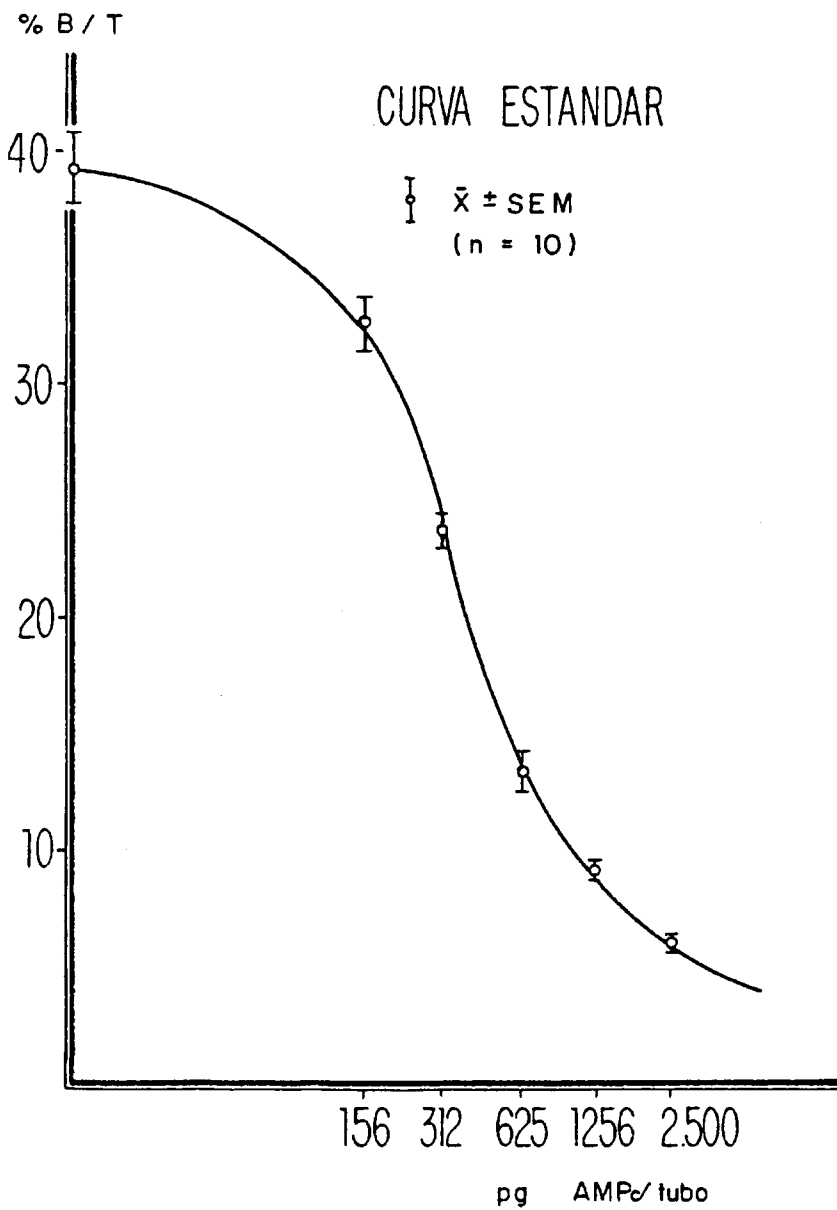


Fig. 9.- Curva estandar típica de AMPc. Los resultados son la media de 10 curvas  $\pm$  S.E.M.

En esas condiciones el cociente B/T máximo (porcentaje de  $^3\text{H}$ -AMPc unido a la proteína en ausencia de AMPc estandar) es un  $39.2 \pm 1.6\%$ , actividad que se va perdiendo paulatinamente en el período de almacenaje de la proteína receptora (dos años) al mismo tiempo que se observa (Fig. 10) un empeoramiento de los perfiles de precisión de la curva estandar.

c) Especificidad

En cuanto a la especificidad, puesto que se sabe de la existencia de GMPc tanto en células de Leydig como en las muestras biológicas para las que se ha utilizado el ensayo (sangre y orina) se han hecho reacciones cruzadas GMPc- proteína AMPc dependiente. Como se deduce de la Fig. 11 se necesita aproximadamente una cantidad de GMPc 150 veces mayor que la de AMPc para producir una reducción equivalente en la unión de AMPc tritiado, lo que excluye una reacción cruzada entre ambos nucleótidos.

1.3 Técnica de saturación

Para la separación de las fracciones libre y ligada, se utiliza una suspensión de carbón animal, adsorbente de

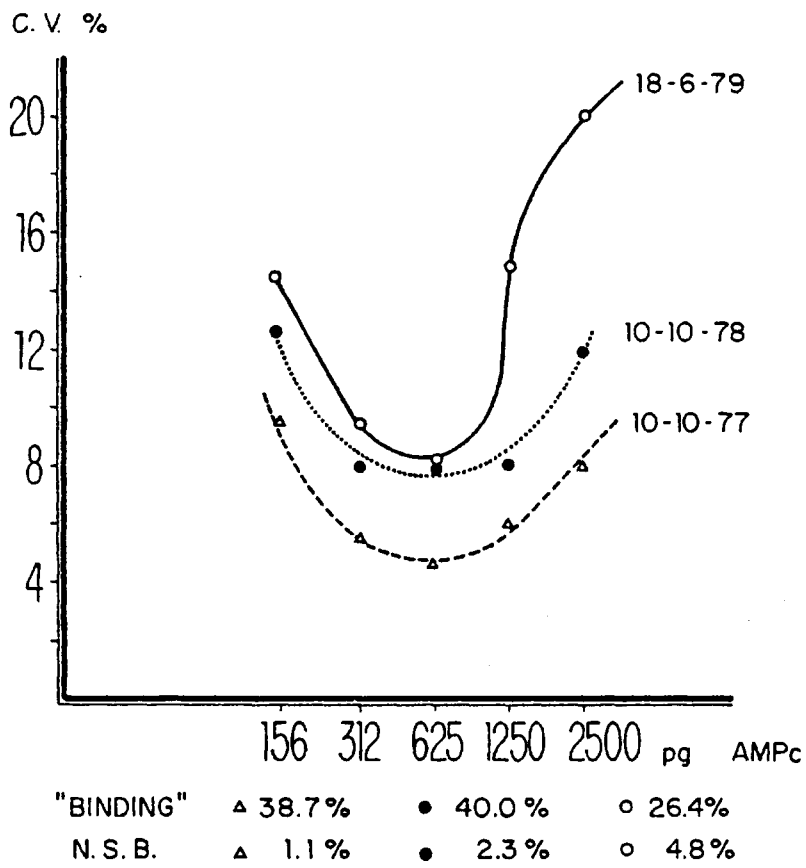


Fig. 10.- Perfil de precisión de 3 curvas estandar realizadas a diferentes tiempos después de la obtención de la proteína (20-5-1976). "Binding" es el porcentaje del cociente B/T.

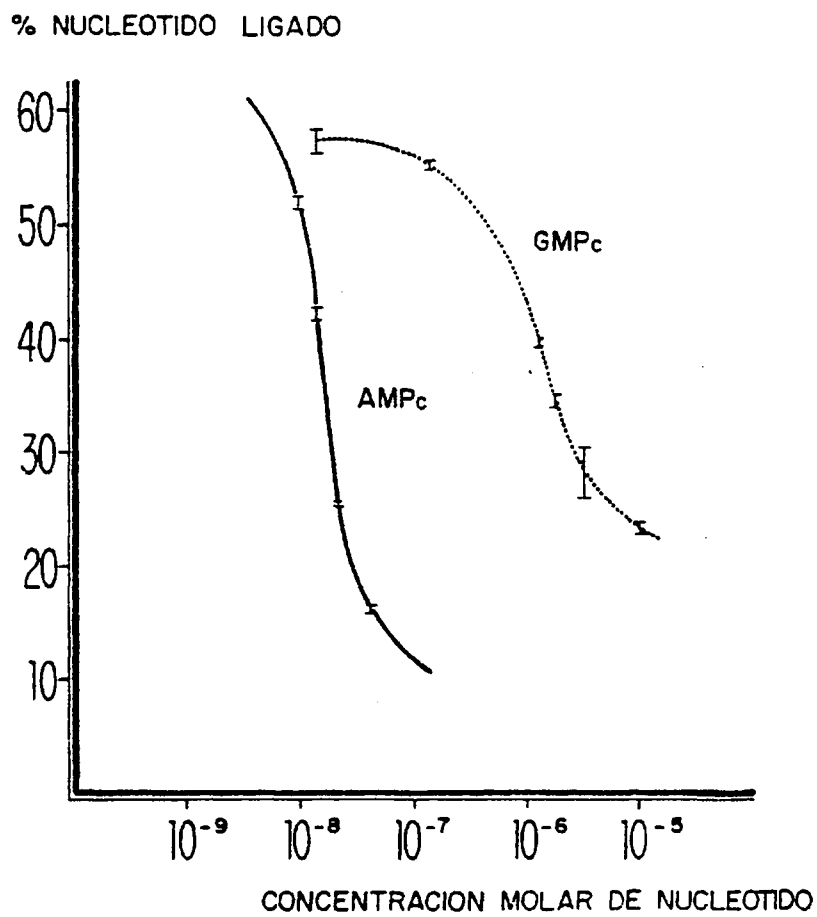


Fig. 11.- Reacción cruzada del GMPc con el AMPc. Se han utilizado 50 ul de nucleótido y las condiciones del ensayo son las descritas en la sección de métodos.

fácil uso, que proporciona a la concentración empleada una adsorción de aproximadamente un 98% de la porción libre. La radioactividad inespecífica (radioactividad en el sobrenadante de los tubos que contienen  $^3\text{H}$ -AMPc, buffer y carbón animal) no ha sido superior en ningún caso al 5%.

El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre  $^3\text{H}$ -AMPc y la proteína comienza a los 10' y perdura hasta los 90', como estaba descrito, por lo que ese ha sido el tiempo escogido en todas nuestras experiencias (Fig. 12).

#### 1.4 Precisión del ensayo

La reproducibilidad interensayo y precisión nos viene dada en las Tablas 7 y 8, donde se esquematizan los C.V. de dos diferentes muestras analizadas en varios ensayos consecutivos y en la Fig. 13 están representados los valores, obtenidos para un "pool" utilizado como estándar interno en 15 ensayos realizados a lo largo de dos años.

T A B L A N° . 7

SENSIBILIDAD, REPRODUCIBILIDAD INTRA-ENSAYO Y  
PRECISION

DOSIS PG AMPc	% UNION	COEFICIENTE VARIACION %
0	54.7 ± 1.01	1.85 *
78	51.8 ± 1.49	2.87
156	46.4 ± 1.03	2.21
312	36.5 ± 1.90	5.20
625	24.6 ± 0.87	3.56
1250	15.8 ± 0.78	4.93
2500	11.0 ± 0.61	5.54

LOS ENSAYOS SE REALIZARON COMO SE DESCRIBE EN EL TEXTO. LAS MUESTRAS SE CONTARON DURANTE 5 MINUTOS. LOS RESULTADOS EXPRESAN MEDIA ± DS (N=8) (N=6) \*

T A B L A N ° . 8

REPRODUCIBILIDAD INTER-ENSAYO Y PRECISION

ORINA		PLASMA	
PM AMP/50 µL MUESTRA		PG AMPc / 100 µL	
DOSIS	COEF. VAR.	DOSIS	COEF. VAR.
375 ± 36,4*	9.6 %	395 ± 45,5*	11.5 %
688 ± 53,4**	7.7 %	256 ± 38,2*	11.9 %
344 ± 34,2***	9.9 %		

\* ORINA ENSAYADA EN 4 OCASIONES DISTINTAS; DILUCION 1/50

\*\* ORINA ENSAYADA EN 3 OCASIONES DISTINTAS

←\*\* DILUCION 1/100

←\*\*\* DILUCION 1/200

• PLASMA ENSAYADO EN 3 OCASIONES DISTINTAS

TIEMPO REQUERIDO PARA EL  
EQUILIBRIO ENTRE AMPc LI-  
GADO Y AMPc LIBRE.

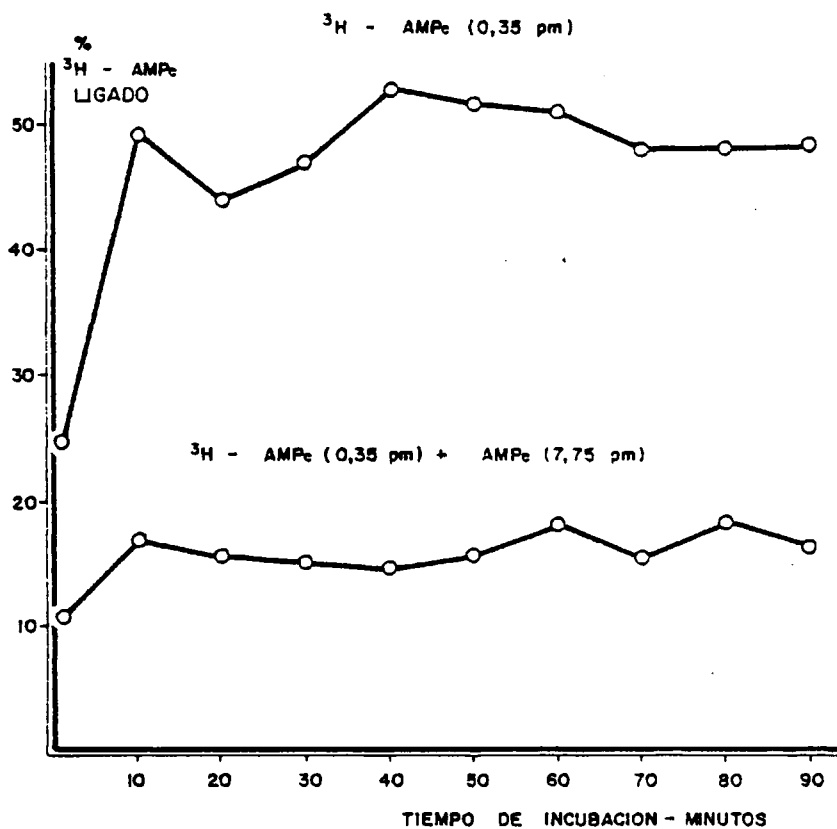


Fig. 12.- Tiempo de equilibrio entre la porción libre y ligada de AMPc añadido. En la parte superior sólo había AMPc tritiado y en la inferior además de éste se añadió AMPc no marcado.

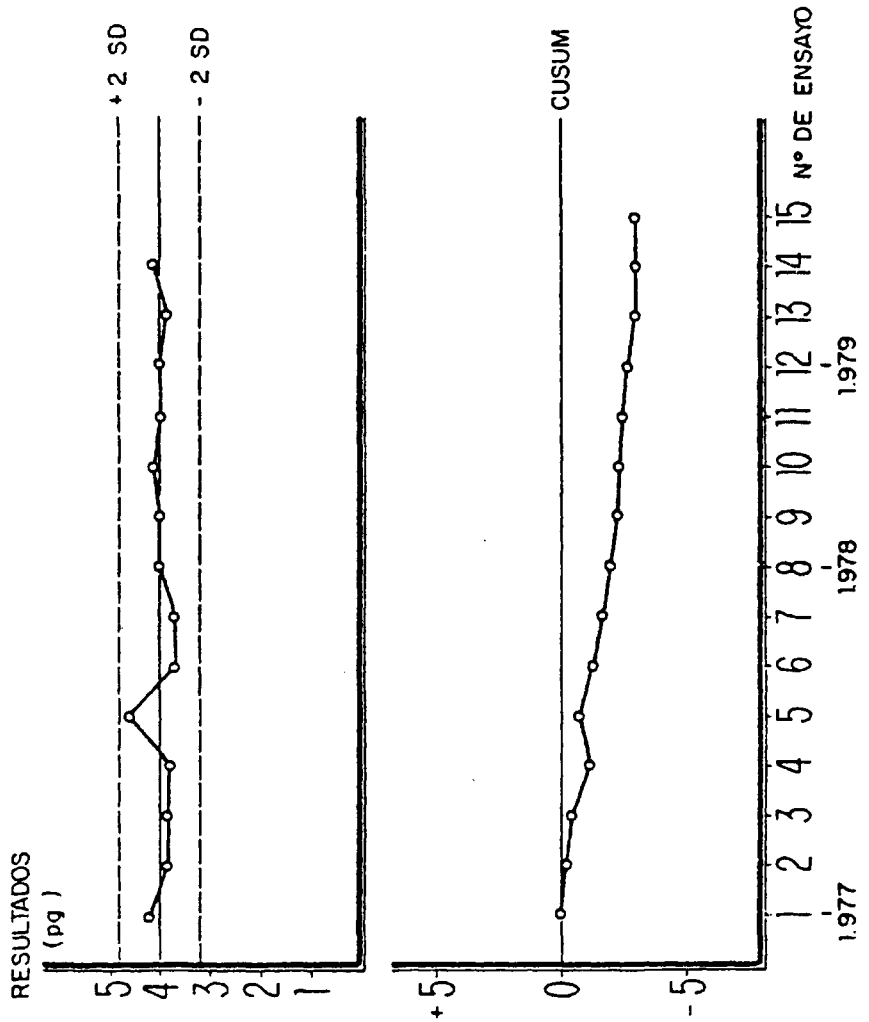


Fig. 13.- Control de calidad interensayo. La parte superior indica los valores obtenidos para un mismo "pool" a lo largo de dos años. La inferior representa -- los mismos valores en forma de sumas acumulativas (cusum).

Como se muestra más de la fiabilidad del método se han hecho curvas de dilución, en este caso de orina -- (Fig. 14), donde se observa la perfecta correlación --  $r=0.999$  entre el de muestra a valorar y cantidades de -- AMPc encontradas en esos volúmenes.

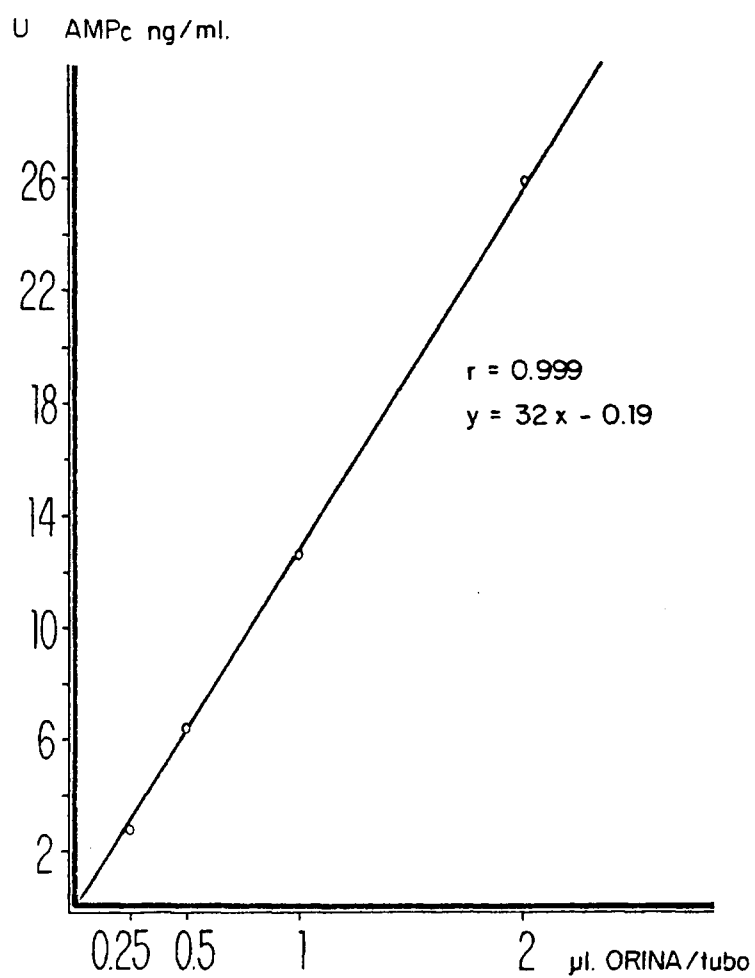


Fig. 14.- Concentración de AMPc en diferentes volúmenes de orina.

## 2. DETERMINACION DE GMPc POR RADIOINMUNOENSAYO

Existe también para este nucleótido su correspondiente método de valoración utilizando proteínas específicas dependientes de GMPc (121 y 129). En concreto la proteína utilizada por nosotros para desarrollar el ensayo competitivo entre el  $^3\text{H}$ -GMPc y el nucleótido no marcado, se obtuvo de cola de langosta, 208.55 gramos, que se homogeneizaron en 4mM EDTA. Después de centrifugar a 27.000 g. y dializar durante toda la noche el sobrenadante, éste se cromatografió en columna de DEAE- celulosa.

La porción dependiente de GMPc, con una cantidad de proteína de 20.5 mg/ml, se guardó a  $-70^\circ\text{C}$  y con ella se hicieron las primeras curvas estándar (Fig. 15). Puesto -- que la sensibilidad del ensayo alcanzaba solamente 0.5 pm, lo cuál no era suficiente para determinar la pequeña cantidad de GMPc existente en las células, se optó por el método de radioinmunoensayo.

La dilución del anticuerpo utilizada ha sido, como se especifica en el Kit comercial 1/10.000. Para esta dilu-

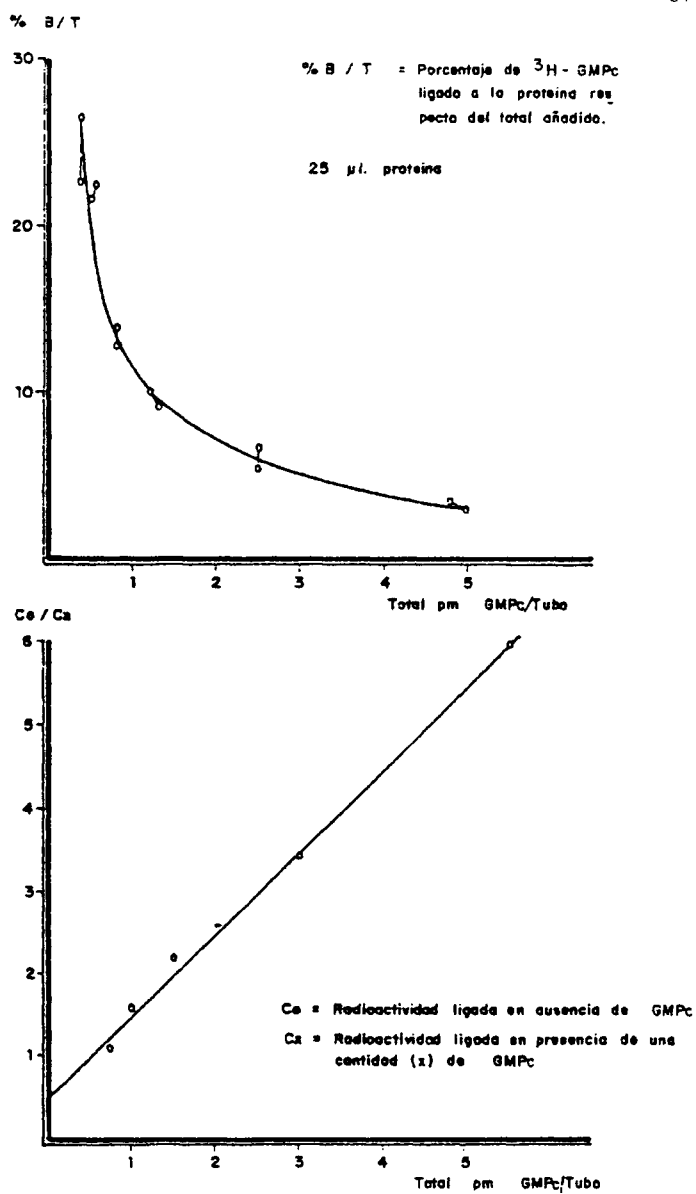


Fig. 15.- Curva estandar del ensayo de GMPc por "Protein Binding" empleando dos representaciones diferentes.

ción se obtiene una unión máxima (porcentaje de GMPC marcado unido al anticuerpo en ausencia de GMPC) de un  $54 \pm 1.8\%$  ( $\bar{X} \pm SEM$ ) resultado de 7 determinaciones realizadas en duplicado (Fig. 16).

## 2.1 Evaluación de la Curva Estandar

### a) Precisión

Con esa dilución el perfil de precisión de la curva estandar es como muestra la Fig. 17A. Vemos que los coeficientes de variación son menores del 10% en la parte comprendida entre 50 y 100 fentomoles /tubo, y más alto en la zona de la curva de calibración donde las concentraciones de GMPC son inferiores, llegando incluso a un 35% con la dosis de 5 fentomoles/tubo.

La mayoría de las lecturas de los extractos celulares se han llevado a cabo en la zona de 40-200 fentomoles donde se observan C.V. menores.

### b) Sensibilidad y constante de asociación

La sensibilidad del ensayo según se desprende de la

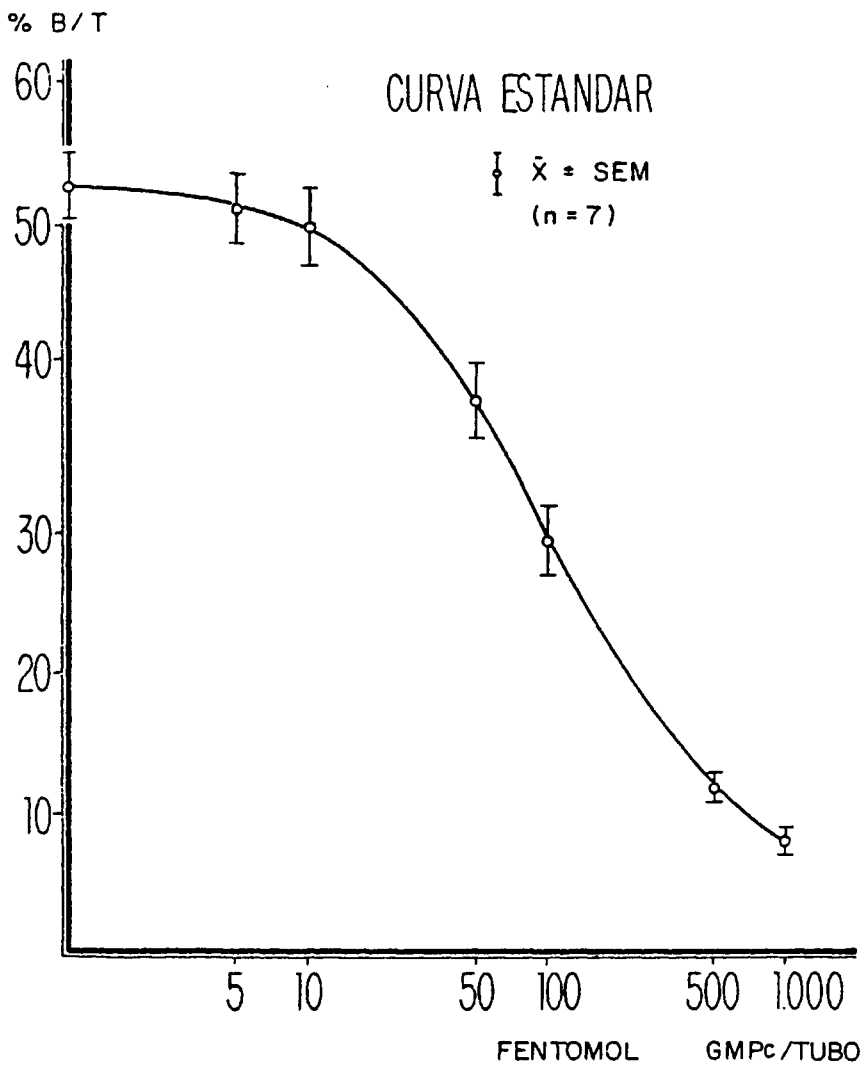


Fig. 16.- Curva estandar del RIA de GMPc. B/T es el cociente de radioactividad unida al anticuerpo por las cuentas totales. Los resultados son la media  $\pm$  S.E.M.

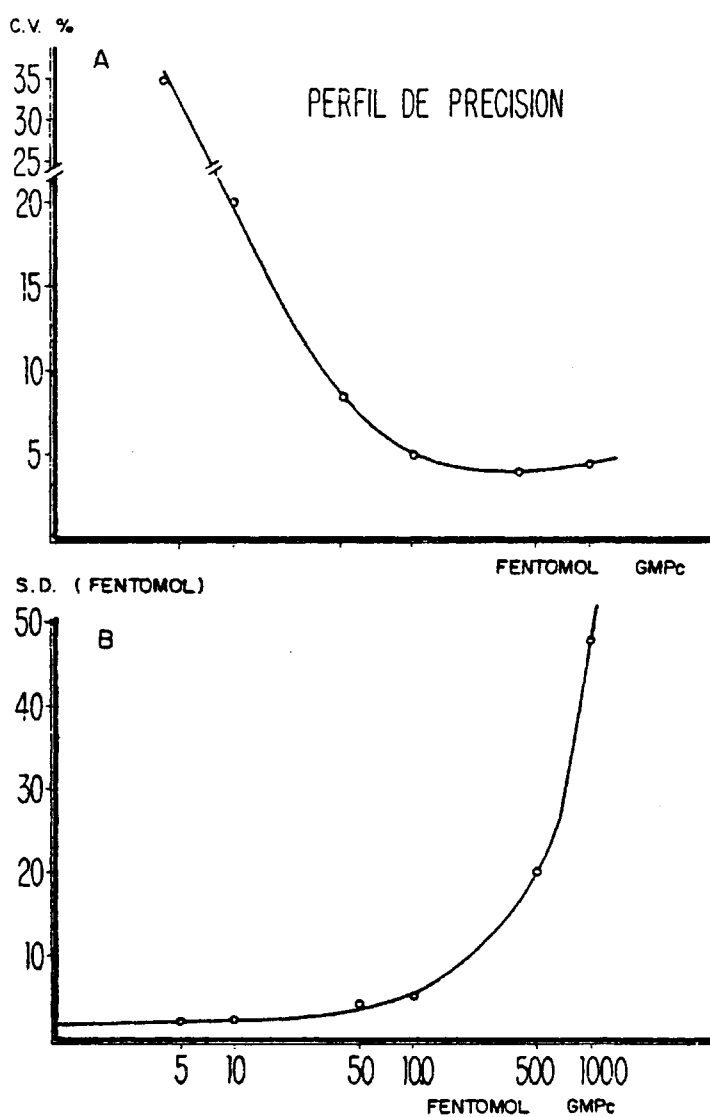


Fig. 17.- Perfil de precisión de un ensayo de GMPC. Están representados los coeficientes de variación (A) y las desviaciones estándar (B) para cada una de las dosis de GMPC.

Fig. 17 B es de 5 fentomoles aproximadamente (dos desviaciones estandar de la dosis cero de GMPC), sensibilidad que se acrecienta notablemente con el proceso de acetilación. La Fig. 18 muestra la diferencia existente entre una curva estandar acetilada y otra no, siendo la primera de ellas unas 50 veces más sensible.

De la sensibilidad del método de idea también la constante de asociación del anticuerpo. Anticuerpos cuya afinidad por el antígeno sea elevada proporcionan ensayos más sensibles. En este caso, la determinación de la constante de asociación por el método de Scatchard ha sido  $0.11 \times 10^{10} M^{-1}$  (Fig. 19).

### c) Especificidad

Aunque no se hicieron reacciones cruzadas anti-GMPC con otros nucleótidos, la especificidad del método quedó claramente demostrada en el primero de los experimentos (Fig. 20), donde incluso en presencia de elevadas cantidades de AMPC ( $\pm 200$  pm) no se detecta cambio en el contenido celular de GMPC.

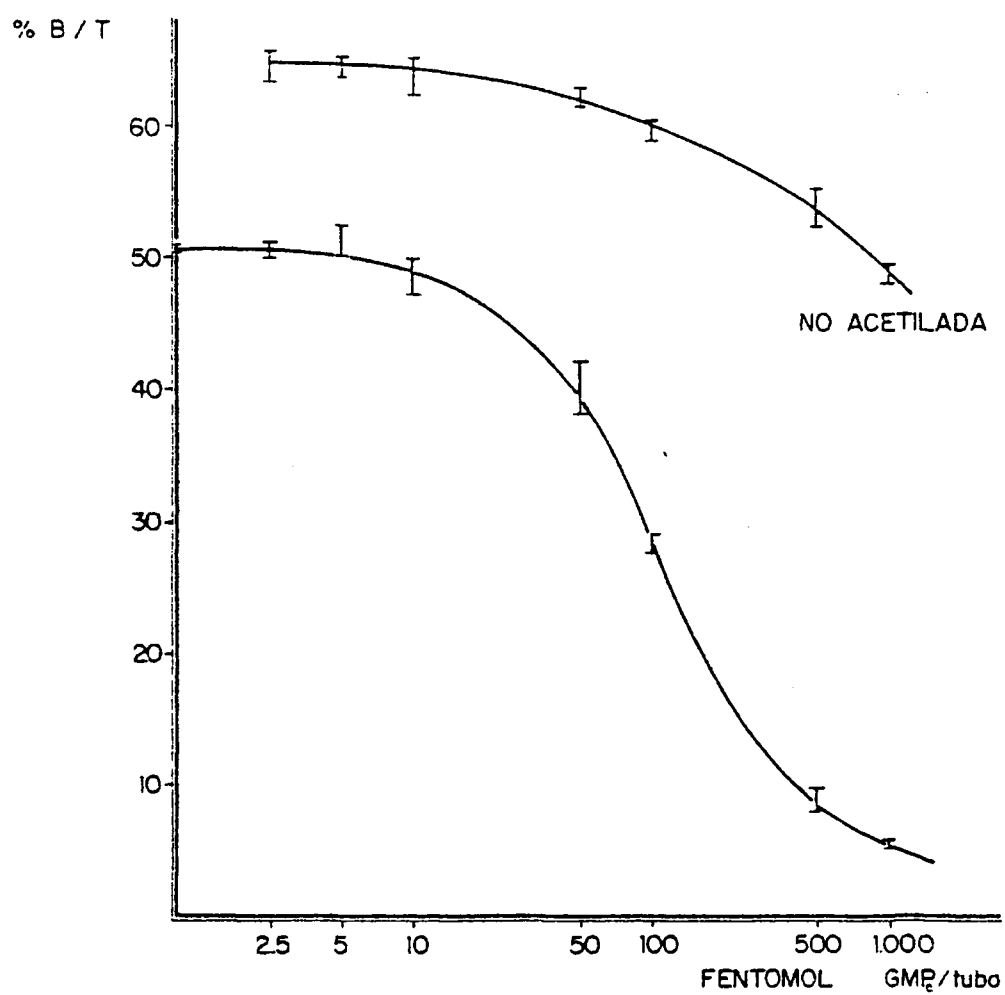


Fig. 18.- Efecto de la acetilación sobre la sensibilidad de la curva estándar.

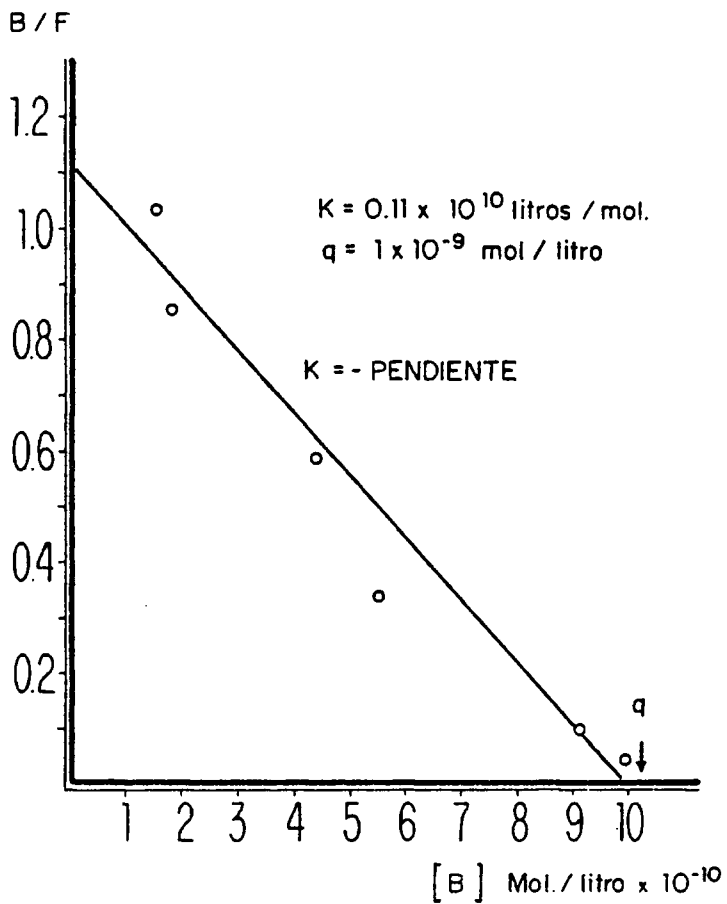


Fig. 19.- Representación Scatchard de una curva estandar. B es la porción de GMPc unido al anticuerpo y F la porción libre. La pendiente proporciona la constante de afinidad del anticuerpo y la intersección con el eje de las X la concentración total de los lugares de unión.

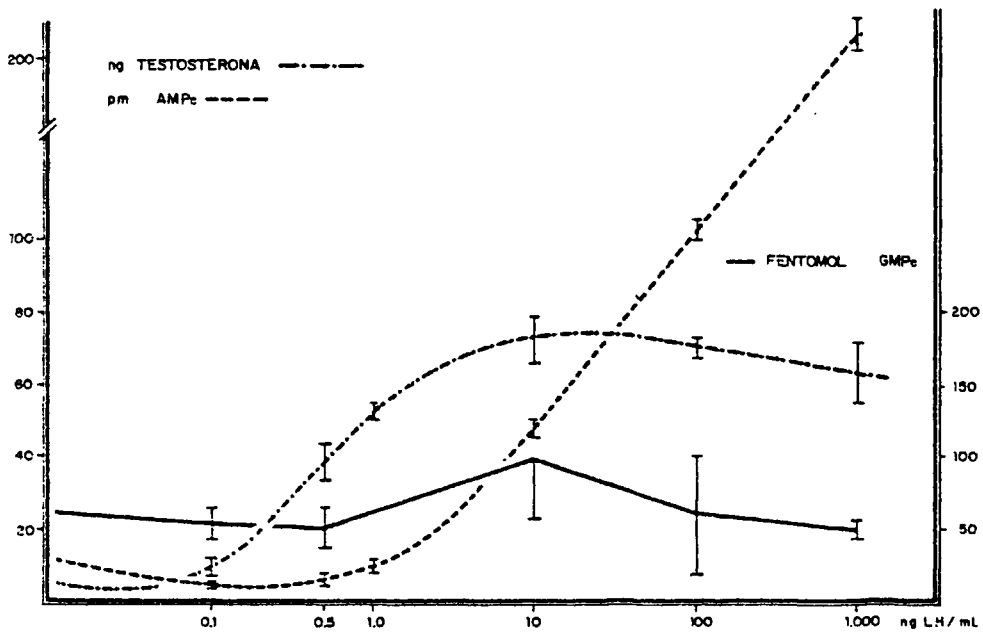


Fig. 20.- Determinación de AMPc, GMPc y Testosterona en un mismo extracto celular.

A ello contribuye la buena separación cromatográfica que se realiza en las columnas Dowex, resinas cambiadoras de iones, que proporcionan una total separación de ambos nucleótidos. Las columnas se equilibran con agua y como se observa en la Fig. 21, donde se han puesto a eluir  $^3\text{H}$ -AMPc y  $^3\text{H}$ -GMPc, la separación es total, -recogiéndose, después de desechar el primer ml, primero el GMPc y más tarde el AMPc, con recuperaciones del 68% y 89% respectivamente (n=10).

## 2.2 Precisión de ensayo

Para comprobar la precisión del ensayo, se añadió GMPc exógeno a las células y su concentración fué determinada después de extraer y cromatografiar en columna Dowex. En la Tabla N° 9 se pueden ver las recuperaciones de las diferentes cantidades de GMPc añadidas.

Las células se incuban siempre en presencia de MIX (un inhibidor de la fosfodiesterasa) para prevenir el metabolismo de los nucleótidos cíclicos. Cuando las células se incuban en ausencia de MIX durante tres horas a temperatura ambiente, la cantidad de GMPc decrece desde 65.6 hasta 13 fentomoles.

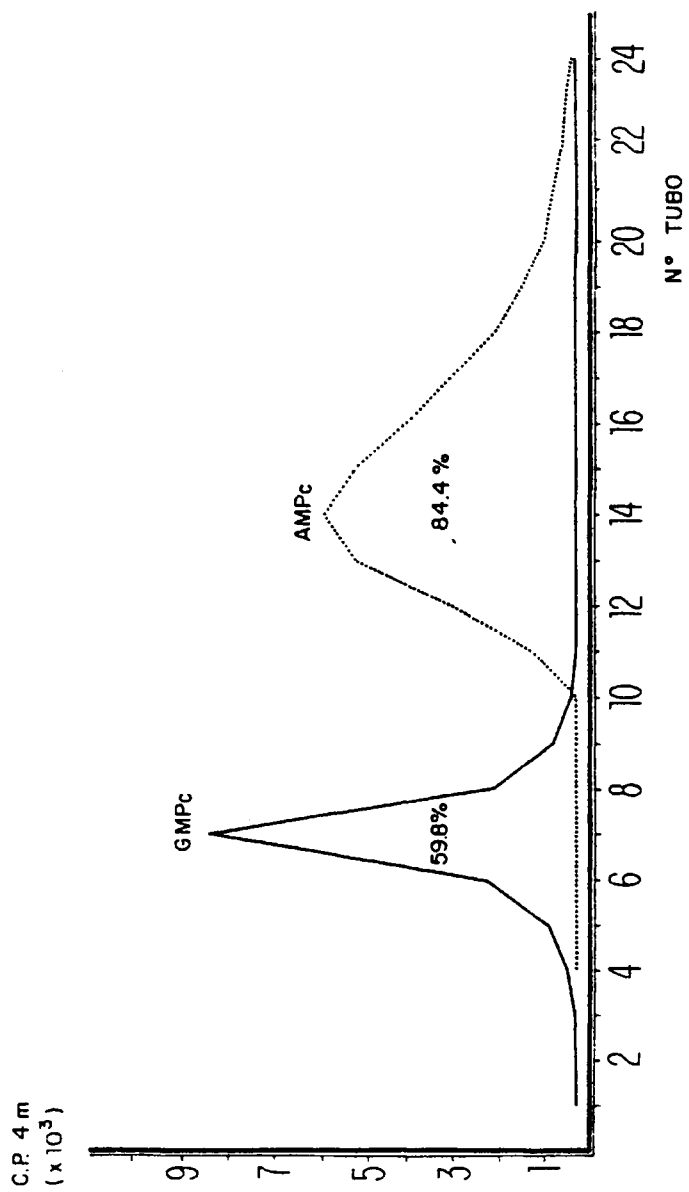


Fig. 21.- Separación cromatográfica del AMPc y GMPc. Las columnas Dowex estaban equilibradas con agua bi destilada.

T A B L A N°. 9

PRECISION DEL RADIOINMUNOENSAYO DE GMP<sub>c</sub>

FENTOMOLES GMP <sub>c</sub> ANADIDOS A LAS CELULAS	N	CANTIDAD DE GMP <sub>c</sub> LEIDA EN LA CURVA STANDAR(MEDIA <sup>±</sup> SD)	% RECOV.
100	2	76.3	76.3
500	4	386.3 <sup>±</sup> 75.5	69.4 <sup>±</sup> 15.0
1.000	6	943.9 <sup>±</sup> 92.2	90.1 <sup>±</sup> 10.0

N : N° DE DETERMINACIONES

### 3. DETERMINACION DE TESTOSTERONA POR RADIOINMUNOENSAYO

El radioinmunoensayo empleado es esencialmente una modificación del método descrito por Furuyama y col. (130).

El anticuerpo utilizado se ha producido en conejos - tras la inmunización de testosterona-3(0 Carboximetil) -- oxima conjugada con albúmina bovina.

#### 3.1 Evaluación de la curva estandar

##### a) Sensibilidad

La curva estandar abarca desde los 100 hasta los 400 pg de testosterona, con dilución de anticuerpo 1/20.000 - (Fig. 22). Para esta dilución la constante de asociación, determinada por el método de Scatchard es de  $5,5 \times 10^9$  li/mol. La sensibilidad, asumiendo un error experimental de un 10%, alcanza los 0.01 pm/litro.

La precisión de los puntos de la curva patrón nos viene dada por la Tabla N°10 donde observamos los C.V. para cada una de las dosis de testosterona añadidas.

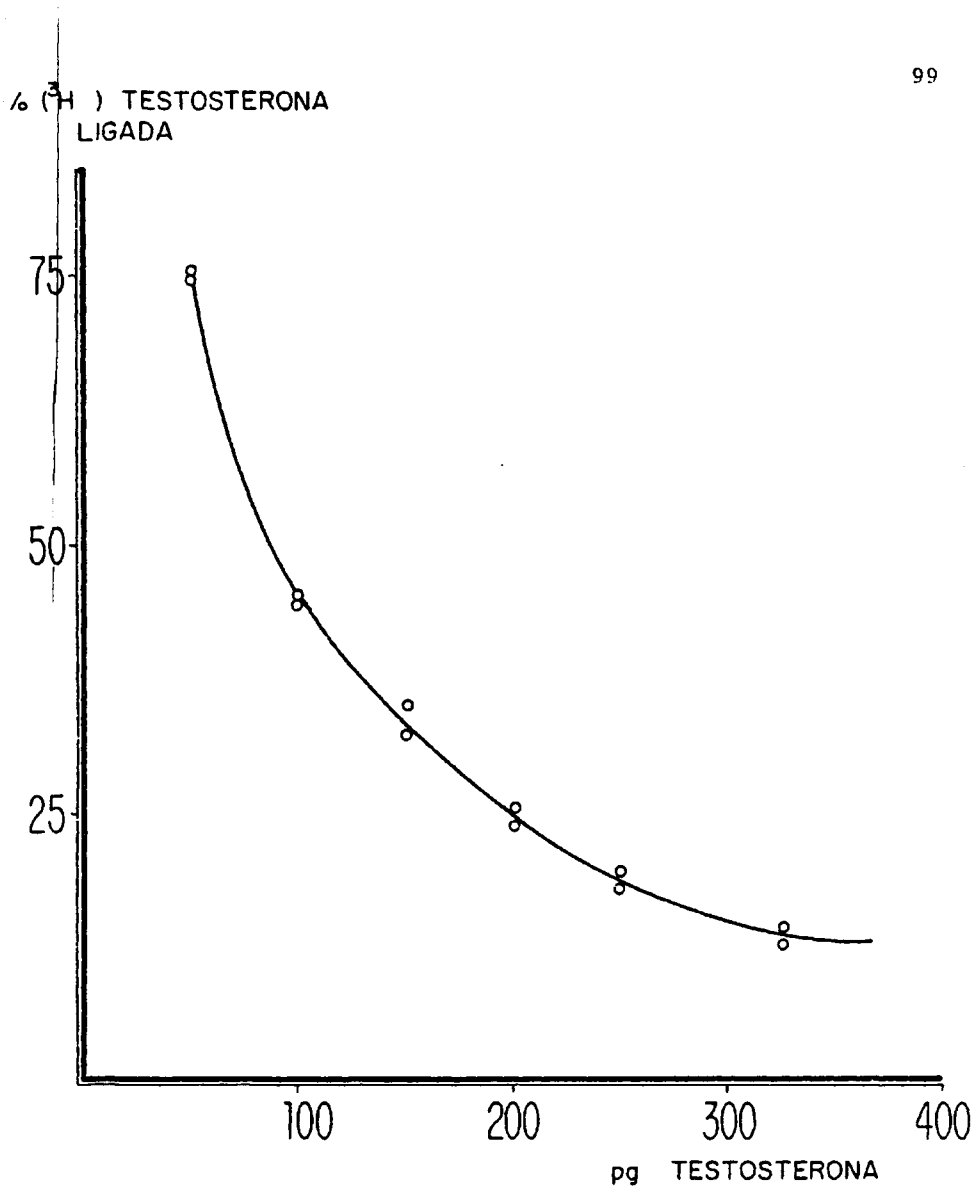


Fig. 22.- Curva estandar del RIA de testosterona.

T A B L A N°. 10

PRECISION DE LA CURVA ESTANDAR

DOSIS DE TESTOSTERONA (PG)	<sup>3</sup> H - TESTOSTERONA UNIDA EN % (S.D., COEFICIENTE DE VARIACION, N= 6)	PG TESTOSTERONA LEIDOS (S.D., COEFICIENTE DE VARIACION)
0	60.2 ± 0.6 (10 %)	1.9 ± 1.5 (78.9 %)
50	27.6 ± 1.7 ( 6.2 %)	47.2 ± 4.1 ( 8.7 %)
100	14.0 ± 2.1 (15.0 %)	122.2 ± 14.4 (11.8 %)
200	8.0 ± 1.2 (15.0 %)	196.2 ± 34.6 (17.6 %)
250	5.9 ± 1.3 (22.0 %)	274.8 ± 56.2 (20.4 %)
500	2.4 ± 0.9 (37.5 %)	530.0 ± 153.0 (28.8 %)

### b) Especificidad

La especificidad del radioinmunoensayo depende de la especificidad del anticuerpo. Esta se comprobó, determinando la capacidad de otros esteroides para desplazar a la  $^3\text{H}$ -testosterona de su unión con el anticuerpo (Fig. 23). La adición de 100 pg de 5 $\alpha$ DHT, 1500 pg de 4-androstene-3,17 diona o 650 pg de 4-androsteno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ diol producen el mismo desplazamiento (un 50%) de la unión máxima inicial que 50 pg de testosterona, lo cuál es una buena muestra de especificidad del método.

En la práctica la especificidad se evaluó también comparando las concentraciones de testosterona en los extractos celulares determinadas por RIA, con las concentraciones que se obtienen por Cromatografía Gas-Líquido (GLC). El coeficiente de correlación obtenido es 0.95 (n=54), (Fig. 24).

### 3.2 Técnica del RIA

Con el fin de elegir las mejores condiciones metodológicas, se hicieron distintas experiencias, resumidas -

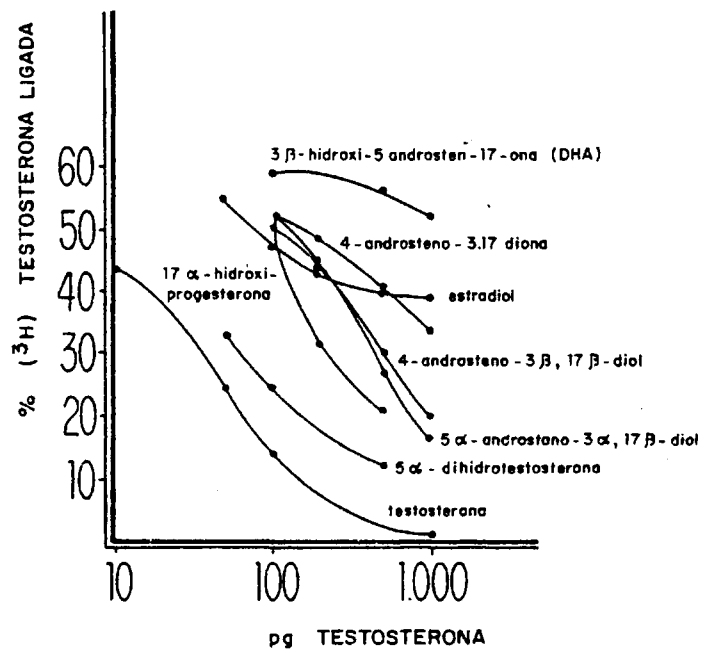


Fig. 23.- Reacción cruzada del anticuerpo antitesterona con otros esteroides.

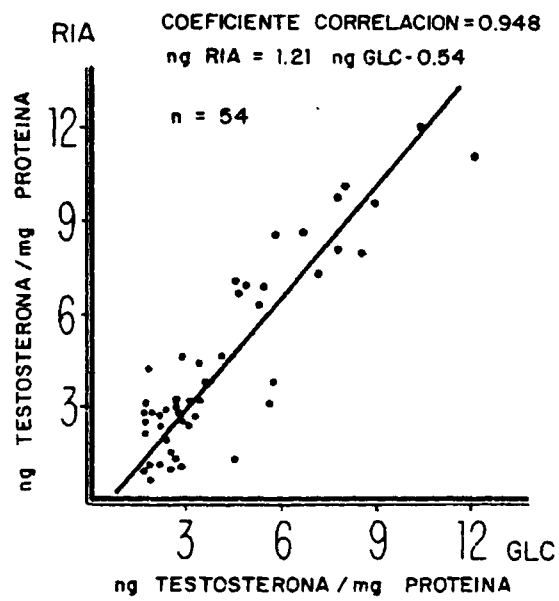


Fig. 24.- Determinación de testosterona en muestras de tejido testicular utilizando radioinmunoensayo (RIA) y cromatografía gas líquido (GLC).

en la Tabla N° 11, en la que se observa el efecto que ejerce sobre la unión máxima, la adición del anticuerpo a temperatura ambiente antes de la incubación a 4°C durante 26-28 horas.

### 3.3 Precisión del ensayo

La precisión del radioinmunoensayo se evaluó determinando la cantidad de testosterona en muestras a las que se habían añadido cantidades conocidas de hormona. En general se observa una buena correlación entre la cantidad de testosterona que se añade a las muestras y aquella que se obtiene por RIA (Tabla N° 12).

Por otra parte los C.V. de determinaciones múltiples (n=8) de una muestra (plasma masculino) en un mismo ensayo varían desde 5% hasta 14% (Precisión intra-ensayo) y el C.V. de los valores de un mismo plasma en diferentes ensayos (variaciones inter-ensayo, n=6) están comprendidos entre un 6% y un 17%.

T A B L A N°. 11

CONDICIONES	% <sup>3</sup> H TESTOSTERONA UNIDA (MEDIA ± S.D.)
1 - ANTICUERPO AÑADIDO A 4° C	58.8 ± 1.7
2 - ANTICUERPO AÑADIDO A 22° C E INMEDIATA INCUBACION A 4° C	56.1 ± 4.0
3 - ANTICUERPO AÑADIDO A 22° C E INCUBACION A 4° C DESPUES DE 30' A 22° C	53.2 ± 1.1
4 - IGUAL QUE EN PUNTO 3 EXCEPTO QUE EL TIEMPO A 22° C HA SIDO 90'	52.6 ± 1.6

T A B L A N°. 12

## PRECISION DEL RIA DE TESTOSTERONA

PG TESTOSTERONA AÑADIDOS	N	PG TESTOSTERONA ENCONTRADOS	S.D. (pg)	C.V.	% REC.
0	5	3	1	33.0	
50	5	47	4	8.5	94
100	5	96	8	8.3	96
150	5	152	8	5.3	101
200	5	206	35	17.0	103
300	5	260	35	13.5	87

$$C.V. = (S.D./M) \times 100$$

4. EFFECTO DE LA LH SOBRE LOS NIVELES DE GMPc, AMPc Y -  
TESTOSTERONA EN CELULAS INTERSTICIALES DE TEJIDO -  
TESTICULAR

Cuando comenzamos estas experiencias la existencia - y mediación del AMPc en la célula de Leydig como intermedio de la acción de la LH estaba ampliamente documentada (115).

El interrogante se presentaba cuando con las concentraciones menores de LH, (del orden de 0.5 ng LH/ml) se conseguían incrementos en la producción de testosterona - pero no de AMPc.

Intentábamos por tanto comprobar si otro nucleótido, el GMPc, intervenía también como mensajero de la acción - de la LH cuando se utilizaban concentraciones de hormona gonadotropa en el rango inferior de su dosis estimuladora. Para ello se hicieron dos tipos de experimentos:

- a) con diferentes dosis de LH (curva dosis-respuesta)
- b) con una misma dosis y diferentes tiempos de incubación (curvas de tiempo).

#### 4.1 Curvas dosis-respuesta

Las células de Leydig se incubaron con diferentes - concentraciones de LH (0.1, 0.5, 1, 10, 100 y 1000 ngLH/ml) y después de un período de incubación de 2 horas se midieron los niveles de AMPc, GMPc y testosterona presentes en el medio. Como se puede ver en la Fig. 25 los valores de GMPc permanecen invariables, mientras que se -- observa el incremento normal en la producción de AMPc y testosterona con 100 y 1000 ngLH/ml.

El experimento se repitió con 0.1, 1 y 1000 ngLH/ml en el medio de incubación y las células se incubaron durante 20' en lugar de dos horas. Tampoco ésta vez se detectaron cambios en el contenido de GMPc (Fig. 26).

Cuando el tiempo de incubación es de 5' (Fig. 27) - se observa un aumento (dos veces) respecto del control - con 0.5ngLH/ml. Este aumento sin embargo no resulta significativo al hacer la media con los resultados de las - curvas de tiempo, donde también se observa un ligero incremento al hacer los estímulos con esa dosis de LH.

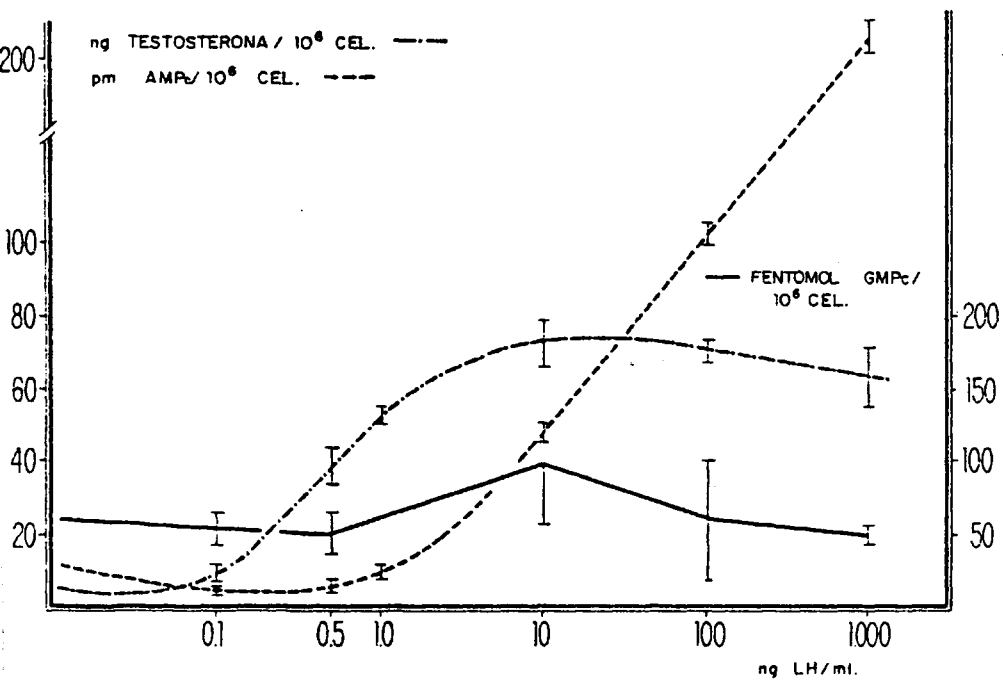


Fig. 25.- Producción de AMPc, GMPc y testosterona con cantidades crecientes de LH en el medio de incubación. Los resultados son la media  $\pm$  S.D. de dos incubaciones por duplicado.

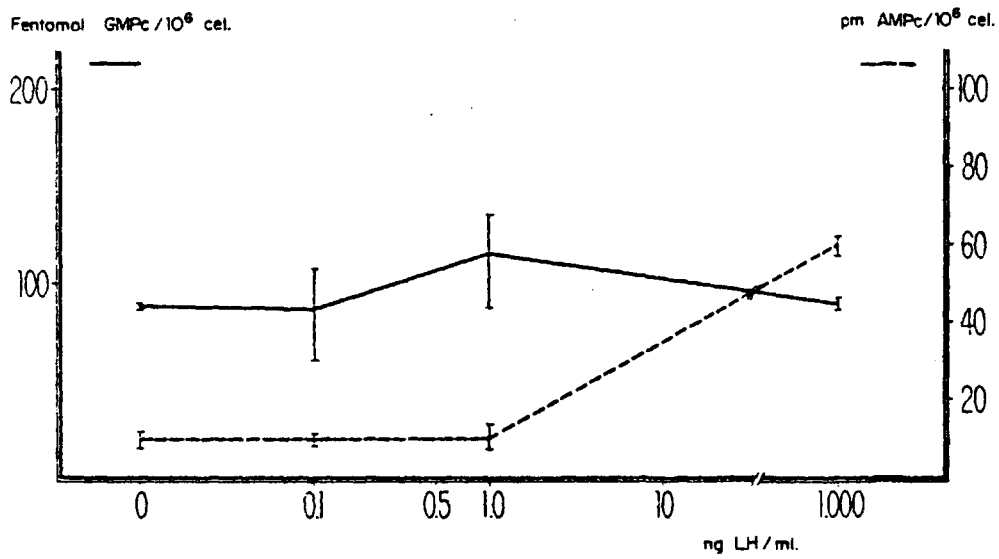


Fig. 26.- Producción de AMPc y GMPc con cantidades crecientes de LH tras 20' de incubación. Los resultados son la media  $\pm$  S.D. de 2 incubaciones en duplicado.

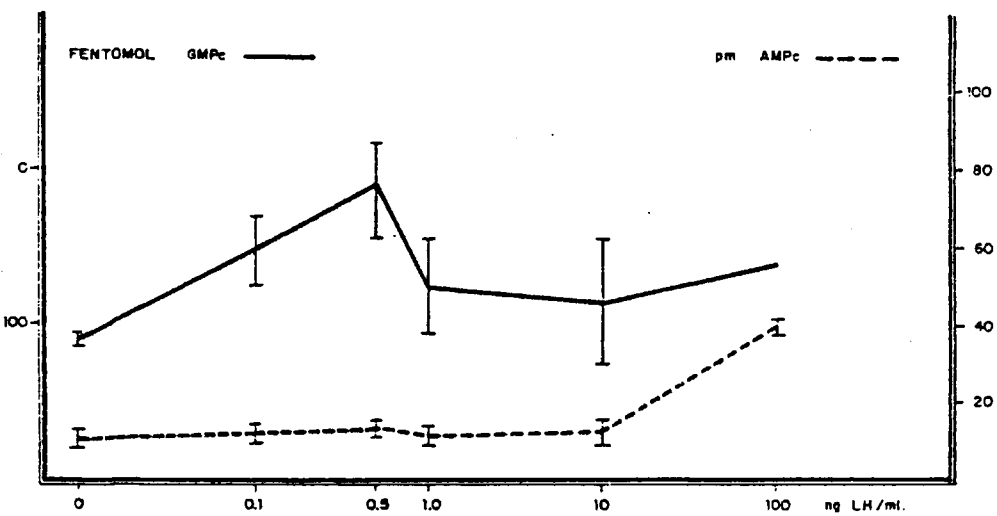


Fig. 27.- Producción de AMPc y GMPc con cantidades crecientes de LH tras 5' de incubación. Los resultados son la media  $\pm$  S.D. de 2 incubaciones en duplicado.



#### 4.2 Curvas de tiempo

Para estudiar los posibles cambios transitorios que hubieran podido ocurrir en la formación del GMPc de las células intersticiales, éste se determinó a intervalos variables de tiempo utilizando tres diferentes cantidades de LH.

Las concentraciones de LH escogidas son aquellas que originan un aumento de la producción de testosterona (0.1, 0.5, y 1ngLH/ml) sin que existan cambios en los niveles de AMPc en el período de incubación de dos horas.

Los resultados están expresados en las Figs. 28 y 29 y por último compendiados en la Fig. 30, donde se observa que con ninguna de las dosis de LH empleadas se produce variación significativa en los niveles de GMPc en los tiempos de incubación escogidos (2, 5, 10 y 20 minutos).

Para comprobar la idoneidad de la preparación celular se hicieron, (excepto en el primer experimento), incubaciones paralelas en presencia de 100ngLH/ml en las que se determinó la producción de testosterona tras un período

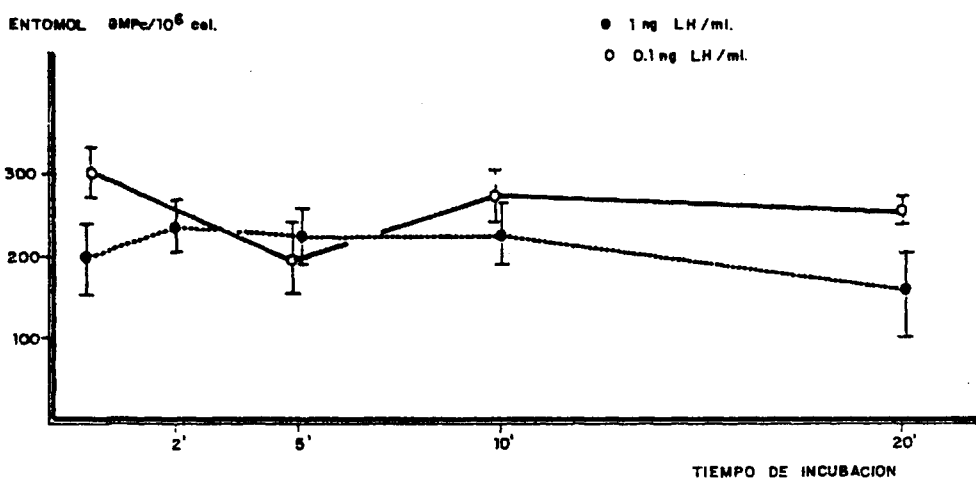


Fig. 28.- Producción de GMPc con periodos variables de incubación, utilizando 1 y 0.1 ng LH/ml. Los resultados son la media + S.D. de 2 experimentos con doble incubación celular.

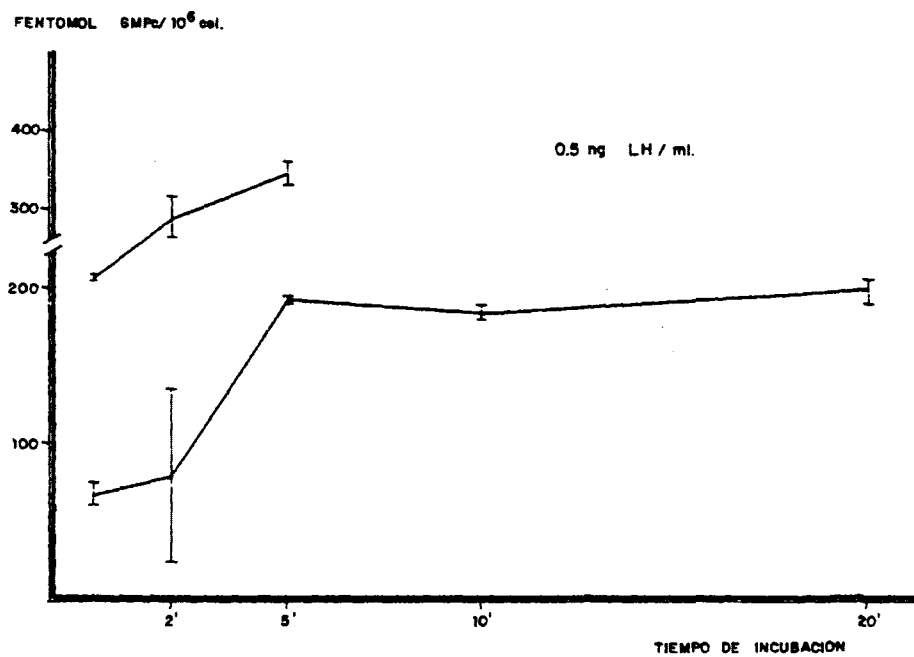


Fig. 29.- Producción de GMPc en periodos variables de tiempo en presencia de 0.5 ng LH/ml. Los resultados son la media  $\pm$  S.D. de 2 incubaciones en duplicado.

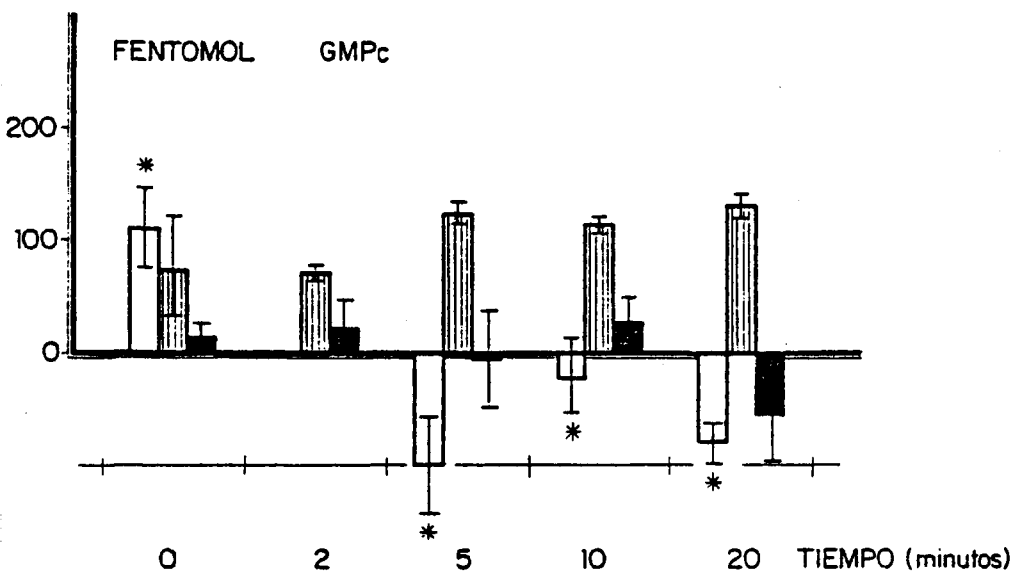


Fig. 30.- Producción de AMPc durante la incubación de células de Leydig a diferentes tiempos en presencia de 0.1 ng LH/ml □, 0.5 ng LH/ml ▨, y 1 ng LH/ml ▩. Los resultados (diferencia entre los valores en presencia y ausencia de LH) se expresan por  $10^6$  células y son la media + S.D. de tres experimentos con incubaciones en duplicado, (\* doble incubación solamente).

do de incubación de dos horas. En todos los casos se -  
consiguieron estimulaciones superiores a un 400%.

Puesto que la respuesta de las células de Leydig a la LH en cuanto a la producción tanto de AMPc como de testosterona, se podía reproducir por la adición de la toxina del cólera al medio de incubación (150), se nos ocurrió que al igual que esta toxina era capaz de incrementar la actividad de la enzima adenil ciclasa pudiera también servir como instrumento para incrementar los niveles de GMPc a través de la guanil ciclasa. En la Fig. 31 están representados los resultados que se obtuvieron con 2 ug/ml de toxina, cantidad estimuladora de AMPc, a diferentes tiempos de incubación. En ella se observa que no hubo modificación de los niveles de GMPc a lo largo del período de tres horas que duró el experimento.

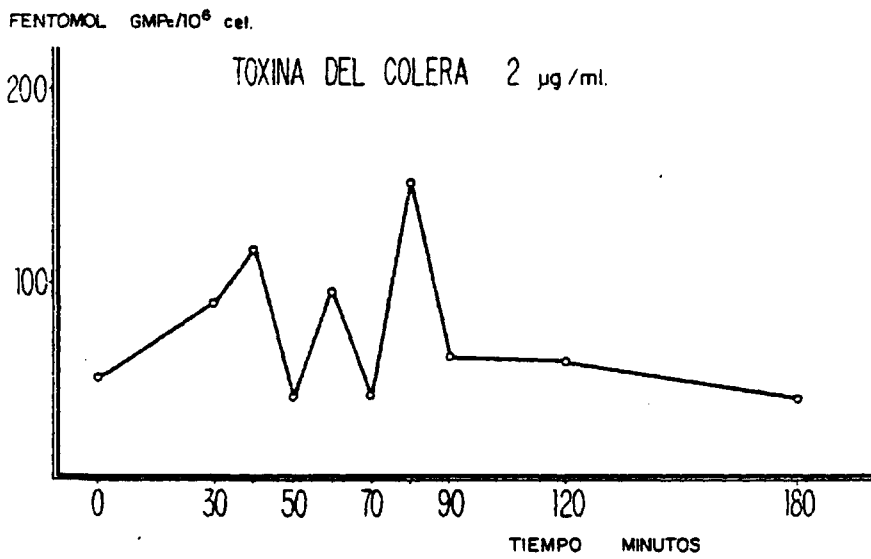


Fig. 31.- Producción de GMPc en presencia de toxina del cólera a diferentes tiempos de incubación. -- Los resultados son la media  $\pm$  S.D. de 2 incubaciones en duplicado.

5. EFFECTO DE LA PRL SOBRE LA PRODUCCION DE TESTOSTERONA ESTIMULADA POR LA LH EN CELULAS DE LEYDIG

En esta parte del trabajo, hemos centrado nuestra atención en la influencia que otras hormonas, concretamente la prolactina (PRL), ejercen sobre la síntesis y secreción de testosterona por las células de Leydig del intersticio testicular.

Era lógico pensar que la PRL, hormona que dispone de receptores específicos en la célula de Leydig, actuara a su través para modular la producción de testosterona. De hecho existen abundantes datos en la bibliografía que hablan en favor de la PRL como hormona necesaria para el mantenimiento de la función germinativa del testículo, ya que la disminución de sus niveles da lugar a un cuadro de esterilidad (78 y 131).

Puesto que la espermatogénesis es FSH y andrógeno dependiente, pudiera ser que una alteración de los niveles intratesticulares de testosterona fuera la responsable de dicha esterilidad. Para comprobar si tal alteración existe, se han aislado las células de Leydig, se han hecho -

preincubaciones en presencia de PRL (con dosis fisiológicas) y se han determinado la testosterona y el AMPc producidos por la LH tras dos horas de incubación. El estudio se ha hecho con células procedentes de ratas adultas (60 días aproximadamente).

Además y puesto que en el modelo utilizado la PRL incrementa sus niveles séricos en el momento que tiene lugar la maduración sexual (30-50 días), se han repetido los experimentos con células obtenidas de ratas inmaduras por si esas preparaciones celulares fueran en ese período más sensibles a las acciones de la PRL.

Por último es interesante observar que tanto la disminución de PRL circulante como su presencia en exceso modifican la función testicular. Así, hay varios casos descritos en la literatura de varones que presentan hiperprolactinemia asociada a oligospermia o azoospermia (132 y 133). Curiosamente al tratamiento de estos pacientes con drogas que disminuyen los niveles plasmáticos de PRL su infertilidad desaparece. También en ratas con hiperprolactinemia producida por tumores prolactin productores

se ha podido observar que esa hiperhormonemia conlleva alteraciones del comportamiento sexual (134).

En un intento de aclarar si la PRL en concentraciones elevadas conseguía disminuir la producción de testosterona testicular, disminución que quizás fuera la causa de esa infertilidad, hemos utilizado el mismo modelo haciendo incubaciones en presencia de dosis mayores de PRL y nuevamente se han determinado la testosterona y el AMPc producidos tras dos horas de incubación.

#### 5.1 Producción de Testosterona y AMPc en ratas adultas

a) Con dosis fisiológicas de PRL (60 ng/tubo).

En la Tabla N°. 13 están representadas las cantidades de testosterona producidas en el medio durante el período de incubación de dos horas cuando las células han sido preincubadas durante dos horas con y sin PRL.

T A B L A N°. 13

Dosis de LH ng/ml	Producción de Testosterona ng/10 <sup>6</sup> células/2 horas			
0.	8.1 ± 1.9	9 ± 4.9		
0.5	18.4 ± 6.0	13.3 ± 8.0		
10	66.7 ± 12.5	48.1 ± 22.3		
100	63.7 ± 23.0	53.1 ± 24.0		
	+ PRL(60ng/tubo)    - PRL			

Los resultados son la media con sus desviaciones estandar de cuatro experimentos, cada uno de los cuáles constaba de doble incubación celular.

Por si la hipotética acción de la PRL sobre la testosterona estimulada por la LH se ejerciera a nivel de la producción de AMPc es por lo que se han determinado las concentraciones de este nucleótido al mismo tiempo que las de testosterona. Los valores obtenidos de AMPc en las mismas condiciones, están representados en la -- Tabla N° 14.

T A B L A N° . 14

Dosis de LH ng/ml	Producción de AMPc pm/10 <sup>6</sup> células/2 horas	
	+ PRL(60ng/tubo)	- PRL
0.	7.0 ± 3.6	6.3 ± 3.4
0.5	7.2 ± 3.4	4.3 ± 3.9
10	15.7 ± 10.7	20.0 ± 6.5
100	116.6 ± 82.9	110.2 ± 83.4

Los resultados son la media de tres experimentos con sus desviaciones estandar, en cada uno de los cuáles las incubaciones celulares eran dobles.

Se desprende de ambas representaciones que para ninguna de las dosis de LH empleadas se obtienen diferencias significativas en la producción de testosterona y AMPc en presencia de PRL.

b) Con dosis farmacológicas de PRL (600ng/tubo).

La única variación en estos experimentos ha sido la dosis de PRL empleada. También en este caso se ha determinado la producción tanto de testosterona como de AMPc. Los resultados se esquematizan en las Tablas N°. 15 y 16 respectivamente.

T A B L A N°. 15

Dosis de LH ng/ml	Producción de Testosterona ng/10 <sup>6</sup> células/2 horas.	
0.	10.2 ± 6.9	11.0 ± 7.9
0.5	12.5 ± 7.7	18.2 ± 3.5
10	27.0 ± 1.7	33.1 ± 10.8
100	29.4 ± 10.2	39.4 ± 12.7
	+PRL (600ng/tubo)	- PRL

Los valores representan la media ± S.D. de tres experimentos con doble incubación celular.

T A B L A N°. 16

Dosis de LH ng/ml	Producción de AMPc pm/10 <sup>6</sup> células/2 horas			
	+ PRL (600 ng/tubo)		- PRL	
0	13.0 ±	8.7	12.5 ±	4.1
0.5	8.4 ±	5.6	11.6 ±	4.0
10	17.5 ±	3.5	26.8 ±	8.9
100	71.7 ±	44.2	85.5 ±	55.9

Los resultados son la media de dos experimentos cada uno de los cuáles constaba de doble incubación celular.

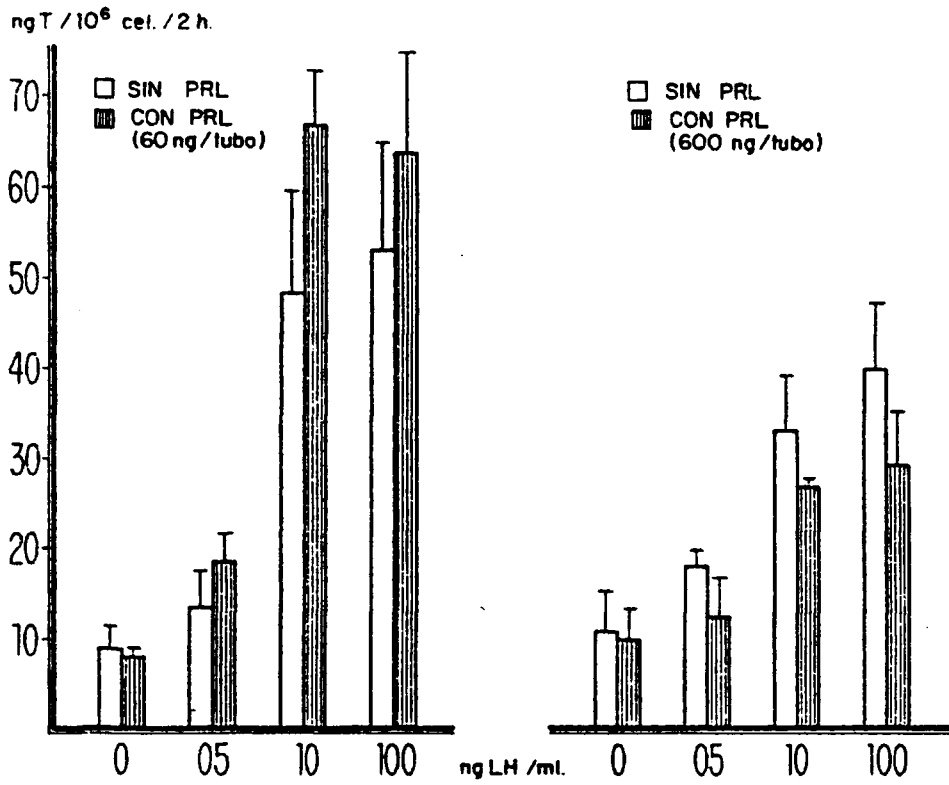


Fig. 32.- Producción de T. tras dos horas de incubación con diferentes dosis de LH, con PRL ▨ y sin PRL □ durante el tiempo de preincubación (2 horas).

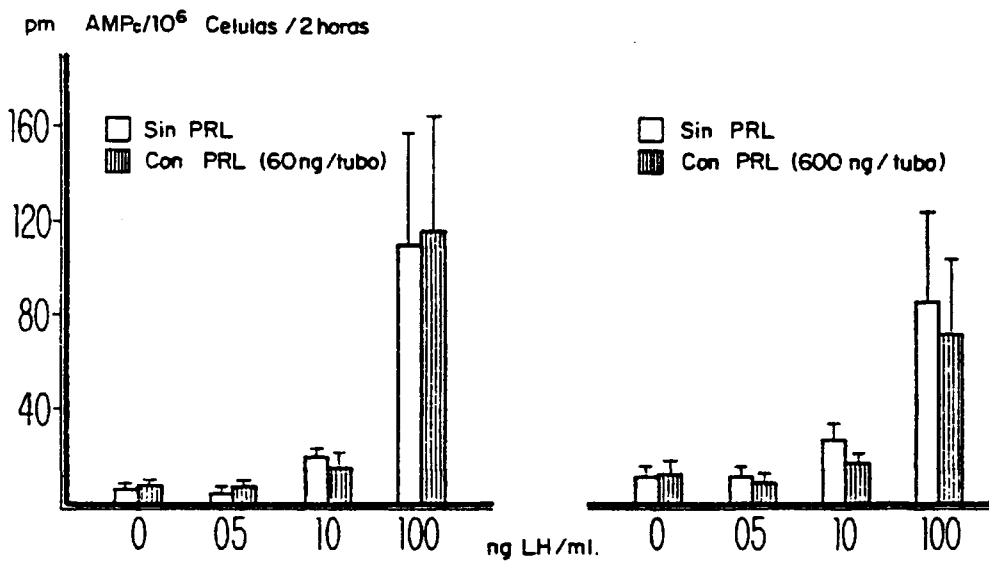


Fig. 33.- Producción de AMPc tras dos horas de incubación con diferente dosis de LH, con PRL ■ y sin PRL □ durante el tiempo de preincubación (2 horas).

En este caso tampoco existe diferencia significativa entre los valores basales de testosterona y AMPc y -- los que se obtienen cuando las células han sido pretratadas con PRL.

Sin embargo, se puede notar, al comparar los resultados obtenidos con las dos concentraciones de PRL (60 y 600 ng/tubo), que con dosis farmacológicas de PRL se obtiene, para todos los valores de LH empleados una menor producción de testosterona (Fig. 32). Otro tanto ocurre con los resultados de AMPc (Fig. 33).

## 5.2 Producción de Testosterona y AMPc en ratas inmaduras

Comentábamos en la introducción que se utilizarían células obtenidas de ratas jóvenes, para estudiar la influencia de la PRL sobre la producción de testosterona y AMPc, puesto que en esos días (+ 45 días) tienen lugar los incrementos plasmáticos de PRL que son paralelos al aumento de testosterona circulante y al aumento en el número de receptores de LH.

Con ésto sospechabamos que la acción de la PRL, de existir, podría tener una especial relevancia en ese período.

La Fig. 34, muestra los resultados de testosterona en ratas jóvenes y su comparación con los que se obtienen cuando las células proceden de ratas adultas. Como se esperaba la producción de testosterona es menor en ratas inmaduras, aunque su capacidad de respuesta a la LH es comparable.

Como en los anteriores experimentos, las células se preincubaban durante dos horas con y sin PRL (60ng/tubo). Pasado este período se incubaban nuevamente por dos horas con diferentes cantidades de LH determinándose al final la producción tanto de testosterona como de AMPc.

Las Tablas N°. 17 y 18 que resumen los valores obtenidos, nos muestran que no existen diferencias entre el grupo tratado y el grupo control.

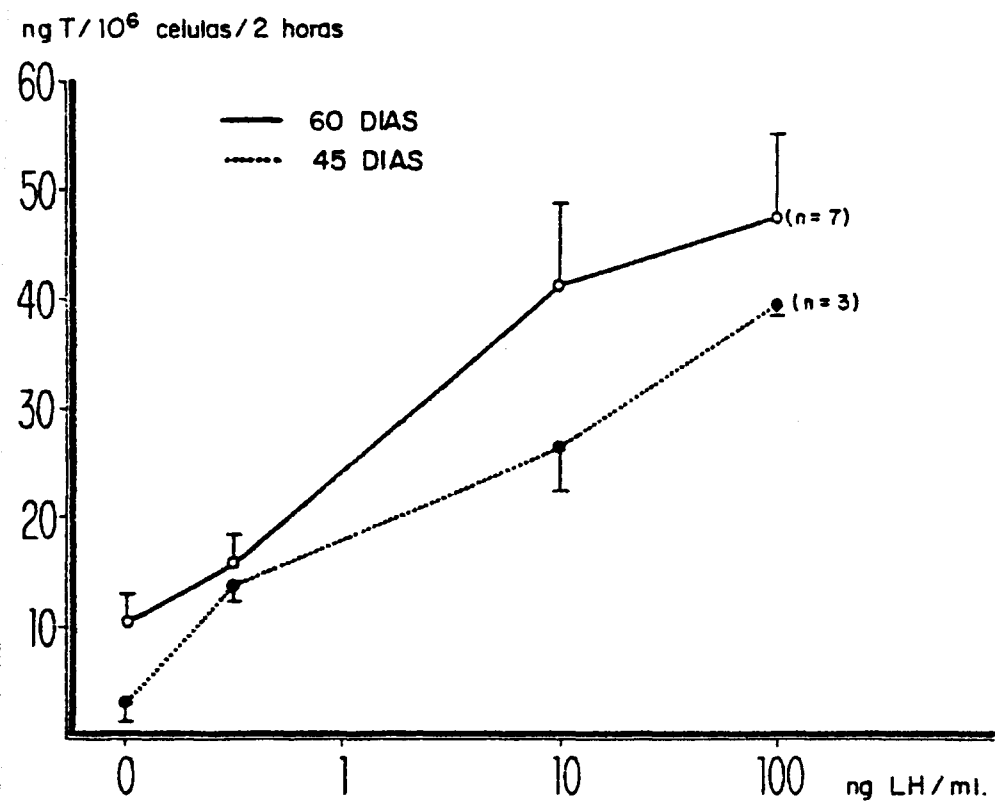


Fig. 34.- Producción de testosterona en células procedentes de ratas de 45 y 60 días con diferentes dosis de LH.

T A B L A N°. 17

Dosis de LH ng/ml	Producción de Testosterona ng/10 <sup>6</sup> células/2 horas	
0	6.5 ± 6.7	6.06 ± 3.0
0.5	17.1 ± 7.7	13.8 ± 2.2
10	36.7 ± 13.0	26.3 ± 6.6
100	34.4 ± 3.7	39.8 ± 0.2
	+ PRL(60ng/tubo)	- PRL

Son los resultados de tres experimentos con doble incubación celular, las medias y sus desviaciones estandar.

T A B L A N°. 18

Dosis de LH ng/ml	Producción de AMPc pm/10 <sup>6</sup> células/2 horas			
	+ PRL(60ng/tubo)		- PRL	
0	6.5 ± 2.0	6.3 ± 1		
0.5	6.9 ± 1.8	6.9 ± 1.8		
10	15.4 ± 8.3	26.0 ± 17.3		
100	84.9 ± 30.1	70.9 ± 45.4		

En este caso los resultados obtenidos son la media de tres experimentos con doble incubación celular ± S.E.M.

DISCUSSION

## DISCUSION

Comenzaremos la discusión de los trabajos realizados en esta tesis con el comentario primeramente del aspecto técnico de la misma, para pasar más adelante a la valoración de los resultados obtenidos con las incubaciones celulares.

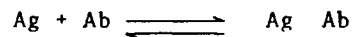
### 1.- TECNICAS

Básicamente ha sido el desarrollo de las técnicas de valoración de nucleótidos, AMPc y GMPc lo que más ocupó nuestra atención porque cuando se decidieron estas experiencias la determinación de testosterona por radioinmunoensayo estaba ya perfectamente estandarizada.

#### a) Valoración de AMPc

De las dos posibilidades que se nos ofrecían, RIA (135) y "Protein Binding" (120) se optó por la segunda, puesto que se sabía ya que la proteína receptora procedente de adrenales bovinas presentaba una afinidad por el AMPc capaz de determinar las cantidades existentes en células de Leydig en condiciones basales (4-10 pm/mg proteína) (136).

Además la obtención del extracto de adrenales bovinas es sencilla, barata y la proteína dependiente de AMPc guardada a  $-20^{\circ}\text{C}$  es estable durante períodos de tiempo de 2 años como máximo (Fig. 10). Para la determinación de la constante de asociación se ha seguido el método de Scatchard (127) que se basa en lo siguiente: en general en el equilibrio de la reacción competitiva se cumple



y según la ley de acción de masas la constante en el equilibrio sería igual

$$K_{eq} = \frac{(\text{Ag Ab})}{(\text{Ag})(\text{Ab})}$$

(Ag) = Concentración de antígeno o sustrato libre = F

(Ab) = Concentración de anticuerpo (o agente ligante) libre

(Ag Ab) = Concentración de antígeno unido al anticuerpo = B

Si llamamos q. a la concentración molar total de todos los sitios de unión de la proteína, nos quedará

$$(Ab) = (q - B)$$

y

$$K_{eq} = \frac{B}{F(q-B)} \quad \text{o} \quad B/F = q K_{eq} - B K_{eq}$$

La representación poniendo B/F en ordenadas frente a B en abscisas origina una línea recta cuya pendiente nos proporciona la constante de equilibrio o asociación.

El modelo descrito presupone que la proteína o anti cuerpo presentan solamente una clase de sitios de unión con una determinada afinidad (128). Cuando lo que existe es una mezcla de esos lugares de unión, se calcula la constante de equilibrio de los que tienen mayor afinidad trazando la tangente a la curva resultante, para el valor de B=0. En nuestro caso hemos obtenido por ese procedimiento y con dilución de proteína 1/30 una constante de asociación de  $0.5 \times 10^9$  litros/Mol (Fig. 8), lo que nos proporcionó un índice de la buena avidez de esta proteína por el AMPc y nos dió una idea de la máxima sensibilidad de nuestro ensayo.

Para la representación de la curva estandar hemos escogido la modalidad B/T frente a dosis en escala semilogarítmica. La buena reproducibilidad y acusada -- pendiente en cada uno de los puntos así lo hicieron -- aconsejable (Fig. 9).

La curva estandar abarca desde 2.500 pg hasta 156 pg lo que cubre todo el espectro de concentraciones de las muestras problemas, tanto las condiciones basales como las situaciones de estimulación.

La especificidad y precisión con que se hacen todas las determinaciones cumplen, como se puede desprender de la Fig. 11 y de las Tablas 7 y 8, donde el porcentaje de reacción cruzada con el GMPC es muy bajo y los C.V. intra e interensayo son menores de un 15%, todos los requisitos de aceptabilidad de este tipo de ensayos (137).

En cuanto a la precisión interensayo, hemos seguido a lo largo de dos años los resultados obtenidos para un mismo "pool" y hemos representado estos resultados en dos formas diferentes (fig. 13).

La representación de la parte superior de la figura no es más que la anotación de los valores de cada ensayo; de esa anotación se desprende que a lo largo de ese período no se han encontrado, para ese "pool", variaciones superiores a las 2 S.D. por encima y por debajo de la media esperada. Sin embargo, cuando se emplea la representación "cusum" (sumas acumulativas) tomando como referencia el valor que resulta en el primer ensayo y sumando acumulativamente las desviaciones entre éste y los restantes valores, lo que idealmente debería resultar cero, nos encontramos que va apareciendo una tendencia a la desviación de la situación ideal, lo que puede interpretarse como un indicio de deterioro del ensayo.

Concuerdan estos resultados con la pérdida de unión máxima que se observa en el 2° año del almacenaje de la proteína, por lo que nuestra conclusión es que este tipo de representación es mucho más eficaz a la hora de observar posibles errores que se hayan introducido en el ensayo y que sean indetectables por otros procedimientos.

La prueba de dilución, ofrece una perfecta correlación entre volúmen de muestra a valorar y concentración de AMPc, (Fig. 14) con lo que la fiabilidad del método está perfectamente demostrada. Y así es, puesto que nuestros resultados son similares a los de otros autores -- (138 y 139), aun cuando se utilice como proteína receptora de AMPc, extractos procedentes de otros tejidos diferentes de las adrenales (140 y 141).

b) Valoración de GMPc

Al comienzo de las experiencias de determinación de GMPc en células de Leydig se pensó en una técnica de -- "Protein Binding" similar a la del AMPc para hacer todas las evaluaciones necesarias.

La proteína receptora se obtuvo de cola de langosta y tras el proceso de purificación se consiguieron las -- primeras curvas estandar cuya sensibilidad alcanzaba 0.5 pm. (Fig. 15). Con esa técnica se hicieron las primeras determinaciones en tejido y los resultados que obtuvimos se esquematizan en la Tabla N° 19.

T A B L A N°. 19

Tejido	N°. de ratas	pm GMPc/mg proteina ( $\bar{X} \pm$ SEM)
Pulmón	4	0.64 $\pm$ 0.33
Testículo	4	0.07 $\pm$ 0.04

\* ratas irradiadas antes del nacimiento

El problema surgió al hacer las primeras determinaciones en los extractos celulares donde nos encontramos con que esa sensibilidad no era suficiente para detectar las bajas concentraciones existentes (0.05-0.2 pm/10<sup>6</sup> células), por lo que hubo que acudir al método de RIA introduciendo la modificación de Cailla y Col. (142), para aumentar la sensibilidad hasta el orden de fentomoles.

La modificación consiste en introducir grupos succinilo o acetilo en la posición 2 en la molécula del nucleótido cíclico. Como el anticuerpo está generado contra el conjugado de GMPc en esa misma posición, quizás sea por similitud estereoquímica por lo que la avides -

del anticuerpo es en estos casos mucho mayor. De esa manera hemos conseguido incrementar, como se observa en la Fig. 18, la sensibilidad hasta 10 femtomoles/tubo.

La representación Scatchard de la curva estandar (B/F frente a B), es una línea recta, lo que da idea de la existencia de una sola clase de anticuerpos con elevada afinidad por el GMPc (Fig. 19).

Las condiciones de especificidad, sensibilidad y precisión son las estipuladas para todo RIA. Respecto a los primero se desprende de la Fig. 20, que no existe reacción cruzada entre este anticuerpo y el AMPc puesto que incluso en presencia de elevadas cantidades de ese nucleótido ( $\pm 200$  pm) no se detectaron cambios en el contenido celular de GMPc. Además existe una buena separación cromatográfica de ambos nucleótidos. La sensibilidad alcanza 4pm (2 SD para el valor de GMPc=0, Fig. 17B), pero en la práctica hemos tomado como límite de sensibilidad el último punto de la curva de calibración.

En la Tabla N°. 9 vemos que se han obtenido buenas recuperaciones para el GMPc exógeno añadido a las células por lo que creemos que el método estaba suficientemente validado. Todos los valores estaban corregidos por las pérdidas que ocurrían durante el proceso de extracción.

En casi todos los casos hemos encontrado un cierto valor para los "blancos", tubos que carecían de células y eran extraídos de la misma manera que éstas. Los resultados están expresados después de la corrección por esa interferencia. Aún así y puesto que las condiciones de especificidad y precisión intra e interensayo -- eran buenas los resultados, que coinciden con los de -- otros autores (143), son totalmente aceptables.

c) Radioinmunoensayo de Testosterona

La validez de este radioinmunoensayo se estudió determinando los niveles de testosterona en plasma humano

y en tejido testicular y comparando esos resultados con las evaluaciones realizadas según el método de cromatografía gas-líquido, alcanzándose especialmente en el caso de tejido testicular un buen coeficiente de correlación entre ambos métodos, (Fig. 24).

Las determinaciones se hicieron sin previa cromatografía para separar la testosterona de su metabolito -- principal,  $5\alpha$  dihidrotestosterona, que como se veía en la Fig. 23 mostraba reacción cruzada con el anticuerpo antitestosterona. Dos han sido las razones que nos han permitido obviar esa separación cromatográfica; la primera es que la concentración media de ese esteroide en testículo de rata es aproximadamente un 13% de la concentración media de testosterona y la otra que nosotros hemos utilizado en todas las experiencias animales de 45 a 65 días en los que la actividad específica de la  $5\alpha$  reductasa se encuentra muy disminuída (144 y 145).

La exactitud y precisión con que se determinaron -- las muestras fué satisfactoria (Tabla 12); las muestras se han leído en la zona de la curva estandar que presen

tan C.V. que varían entre 22.0% y 6.2% (Tabla 10) y la elevada constante de asociación del anticuerpo ( $5.5 \times 10^9$  litros/Mol) favoreció la buena sensibilidad del ensayo.

La reproductibilidad interensayo con C.V. que varían entre 10%-15% está dentro de los límites de fiabilidad de cualquier RIA.

## 2. INCUBACIONES CON LH

Cuando se diseñaron estos experimentos se habían comenzado a plantear las primeras dudas acerca de la aceptación del AMPc como el único intermediario de la hormona luteinizante en la esteroidogénesis testicular.

El hecho de que en estudios "in vitro" con células de Leydig se consiguiera, con determinadas dosis de LH, estimular la producción de testosterona sin que hubiera cambios significativos en la síntesis de AMPc (45, 46, 47 y 146), nos obligaba a pensar o bien en una acción directa de la LH sobre cualquiera de los pasos posteriores a la activación de AMPc (proteína quinasa, sistema

enzimático colesterol-pregnenolona, sistema enzimático - pregnenolona-testosterona.....) o bien en la presencia - de otro segundo mensajero, que con dosis pequeñas de LH asumiera el papel hasta entonces asignado al AMPC.

Puesto que en otro tejido esteroideogénico, las adrenales, se había encontrado una estrecha relación entre - formación de GMPc y producción de corticosterona (147 y 148) y puesto que la producción de testosterona testicular en incubaciones de células aisladas, se incrementaba en presencia de inhibidores de la fosfodiesterasa (46 y 149) (enzima que degrada los nucleótidos cíclicos) decidimos indagar acerca del GMPc como posible mediador de - la LH en el testículo. Como método de valoración de GMPc se utilizó el RIA.

En todos los experimentos las células se preincubaron durante dos horas antes de la adición de las hormonas, ya que habíamos notado que la producción de testosterona podía detectarse de esta manera, a los 5 minutos de la adición de LH (100 ng/ml), lo que resultaba imposible sin ese período de preincubación (150). La razón de

esta mejora en la rapidez para sintetizar testosterona - es por el momento desconocida, pero bien pudiera ser que durante el proceso de preparación de las células los receptores de LH hubieran sido dañados de alguna forma y - que en las dos horas de preincubación el factor o factores deteriorados hayan sido sintetizados de nuevo.

En los experimentos que hemos llamado de dosis-respuesta (Fig. 25) no ha sido posible detectar ningún incremento en la producción de GMPc tras dos horas de incubación ni cuando el tiempo escogido fué de 20 minutos -- (Fig. 26). Solamente con un período de incubación de 5 minutos pareció existir un ligero incremento con 0.5 -- ngLH/ml (Fig. 27), pero no resultó significativo (p 0.5) al hacer la media con el resto de las experiencias de -- tiempo en que se utilizaron también 5 minutos.

Otro tanto ocurre con los experimentos de tiempo. - Aunque en uno de esos experimentos (Fig. 29) se observa también un incremento de GMPc a los dos minutos de incubación, hay que hacer notar que en la gráfica no se han hecho las correcciones por los valores control (concen--

tracción de GMPc en ausencia de LH), y que al hacerlo -- esos incrementos no resultan significativos (fig. 30).

En todos los casos se hicieron incubaciones en paralelo, dos horas con 100 ngLH/ml, para demostrar la viabilidad de la preparación celular encontrándose estimulaciones en la producción de testosterona en el rango de lo normal (aproximadamente de un 400%).

La concentración de AMPc no se determinó en todos los casos porque ya sabíamos que determinadas dosis de LH (0.1 y 0.5 ngLH/ml) no estimulaban la producción de este nucleótido.

Como un intento más de posible detección de cambios en la formación de GMPc por las células de Leydig se hizo un experimento en presencia de tóxima del colera vibrio, tóxima que a la concentración utilizada (2ug/ml) se sabía que estimulaba la formación de AMPc y la síntesis de testosterona en esos mismos preparados celulares (150).

No sólo en ésta, sino en otras glándulas endocrinas, (151) se ha implicado a ésta toxina en una serie de efectos que fisiológicamente están controlados por hormonas; es por lo que pensamos en ella como un medio ideal para aumentar nuestro conocimiento sobre los sistemas que controlan la esteroidogénesis gonadal. Pero tampoco en este caso (Fig. 31)) hubo variación en los niveles de GMPc a lo largo del estudio, desde los dos minutos hasta las 3 horas de incubación, cuando con ese mismo tiempo se -- originan incrementos de AMPc que van desde 4 hasta 200 -- pm/10<sup>6</sup> células.

Además el hecho de conseguir la misma activación de proteína quinasa con cantidades mucho mayores de GMPc -- (10<sup>-4</sup> M) que de AMPc (10<sup>-8</sup> M) no favorece la hipótesis -- de que las posibles variaciones del GMPc intracelular -- sean las responsables de la producción de testosterona -- con concentraciones bajas de LH. Todo ello juntamente -- con los resultados de Cooke y col. que consiguen activar la enzima PK y la biosíntesis de testosterona con las -- mismas cantidades de LH, (47) nos induce a pensar que es realmente el AMPc y no el GMPc el mediador de la acción

de la LH en las células de Leydig. Tampoco otros autores (143) han encontrado variaciones en el contenido de GMPc de las células de Leydig, cuando estas se incuban en presencia de LH o hCG. En el curso de estos experimentos ha aparecido un trabajo sobre el mismo tema, del grupo de Dufau y col (53), donde por el análisis de la unión del AMPc a la proteína reguladora de la enzima PK, se llegan a conclusiones similares.

### 3. INCUBACIONES CON LH Y PRL

Numerosos estudios en estos últimos años, favorecen la teoría de que además de la LH y FSH, la PRL es otra hormona pituitaria, que puede desempeñar un papel importante en la fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-gonadas (78, 82, 152, 153 y 154).

En la introducción apuntábamos que el hecho de que las células de Leydig tuvieran receptores de PRL, suponía el primer paso para la aceptación de un efecto directo de esta hormona sobre los procesos esteroideogénicos típicos de estas células.

En el mismo sentido se expresan las experiencias de Bartke y Swerdloff (83 y 98), donde en ratas hipofisectomizadas la administración de PRL aumenta la secreción de testosterona estimulada por la LH, pudiendo explicarse el sinergismo de ambas hormonas por la habilidad de la PRL para aumentar la unión de la LH en ese comportamiento testicular (76 y 155).

Por otra parte Bartke y col. (93), han demostrado, en ratas hiperprolactinémicas que los niveles circulantes de LH y FSH se encuentran suprimidos, mientras que los de testosterona son similares a los del grupo control. Puesto que se esperaba que la disminución de LH se acompañara del descenso de los niveles de testosterona, se postuló que, en esos animales con hiperprolactinemia producida por transplantes de pituitaria bajo la cápsula renal, la PRL estimula la secreción de testosterona por la célula de Leydig y que debido al retrocontrol negativo de este esteroide a nivel pituitario, se produce el descenso de la concentración de LH.

No puede sin embargo, descartarse la idea de una acción inhibitoria de la PRL sobre la secreción de gonadotropinas, lo que quizás explicaría la infertilidad que acompaña a las situaciones de hiperprolactinemia (156 y 157).

Nuestro propósito era comprobar si efectivamente la PRL ejerce alguna acción directa sobre la producción basal de testosterona por las células de Leydig y sobre la

producción de testosterona estimulada por la LH. Para ello decidimos incubar las células procedentes de ratas adultas con cantidades fisiológicas de PRL (60 ng/tubo) dos horas antes de la adición de diferentes cantidades de LH para estimular la formación de testosterona. Pensamos que si, como postulábamos en el apartado anterior las células, con dos horas de incubación, se hacían más sensibles al estímulo de la LH, la hipotética acción de la PRL a través de la unión LH-receptor pudiera hacerse más evidente.

Al término del período de incubación se determinaron las concentraciones de testosterona y AMPc. Con este último parámetro pretendíamos obtener alguna información sobre la posible implicación de los procesos de membrana en las acciones de la PRL.

De los resultados obtenidos en las (Tablas 13 y 14) se desprende que con dosis fisiológicas de PRL la producción de testosterona y AMPc por las células de Leydig no es diferente de la que resulta en condiciones basales (sin PRL), lo que parece descartar una acción directa de la PRL en el intersticio testicular.

El incremento no significativo que se observa en la formación de testosterona en presencia de PRL, con todas las dosis de LH (Fig. 32) bien pudiera deberse a la contaminación de las preparaciones de PRL (menos de 0.1% de LH en peso).

Esto estaría de acuerdo con otras experiencias "in vivo" (80 y 158), donde tampoco se ha encontrado influencia por parte de la PRL ni en la síntesis basal de testosterona ni en la que se produce en respuesta a la administración de LH.

Cuando se utilizan dosis elevadas de PRL en el medio de incubación, (600 ng/tubo), situaciones que corresponderían a estados de hiperprolactinemia "in vivo", en las que se han descrito acciones inhibitorias directas en la función testicular (159 y 160), tampoco se observan diferencias significativas en la producción de testosterona (Fig. 32).

Hasta el momento no ha aparecido en la bibliografía más que una referencia, utilizando testículo de ratón --

intacto (161), con unos resultados similares; tampoco - esos autores consiguieron inhibir la producción de testosterona estimulada por LH, con concentraciones de -- PRL del mismo orden que las utilizadas por nosotros.

Cabe preguntarse entonces si el efecto hipogonadal originado por elevadas concentraciones de PRL (132 y -- 133) puede deberse no a un efecto directo sobre la producción de testosterona, sino a una posible interferencia sobre la enzima  $5\alpha$  reductasa responsable de la transformación  $T \rightarrow DHT$  (162). Se sabe que, aunque la testosterona puede actuar directamente en algunos tejidos, - su acción se ejerce en los órganos andrógeno-dependientes a través de su conversión periférica en el metabolito activo DHT.

También pudiera ser que los esteroides producidos - por adrenales hipertroficadas que resultan de la existencia de elevadas concentraciones de PRL circulante fueran los responsables de la inhibición de la síntesis de testosterona por el testículo (163).

Lo que sí es interesante observar es que con todas las dosis de LH (Fig. 32) aparece una tendencia a la -- disminución de los valores de testosterona en relación a los grupos control y aunque esas diferencias no sean significativas es posible que eso se deba al número de experimentos realizados.

Si examinamos detenidamente la misma figura nos daremos cuenta de que la producción de testosterona, tanto basal como estimulada es en general menor en la segunda fase de los experimentos (parte derecha de la gráfica), pero hay que tener en cuenta que éstos se realizaron en los meses de Mayo, Junio y Julio, mientras que los primeros los fueron en Enero y Febrero y que parece existir una variación estacional en la producción de testosterona, de acuerdo con la época del año en que se determine (164 y 165).

Las variaciones no creemos que se deban explicar -- por diferencias en la técnica de radioinmunoensayo puesto que en cada ensayo se incluía un control (muestra con teniendo una cantidad conocida de T cuyos resultados eran totalmente aceptables).

Por último hemos ampliado las experiencias con 60 ng PRL/tubo, utilizando ratas más jóvenes (45-55 días) para obtener las preparaciones celulares. En esos días se han descrito variaciones en la secreción tanto de PRL, cuyos valores aumentan significativamente, como de FSH, donde se observan un patrón totalmente contrario, por lo que pensamos que en ese estadio, por ejercer la PRL quizás un papel más relevante, posiblemente fueran las células de Leydig, más sensibles a sus hipotéticas acciones.

Tampoco en este caso se han encontrado, comparando con el grupo control; diferencias en la producción de testosterona y AMPc cuando las células se incuban en presencia de PRL (Tablas 17 y 18).

Lo que sí se ha observado (Fig.34) es una menor capacidad de las células procedentes de ratas jóvenes para producir testosterona; debido al incremento sexual de LH durante el proceso de maduración (74, 166 y 167), que experimentan el número de receptores, es lógico que apa-

rezca esa disminución en relación a los animales adultos.

Resumiendo estas experiencias puede decirse que o bien la PRL actúa en el intersticio testicular indirectamente (vía adrenales, vía hipotálamo, vía pituitaria) o bien con nuestras condiciones (dos horas en presencia de PRL) no ha sido posible detectar ninguna acción, ni estimuladora ni inhibidora, sobre la síntesis y secreción de testosterona.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La determinación de AMPc mediante ensayo competitivo, utilizando extractos de corteza adrenal, ha demostrado ser apta para la detección de pequeñas cantidades de este nucleótido tanto en tejidos como en plasma y orina.
- 2.- La acetilación del GMPc a temperatura ambiente nos ha proporcionado el aumento de sensibilidad necesario para que la valoración del nucleótido de Guanina en células de Leydig fuera posible.
- 3.- En los extractos celulares se han encontrado los siguientes valores basales:  
  
    AMPc: 9.4 ± 3.7 pm/10<sup>6</sup> cel./2 horas  
    GMPc: 115.0 ± 50 fentomol/10<sup>6</sup> cel/2 horas  
    T : 10.0 ± 6.4 ng/10<sup>6</sup> cel/2 horas
- 4.- El estímulo de las células de Leydig con LH origina una mayor producción tanto de AMPc como de testosterona, en una manera tal que es dependiente de la dosis de LH utilizada.

- 5.- Los aumentos de AMPc y testosterona no son correlativos, ya que la producción de testosterona se incrementa significativamente con concentraciones de LH que no producen variación alguna en el contenido celular del nucleótido.
- 6.- No ha sido posible observar variaciones en la cantidad de GMPc producida por las células de Leydig al estímulo con LH, de lo que parece deducirse que el GMPc no actúa como un segundo mensajero de la acción de la hormona luteinizante en ese compartimento testicular.
- 7.- Se han encontrado diferencias en la producción de testosterona dependiendo de la época del año en que se obtengan las preparaciones celulares.
- 8.- Las células procedentes de ratas inmaduras (+ 45 días) han mostrado una menor capacidad para producir testosterona que las células procedentes de ratas adultas.
- 9.- De los experimentos con PRL se deduce:

9.1.- que la PRL, a concentraciones fisiológicas, no modifica la producción basal de AMPc y T, ni la que se produce tras el estímulo con LH.

9.2.- con dosis elevadas de PRL se observa una disminución en la producción de T estimulada por la LH que en ninguno de los casos resulta significativa.

Lo que en principio nos hace descartar la hipótesis de una acción directa de la PRL sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- EIK-NES, K.B. "Production and Secretion of Testicular Steroids". Recent Prog. Horm. Res., 27, 517-535, (1971).
- 2.- STEINBERGER, E. and STEINBERGER, A. "Spermatogenic Function of the Testis". In: Hand book of Physiology, Endocrinology Vol. V (R.O. Greep and D. Halmilton eds.). 1-20, (1975).
- 3.- CHRISTENSEN, A.K. "Leydig Cells". In: Hand book of Physiology, Endocrinology Vol. V. 57-95, (1975).
- 4.- MEANS, A.R. "Biochemical Effects of Follicle-Stimulating Hormone on the Testis". In: Hand book of Physiology, Endocrinology Vol. V (R.O. Greep and D. Hamilton eds.). 203-218, (1975).
- 5.- WAYNE BARDIN, C. "Pituitary-Testicular Axis". In: Reproductive Endocrinology. (S.S. C. Yen and R.P. Jaffe eds.). 110-125, (1978).
- 6.- SHARMA, R.K. "Regulation of Steroidogenesis by Adrenocorticotrophic Hormone in Isolated Adrenal cells of the Rat". J. Biol. Chem. 248, 15, 5473-5476, (1973).

- 7.- CATT, K.J., KETELSLEGGERS, J.M. and DUFAU, M.L. "Receptors for Gonadotropic Hormones". In: Methods in Receptor Research. Vol. I (M. Blecher ed). 175-249, (1976).
- 8.- CATT, K.J. and DUFAU, M.L. "Interactions of LH and hCG with Testicular Gonadotropin Receptors". Adv. - Exp. Biol. Med. 36, 370-384, (1973b).
- 9.- CATT, K.J. WATANABE, K. and DUFAU, M.L. "Cyclic AMP Released by Rat Testis during Gonadotropin Stimulation In Vitro". Nature 239, 280-281, (1972).
- 10.- COOKE, B.A. and VAN der KEMP, J.W. C.M. "Effect of Luteinizing Hormone and Cyclic AMP on Protein Kinase Activity in Rat Testicular Interstitial Tissue". J. Endocr. 67, 14-15, (1975)
- 11.- RYAN, R.J. and LEE, C.Y. "The Role of Membrane Bound Receptors". Biol. Reprod. 14, 16-29, (1976).
- 12.- CATT, K.J., DUFAU, M.L. and TSURUHARA, T. "Studies on a Radioligand Assay System for Luteinizing Hormone -

- and Chorionic Gonadotropin". J. Clin. Endocr. 32, -  
860-863, (1971).
- 13.- LEE, C.Y. and RYAN, R.J. "Luteinizing Hormone Receptors. Specific Binding of Human Luteinizing Hormone to Homogenates of Luteinized Rat Ovaries". Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 3520-3523, (1972).
- 14.- DUFAU, M.L., CHARREAU, E.H. and CATT, K.J. "Characteristics of a Soluble Gonadotropin Receptor from the Rat Testis". J. Biol. Chem. 248, 6973-6981, (1975).
- 15.- DUFAU, M.L., RYAN, D.W., BAUKAL, A.J. and CATT, K.J. "Gonadotropin Receptors. Solubilization and Purification by Affinity Chromatography". J. Biol. Chem. 250, 4822-4824, (1975).
- 16.- DUFAU, M.L. and CATT, K.J. "Gonadal Receptors for Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin". In: Cell Membrane Receptors for viruses, Antigens and Antibodies, Polipeptide Hormones, and small Molecules. (R.F. Beers, E.G. Bassett, eds.) 135-163, (1976).

- 17.- CATT, K.J., DUFAU, M.L. and TSURUHARA, T. "Absence of Intrinsic Biological Activity in LH and hCG -- Subunits". J. Clin. Endocr. Metab. 36, 73-79, (1973).
- 18.- LEE, C.Y. and RYAN, R.J. "Luteinizing Hormone Receptors in Luteinized Rat Ovaries". In: Receptors for Reproductive Hormones, (B.W. O'Malley and A.N. Means eds). 429-430, (1973b).
- 19.- BISHOP, W.H. and RYAN, R.J. "An Investigation of Relative Subunit Motility in Human Luteinizing Hormone Molecules using Depolarization of Fluorescence". Biochem. Biophys. Res. Comm. 65, 1184-1190, (1975).
- 20.- TSURUHARA, T., VAN HALL, E., DUFAU, M.L. and CATT, K.J. "Biological Properties of hCG after Removal of Terminal Sialic Acid and Galactosa Residues". Endocrinology. 91, 296-301, (1972).
- 21.- LIU, W.K. YANG, K.P., BURLEIGH, B.D. and WAID, D.N. "Functional Groups in Ovine Luteinizing Interactions: A Chemical Study". In: Hormone Binding and Target Cell Activation in Testis (A.N. Means and M. Dufau eds.). 89-108, (1974).

- 22.- BISHOP, W.H. and RYAN, R.J. "Solvent Exposure of Aromatic Groups in Human Luteinizing Hormone and its -- Subunits Measurement by Solvent Perturbation Difference Spectroscopy". *Biochemistry* 14, 4083-4087, (1975b).
- 23.- JOHNSON, H.B. and EWING, L.L. "Follicle-Stimulation Hormone and the Regulation of Testosterone Secretion in Rabbit Testes". *Science*, 173, 635, (1971).
- 24.- COOKE, B.A., ROMMERTS, F.F.G., VAN DER KEMP, J.W.C.M. and VAN DER MOLEN, H.J. "Effects of Luteinizing Hormone, Prostaglandine E<sub>1</sub>, and other Hormones on Adenosine 3'-5 Cyclic Monophosphate and Testosterone Production in Rat Testis Tissues". *Mol. Cell. Endocr.* 1, 99-111, (1974).
- 25.- ODELL, W.D. and SWERDLOFF, R.S. "The Role of Testicular Sensitivity to Gonadotropins in Sexual Maturation of the Male Rat". *J. Steroid. Biochem* 6, 853-857, (1975).
- 26.- KETELSLEGERS, J.M., HSUEH, A.J.W., HETZEL, W.D. and CATT, K.J. "Induction of Luteinizing Hormone (LH) - Receptors and Sensitivity in the Immature Rat Testis

by Follicle-Stimulating Hormone (FSH). 5th. International Congress of Endocrinology. Hamburg. Abstract - 519. (1976).

- 27.- HSUEH, A.J.W., DUFAU, M.L. and CATT, K.J. "Regulation of Luteinizing Hormone Receptors in Testicular Interstitial Cells by Gonadotropin". Biochem. Biophys. Res. Comm. 72, 1145-1154, (1976).
- 28.- RAO, M.C., RICHARDS, J.S., MIDGLEY, A.R.Jr. and REICHERT, L.E.Jr. "Regulation of Gonadotropin Receptors by Luteinizing Hormone in Granulosa Cells". Endocrinology, 101, 512-519, (1977).
- 29.- HARWOOD, J.P., CONTI, M., CONN, P.M., DUFAU, M.L. and CATT, K.J. "Receptor Regulation and Target Cell Responses: Studies in the Ovarian Luteal Cell". Mol. Cell. Endocr. 11, 121-135, (1978).
- 30.- CUATRECASAS P. "Membrane Receptors" Ann. Rev. Biochem. 43, 169-214, (1974).
- 31.- RODBELL, M., LIN, M.C., SALOMON, Y., LONDOS, C., HARWOOD, J.P., MARTIN, B.R., RENDELL, M. and BERMAN, M. "Role of Adenine and Guanine Nucleotides in the Activity and Response of Adenylate Cyclase System to Hor-

- mones. Evidence for Multisite Transition States". -  
Adv. Cyclic. Nuc. Res. 5, 3-29, (1975).
- 32.- LONDOS, C., SALOMON, Y., LIN, M.C., HARWOOD, J.P.,  
SCHRAMM, M., WOLFF, J. and RODBELL, M. "5'- Guanylyl-  
imidodiphosphate, a Potent Activator of Adenylate Cy-  
clase Systems in Eukaryotic Cell". Proc. Natl. Acad.  
Sci. U.S.A. 71, 3087-3090, (1974).
- 33.- DUFAU, M.L., BAUKAL, A.J., RYAN, D. and CATT, K.J. -  
"Properties of Detergent - Solubilized Adenylate Cyclase  
and Gonadotropin Receptors of Testis and Ovary". Mol.  
Cell. Endocr. 6, 253-269, (1977).
- 34.- HAYNES, R.C., SUTHERLAND, E.W. and RALL, J.W. "The -  
Role of Cyclic Adenylic Acid in Hormone Action". Rec.  
Prog. Horm. Res. 16, 121-138, (1960).
- 35.- SHARMA, K.R., AHMED, N.K., SUTLIFF, S.L. and BRUSH, J.  
S. "Metabolic Regulation of Steroidogenesis in Isola-  
ted Adrenal Cells of the Rat. ACTH Regulation of c-GMP  
and c-AMP Levels and Steroidogenesis. FEBS Letters. 45,  
107-110, (1974).

- 36.- MARSH, J.M., BUTCHER, R.W., SAVARD, K. and SUTHERLAND, E.W. "The Stimulatory Effect of Luteinizing Hormone on Adenosine 3'-5' Monophosphate Accumulation in -- Corpus Luteum Slices". J. Biol. Chem. 241, 5436-5440, (1966).
- 37.- MARSH, J.M., MILLS, T.M. and LEMAIRE, W.J. "Cyclic - AMP Synthesis in Rabbit Graffian Follicles and the - Effect of Luteinizing Hormone". Biochim. Biophys. - Acta 273, 389-395, (1972).
- 38.- DORRINGTON, J.H. and BAGGETT, B. "Adenyl Cyclase in the Rabbit Ovary". Endocrinology 84, 989-996, (1969).
- 39.- KOLENA, J. and CHANNING, C.P. "Stimulatory Effects of LH, FSH and Prostaglandins upon Cyclic 3'-5' AMP Levels in Porcine Granulosa Cells". Endocrinology - 90, 1543-1550, (1972).
- 40.- DUFAU, M.L., CATT, K.J. and TSURUHARA, T. "Gonadotro pin Stimulation of Testosterone Production by Rat Testis In Vitro". Biochim. Biophys. Acta. 252, 574-579, (1971).

- 41.- VAN DER MOLEN, H.J., DE BRUIJN, H.W.A., COOKE, B.A.,  
DE JONG, F.H. and ROMMERTS, F.F.G. "Regulation of -  
the Production of Testicular Steroid". In: The Endo-  
crine Function of the Human Testis Vol. 1, 459-491, -  
(1973).
- 42.- ODELL, W.D., SWERDLOFF, R.S., JACOBS, H.S. and HESCOX,  
M.A. "FSH Induction of Sensitivity to LH: one Cause -  
of Sexual Maturation in the Male Rat". Endocrinology  
92, 160-168, (1973).
- 43.- ROMMERTS, F.F.G., COOKE, B.A. and VAN DER MOLEN, H.J.  
"The Role of Cyclic AMP in the Regulation of Steroid  
Biosynthesis in Testis Tissue". J. Steroid. Biochem.  
5, 279-285, (1974).
- 44.- MOYLE, W.R. and RAMACHANDRAN, J. "Effect of LH on -  
Steroidogenesis and Cyclic AMP Accumulation in Rat -  
Leydig Cell Preparations and Mouse Tumor Leydig Cells".  
Endocrinology 93, 127-134, (1973).
- 45.- DUFAU, M.L., WATANABE, K. and CATT, K.J. "Stimula-  
tion of Cyclic AMP Production by the Rat Testis during

- Incubation with hCG In Vitro". *Endocrinology* 92, 6-11, (1973).
- 46.- MELDENSON, C., DUFAU, M.L. and CATT, K.J. "Gonadotropin Binding and Stimulation of Cyclic Adenosine 3'-5' Monophosphate and Testosterone Production in Isolated Leydig Cells". *J. Biol. Chem.* 250, 8818-8823, (1975).
- 47.- COOKE, B.A., LINDA, M.L. and JANSZEN, F.H.A. "Correlation of Protein Kinase Activation and Testosterone Production after Stimulation of Leydig Cell with Luteinizing Hormone". *Biochem. J.* 160, 439-446, (1976).
- 48.- PODESTA, E.J., DUFAU, M.L. and CATT, K.J. "Adenosine 3'-5' Monophosphate-Dependent Protein Kinase of Leydig Cells: In Vitro Activation and Relationship to Gonadotropin Action upon Cyclic AMP and Steroidogenesis". *FEBS Letters* 70, 212-216, (1975).
- 49.- CATT, K.J. and DUFAU, M.L. "Basic Concepts of the Mechanism of Action Peptide Hormones". *Biol. Reprod.* 14, 1-15, (1976).

- 50.- LANGAN, T.A. "Protein Kinases and Protein Kinase -- Substrates". In: *Advances in Cyclic Nucleotide Research*. Vol. 3, (P. Greengard and G.A. Robinson -- eds.). 109, (1973).
- 51.- PODESTA, E.J., DUFAU, M.L. and CATT, K.J. "Characterization of two forms of Cyclic 3'-5' Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase in Rat Testicular Interstitial Cells". *Mol. Cell. Endocr.* 5, 109-122, (1976).
- 52.- MEANS, R.A., FAKUNDING, J.L. and TINDALL, D.J. "Follicle Stimulating Hormone Regulation of Protein Kinase activity and Protein Synthesis in Testis". *Biol. Reprod.* 14, 54-63, (1976).
- 53.- DUFAU, M.L., TSURUHARA, T., HORNER, K.A., PODESTA, E. and CATT, K.J. "Intermediate Role of Adenosine 3'-5' Cyclic Monophosphate and Protein Kinase During Gonadotropin-Induced Steroidogenesis in Testicular Interstitial Cells". *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 74, 8, 3419-3423, (1977).

- 54.- MELDENSON, C., DUFAU, M.L. and CATT, K.J. "Dependence of Gonadotropin-Induced Steroidogenesis upon RNA - and Protein Synthesis in the Interstitial Cell of the Rat Testis". *Biochim. Biophys. Acta* 411, 222-230, -- (1975).
- 55.- COOKE, B.A., JANSZEN, F.H.A., CLOTSCHER, W.F. and VAN DER MOLEN, H.J. "Effect of Protein Synthesis Inhibitors on Testosterone Production in Rat Testis Interstitial Tissue and Leydig Cell Preparation". *Biochem. J.* 150, 413-418, (1975).
- 56.- HERMIER, C., COMBARNOUS, Y. and JUTISZ, M. "Role of a Regulating Protein and Molecular Oxygen in the Mechanism of Action of Luteinizing Hormone". *Biochim. Biophys. Acta* 244, 625, (1971).
- 57.- VAN DER VUSSE, G.J., KALKMAN, M.L. and VAN DER MOLEN, H.J. "Endogenous Steroid Production in Cellular and Subcellular Fractions of Rat Testis after Prolonged Treatment with Gonadotropins". *Biochim. Biophys. Acta*, 380, 473-485, (1975).

- 58.- WILLIAMS, C.D., HORNER, A.K. and CATT, K.J. "Effects of Methylxanthines on Gonadotropin Induced Steroidogenesis and Protein Synthesis in Isolated Testis Interstitial Cells". *Endocr. Res. Comm.* 3, 6, 343-358, -- (1976).
- 59.- JANSZEN, F.H.A., COOKE, B.A. and VAN DER MOLEN, H.J. "Specific Protein Synthesis in Isolated Rat Testis - Leydig Cells: Influence of Luteinizing Hormone and Cycloheximide". *Biochem. J.* 162, 341-346, (1977).
- 60.- JANSZEN, F.H.A., COOKE, B.A., VAN DRIEL, M.J.A. and VAN DER MOLEN, H.J. "LH Induction of a Specific -- Protein (LH-IP) in Rat Testis Leydig Cells". *FEBS - Letters*, 71, 2, 269-272, (1976).
- 61.- KARABOYAS, G.C. and KORITZ, S.B. "Identity of the - site of Action of 3'-5' Adenosine Monophosphate and Adrenocorticotrophic Hormone in Corticosteroidogenesis in Rat Adrenal and Beef Adrenal Cortex Slices". *Biochemistry* 4, 462-468, (1965).

- 62.- HALL, P.F. and KORITZ, S.B. "The Conversion of Cholesterol and 20 $\alpha$ Hydroxycholesterol to Steroids by Acetone Powder of Particles from Bovine Corpus Luteum" *Biochemistry* 3, 129-134, (1964).
- 63.- MOYLE, W.R., JUNGAS, R.L. and GREEP, R.O. "Influence of Luteinizing Hormone and Adenosine 3'-5' Cyclic Monophosphate on the Metabolism of Free and Esterified Cholesterol in Mouse Leydig-Cell Tumors". *Biochem. J.* 134, 415-424, (1973a).
- 64.- HAFIEZ, A.A., BARTKE, A. and LLOYD, C.W. "The Role of Prolactin in the Regulation of Testis Function; the Synergistic Effects of Prolactin and LH on the Incorporation of <sup>14</sup>C-Acetate into Testosterone and Cholesterol by Testis From Hypophysectomized Rats In Vitro". *J. Endocr.* 63, 223-230, (1972).
- 65.- KAN, K.W., RETTER, M.C., UNGAR, F. and DEMSEY, M.E. "The Role of a Carrier Protein in Cholesterol and Steroid Hormone Synthesis by Adrenal Enzymes". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 48, 423-429, (1972).

- 66.- SIMPSON, E.R. "Cholesterol Side-Chain Cleavage Cytochrome P 450, and the Control of Steroidogenesis". -- Mol. Cell. Endocr. 13, 213-117, (1979).
- 67.- CARON, M.G., GOLDSTEIN, S., SAVARD, K. and MARSH, J. M. "Protein Kinase Stimulation of a Reconstituted -- Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme System in the Bovine Corpus Luteum". J. Biol. Chem. 250, 5137-5143, (1975).
- 68.- SHIKITA, M. and TAMAOKI, B.I. "Testosterone formation by Subcellular Particles of Rat Testes". Endocrinology 76, 563-569, (1965).
- 69.- YANAHIRA, T. and TROEN, P. "Studies of the Human Testis. I. Biosynthetic Pathways for Androgen Formation in Human Testicular Tissue In Vitro". J. Clin. Endocr. Metab. 34, 6783-6792, (1972).
- 70.- VAN BEURDEN, A.M.O., ROODNAT, B., DE JONG, F.H., MULDER, E. and VAN DER MOLEN, H.J. "Hormonal Regulation of Isolated Leydig Cells of Immature Rats: the Effect of Hypophysectomy, FSH and Estradiol 17 $\beta$ ". Steroids, 28, 1-20, (1976).

- 71.- PURVIS, K. and HANSSON, V. "Hormonal Regulation of Leydig Cell Function". *Mol. Cell. Endocr.* 12, 123-138, (1978).
- 72.- SELIN, K.L. and MAGER, W.H. "The Effect of FSH on - LH Induced Testosterone Secretion in the Immature Hypophysectomized Male Rat". *Endocr. Res. Comm.* 4, 171-182, (1977).
- 73.- CHEN, Y.D.I., MICHAEL, J.S. and PAYNE, A.H. "Steroid and FSH action on LH Receptors and LH-Sensitive Testicular Responsiveness during Sexual Maturation of the Rat". *Mol. Cell. Endocr.* 8, 212-229, (1977).
- 74.- KETELSLEGERS, J.M., METZEL, W.C., SHERINS, R.J. and CATT, K.J. "Developmental Changes in Testicular Gonadotropin Receptors, Plasma Gonadotropins and Plasma Testosterone in the Rat". *Endocrinology* 103, 212-222, (1978).
- 75.- CHARREAU, E.H., ATTRAMADAL, A., TORJESEN, P.A., PURVIS, K., CALANDRA, R. and HANSSON, V. "Prolactin Binding in Rat Testis: Specific Receptors in Interstitial Cells". *Mol. Cell. Endocr.* 6, 303-307, (1977).

- 76.- ARAGONA, C., BOHNET, H.G. and FRIESEN, H.G. "Localization of Prolactin Binding in Prostate and Testis: - the Role of Serum Prolactin concentration on the Testicular LH Receptor". Acta Endocrinologica, 84, 402-409, (1977).
- 77.- NEGRO-VILAR, A., KRULICH, L. and McCANN, S.M. "Changes in Serum Prolactin and Gonadotropins During Sexual Development of the Male Rat". Endocrinology 93, 660-664, (1973).
- 78.- BARTKE, A. "Pituitary Testis Relationship: Role of Prolactin in the Regulation of Testicular Function". In: Progress in Reproductive Biology. Sperm Action. (P.O. Hubinot and M. L'Hermite. eds.). Vol. 1, 136-152, (1976).
- 79.- BOHNET, H.G. and FRIESEN, H.G. "Effect of Prolactin and Growth Hormone on Prolactin and LH Receptors in the Dwarf Mouse". J. Reprod. Fert. 48, 307-311, (1976).
- 80.- ZIP, W.B., PAYNE, A.H. and KELCH, R.P. "Prolactin, - Growth Hormone and LH in the Maintenance of Testicular

- Hormone Receptors". *Endocrinology* 103, 595-600, - (1978).
- 81.- BEX, F.J. and BARTKE, A. "Testicular LH Binding in the Hamster: Modification by Photoperiod and Prolactin". *Endocrinology* 100, 1223-1226, (1977a).
- 82.- PAYNE, A.H. and ZIPP, W.B. "Regulation of Leydig - Cell Function by Prolactin, Growth Hormone and Luteinizing Hormone". In: *Endocrine Approach to Male Contraception* (V. Hansson, M. Ritzen, K. Purvis, and F.S. French, eds.). 329-344, (1978).
- 83.- BARTKE, A. "Effects of Prolactin and Luteinizing Hormone on the Cholesterol Stores in the Mouse Testis". *J. Endocr.* 49, 317-324, (1971b).
- 84.- BARTKE, A., MUSTO, N., CALDWELL, B.V. and BEHRMAN, H. R. "Effects of a Cholesterol Esterase Inhibitor and of a Prostaglandin F<sub>2</sub> α on Testis Cholesterol and on Plasma Testosterone in Mice". *Prostaglandins*, 3, 97-104, (1973).

- 85.- MUSTO, N., HAFIEZ, A.A. and BARTKE, A. "Prolactin increases 17  $\beta$  Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in the Testis". *Endocrinology* 91, 1106-1108, (1972).
- 86.- BARTKE, A., GOLDMAN, B.D., BEX, F.J. and DALTERIO, S. "Effects of Prolactin (PRL) on Pituitary and Testicular Function in Mice with Hereditary PRL Deficiency". *Endocrinology* 101, 1760-1766, (1977).
- 87.- CLEMENS, J.A., MINAGUCHI, H., STOREY, R., VOOGT, J.L. and MEITES, J. "Induction of Precocious Puberty in Female Rats by Prolactin". *Neuroendocrinology* 4, -- 150-156, (1969).
- 88.- BARTKE, A. and DALTERIO, S. "Effects of Prolactin on the Sensitivity of the Testis to LH". *Biol. Reprod.* 15, 90-93, (1976).
- 89.- PHANKE, V.G., LEIDENBERGER, F.A. and KUNZING, H.J. "Correlation Between hCG (LH) Binding Capacity, Leydig Cell number and Secretory Activity of Rat Testis Throughout Pubescence". *Acta Endocr.* 79, 610-618, (1975).

- 90.- THORMER, M.O., EDWARDS, C.R.W., HANKER, J.P., ABRAHAM, G. and BESSER, G.M. "Prolactin and Gonadotropin Interaction in the Male". In: The Testis in normal and Infertile Men. (P. Troen and H.R. Nakin eds.). 351-366, (1977).
- 91.- BOYARD, R.M.; KAPEN, S., FINKELSTEIN, J.W., PERLOW, M., SASSIN, J.F., FUJUSTUMA, D.K., WEITZMAN, E.D. - and HELLEMAN, L. "Hypothalamic-Pituitary Function in Diverse Hyperprolactinemic States". J. Clin Invest. 53, 1588-1598, (1974).
- 92.- POSMER, B.J., KELLY, P.A., SHIU, R.P.C. and FRIESEN, H.G. "Estudies of Insulin, Growth Hormone and Prolactin Binding: Tissue Distribution, Species Variation and Characterization". Endocrinology 95, 521-531, - (1974).
- 93.- BARTKE, A., SMITH, M.S., MICHAEL, S.D., PERON, F.G. and DALTERIO, S. "Effects of Experimentally-Induced Chronic Hyperprolactinemia on Testosterone and Gonadotropin Levels in Male Rats and Mice". Endocrinology, 100, 182-186, (1977).

- 94.- SAEZ, J.M., MORERA, A.M., HAOUR, F. and EVAIN, D.  
"Effects of In Vivo Administration of Dexamethasone, Corticotropin and Human Chorionic Gonadotropin on Steroidogenesis and Protein and DNA Synthesis of Testicular Interstitial Cells in Prepuberal Rats".  
Endocrinology 101, 1256-1263, (1977).
- 95.- DOERR, D. and PIRKE, K.M. "Cortisol-Induced Suppression of Plasma Testosterone in Normal Adult Males".  
J. Clin. Endocr. Metab. 43, 622-629, (1976).
- 96.- BARTKE, A. "Influence of Thyroxine, GH, LH and Testosterone on Spermatogenesis in Dwarf Mice".  
Genetics 64, 55-56, (1970).
- 97.- BEX, F.J. and BARTKE, A. "Effects of Prolactin(PRL) and Growth Hormone (GH) on Testicular LH Receptor Levels in Hamster".  
Program 59 Meeting Endocrine Society, 168, (Abstract) (1977b).
- 98.- SWERLOF, R.S. and ODELL, W.D. "Modulating Influences of FSH, GH and Prolactin on LH-Stimulated Testosterone Secretion".  
In: The Testis in normal and --

Infertile Men (P. Troen and H.R. Nankin eds.). 395-401, (1977).

- 99.- VERJANS, H.L., DE JONG, F.H., COOKE, B.A., VAN DER MOLEN, H.J. and EIK-NESS, K.B. "Effect of Estradiol Benzoate on Pituitary and Testis Function in the Normal Adult Male Rat". *Acta Endocr. (Kbh)* 77, 636-652, (1974).
- 100.- VAN BEURDEN, W.M.O., MULDER, E., DE JONG, F.H. and VAN DER MOLEN, H.J. "The Effects of Estrogens on Luteinizing Hormone Plasma Levels and on Testosterone Production in Intact and Hypophysectomized Rats". *Endocrinology*, 101;342, (1977).
- 101.- ADLER, A., BURGER, H., DAVIS, J., DULHAMS, B., HUDSON, B., SARFATY, G. and STRATTON, W. "Carcinoma of Prostate: Response of Plasma Luteinizing Hormone and Testosterone to Oestrogen Therapy". *Brit. Med. J.* 1, 28, (1968).
- 102.- MULDER, E., BRINKMANN, A.O., LAMMERS-STAAHLHOFEN and VAN DER MOLEN, H.J. "Binding of the Estradiol by the Nuclear Fraction of Rat Testes Interstitial Tissue". *FEBS Letters* 31, 131-136, (1973).

- 103.- SAR, M., STUMPF, E., McLEAN, W.S., SMITH, A.A., -  
MANSSON, V., NAYFEH, S.N. and FRENCH, F.S. "Loca-  
lization of Androgen Target Cells in the Rat Tes-  
tis: Autoradiographic Studies". In: Hormonal Regu-  
lation of Spermatogenesis (F.S. French, V. Hansson,  
E.M. Ritzen and S.N. Nayfeh, eds.). 311, (1975).
- 104.- DORNER, G., STAHL, F., ROHDE, W. and SCHNORR, A.S.  
"An Apparently Direct Inhibitory Effect of Oestro-  
gen on the Human Testis". Endokrinologie 66, 221,  
(1975).
- 105.- PURVIS, K., CLAUSEN, O.P.F. and HANSSON, V. "Regu-  
lation of Leydig Cell Sensitivity and Responsiveness  
to LH/hCG". In: Endocrine Approach to Male Contra-  
ception (V. Hansson, M. Ritzen, K. Purvis, and F.S.  
Frehch, eds.). 247-263, (1978).
- 106.- JONES, T.M., FANG, V.S., LANDAU, R.L. and ROSENFELD,  
R. "Direct Inhibition of Leydig Cell Function by -  
Estradiol". Program. 57th Meet. Endocr. Soc. 148,  
(Abstr).

- 107.- TCHOLAKIAN, R.K., CHOWDHURY, M. and STEINBERG, E.  
"Time of Action of Estradiol 17  $\beta$  on Luteinizing  
Hormone and Testosterone". J. Endocr. 63, 411-412,  
(1974).
- 108.- BARTKE, A., WILLIAMS, K.I.H. and DALTERIO, S. --  
"Effects of Estrogens on Testicular Testosterone  
Production In Vitro". Biol. Reprod. 17, 645-649,  
(1977).
- 109.- VAN VEURDEN, W.M.O., ROODNAT, B. and VAN DER MOLEN,  
H.J. "Effects of Oestrogens and FSH on LH Stimula-  
tion of Steroid Production by Testis Leydig Cells  
from Inmature Rats". In: Endocrine Approach to Male  
Contraception (V. Hansson, K. Purvis, E.M. Ritzen, -  
and F.S. French, eds.). 374-383, (1978).
- 110.- DUFAU, M.L. HSUEH, A.J., CIGORRAGA, S., BAUKAL, A.J.  
and CATT, K.J. "Inhibition of Leydig Cell Function  
Through Hormonal Regulatory Mechanisms". In: Endo-  
crine Approach to Male Contraception. (V. Hansson, -  
K. Purvis, E.M. Ritzen, and F.S. French, eds.). 193-  
239, (1978).

- 111.- DORRINGTON, J.H., FRITZ, I.B. and ARMSTRONG, D.T.  
"Control of Testicular Estrogen Synthesis". Biol.  
Reprod. 18, 55-64, (1978).
- 112.- DE JONG, F.H., HEY, A.H. and VAN DER MOLEN, H.J.  
"Estradiol 17 $\beta$  and Testosterone in Rat Tissue. --  
Effect of Gonadotrophins, Localization and Produc-  
tion In Vitro". J. Endocr. 60, 409-419, (1974).
- 113.- CATT, K.J. and DUFAU, M.L. "Spare Gonadotropin Re-  
ceptors in Rat Testis". Nature New Biology 244, -  
219-221, (1973).
- 114.- ROMMERTS, F.F.G., COOKE, B.A., VAN DER KEMP, J.W.  
C.M. and VAN DER MOLEN, H.J. "Effect of Luteinizing  
Hormone on 3'-5' Cyclic AMP Testosterone Production  
in Isolated Interstitial Tissue of Rat Testis". -  
FEBS Letters 33, 114-118, (1973).
- 115.- MARSH, J.M. "The Role of Cyclic AMP in Gonadal Ste-  
roidogenesis". Biol. Reprod. 14, 30-53, (1976).

- 116.- JANSZEN, F.H.A., COOKE, B.A., VAN DRIEL, M.J.A. -  
and VAN DER MOLEN, H.J. "Purification and Characterization of Leydig Cells from Rat Testes". J. -  
Endocr. 70, 345-359, (1976).
- 117.- BARTKE, A. "Influence of Prolactin on Male Fertility in Dwarf Mice". J. Endocr. 35, 419-420,(1966).
- 118.- RUBIN, R.T., GOUVIN, P.R., LUBIN, A., POLAND, R.E.  
and PIRKE, K.M. "Nocturnal Increase of Plasma Testosterone in Men: Relation to Gonadotropins and Prolactin". J. Clin. Endocr. Metab. 40, 1017-1033, (1975).
- 119.- NIEMI, M. and IKONEN, M. "Histochemistry of the -  
Leydig Cells in the Postnatal Prepubertal Testis of the Rat". Endocrinology 72, 443-446, (1963).
- 120.- LEVY, H., DEANE, H.W. and RUBIN, B.L. "Visualization of Steroid 3  $\beta$  -ol-deshydrogenase Activity in Tissues of Intact and Hypophysectomized Rats". Endocrinology 65, 933-943, (1959).

- 121.- DINENDHAL, V. "A rapid and Simple Procedure for -  
the Determination of Guanosine 3'-5' Monophosphate  
by use of the Protein Binding Method". NAUNYN. --  
SCHMIEDEBERG'S. ACH. PHAMACOL. 284, 55-65, (1974).
- 122.- BROWN, B.L., ALBANO, J.D.N., FRINKS, R.P. and --  
SYHERZI, A.M. "A Simple and Sensitive Saturation  
Assay Method for the Measurement of Adenosine 3'5'  
Cyclic Monophosphate". J. Biol. Chem. 121, 561-562,  
(1971).
- 123.- STEINER, A.L., PARKER, L.W. and KIPNIS, D.M. "Ra-  
dioimmunoassay for Cyclic Nucleotides". J. Biol. -  
Chem. 247, 1106-1112, (1972).
- 124.- HARPER, P.J. and BROOKER, G. "Fentomole Sensitive  
Radioimmunoassay for Cyclic AMP and Cyclic GMP after  
2'0' acetylation by Acetic Anhidride in Aqueous So-  
lution". Journal of Cyclic Nucleotide Research 1,  
207-218, (1975).
- 125.- VERJANS, H.L., COOKE, B.A., DE JONG, F.H., DE JONG,  
C.M.M. and VAN DER MOLEN, H.J. "Evaluation of a Ra-  
dioimmunoassay for Testosterone Estimation". J. Ste-  
roid. Biochem. 4, 665-676, (1973).

- 126.- ERLANGER, B.F., BOREK, F., BEISER, S.M. and LIEBERMAN, S. "Steroid-Protein Conjugates. Preparation and Characterization of Conjugates of Bovine Serum Albumin with Testosterone and with Cortisone". J. Biol. Chem. 228, 713-717, (1957).
- 127.- SCATCHARD, G. "The Attraction of Protein for Small Molecules and Ions". Ann. N.Y. Ac. Sc. 51, 660-672, (1949).
- 128.- FELDMAN, H. and RODBARD, D. "Mathematical Theory of Radioimmunoassay". In: Principles of competitive Protein-Binding Assays. (V.D. Odell, W.H. Dughaday, eds.). 158-203, (1971).
- 129.- MURAD, F., MANGANIELLO, V. and VAUGHAN, M. "A Simple Sensitive Protein-Binding Assay for Guanosine - 3'-5' Monophosphate". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 4, 736-739, (1971).
- 130.- FURUYAMA, S., MAYES, D.M. and NUGENT, C.A. "A Radioimmunoassay for Plasma Testosterone". Steroids, 16, 415-428, (1970).

- 131.- BARTKE, A. and LLOYD, C.W. "Influence of Prolactin and Pituitary Isografts on Spermatogenesis in Dwarf Mice and Hypophysectomized Rat". J. Endocr. 46, 321-329, (1970).
- 132.- SEGAL, S., POLISHUK, W.Z. and BEN-DAVID, M. "Hyperprolactinemic Male Infertility". Fertility and Sterility, 27, 12, 1425-1427, (1976).
- 133.- FOSSATI, P., L'HERMITE, M., ASFOUR, M. and BOUTEMY, J.J. "Infertility with Hyperprolactinemia in a Male Displaying Radiologic Signs of Pituitary Microadenoma". In: Sperm Action (P.O. Hubinot, M. L'Hermite, and J. Schwers, eds.). 153-156, (1976).
- 134.- SVARE, B., BARTKE, A., DOHERTY, P., MASON, I., MICHAEL, S.D. and SMITH, M.S. "Hyperprolactinemia Suppresses Copulatory Behavior in Male Rats and Mice". Biol. Reprod. 21, 529-535, (1979).
- 135.- STEINER, A.L., KIPNIS, D.M., UTIGER, R. and PARKER, C. "Radioimmunoassay for the Measurement of Adenosine 3'-5' Cyclic Phosphate". Biochemistry, 64, - 367-373, (1969).

- 136.- GILL, G.N. and GARREN, L.D. "A Cyclic 3'-5' Adenosine Monophosphate Dependent Protein Kinase from the Adrenal Cortex: Comparison with a Cyclic AMP Binding Protein". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 3, 335-343, (1970).
- 137.- YALOW, R.S. and BERSON, S. "Problems of Validation of Radioimmunoassays". In: *Principles of Competitive Protein Binding Assays*. (W.D. Odell, and W.H. Daughaday, eds.). 374-400, (1971).
- 138.- TSANG, C.P., LEHOTAY, D.C. and MURPHY, B.F. "Competitive Binding Assay for Adenosine 3'-5' Monophosphate Employing a Bovine Adrenal Protein: Application to Urine, Plasma and Tissues". *J. Clin. Endocr. Metab.* 35, 809-817, (1972).
- 139.- LATNER, A.L. and PRUDHOE, K. "A Simplified Competitive Protein Binding Assay for Adenosine 3'-5' Monophosphate in Plasma". *Clinica Chimica Acta*, 48, -- 353-357, (1973).
- 140.- TOKEY, K.C., OLDHAM, K.G. and WHELAN, J.A.M. "A Simple Direct Assay for Cyclic AMP in Plasma and other

Biological Samples Using an Improved Competitive Protein Binding Technique". *Clinica Chimica Acta*, 56, 221-234, (1974).

- 141.- AKSNES, L. and SÖVIK, O. "A Protein Binding Assay for Direct Determination of Adenosine 3'-5' Monophosphate in Amniotic Fluid, Cerebrospinal Fluid, Plasma, and Urine". *Scad. J. Clin. Lab. Invest.* 36, 289-298, (1976).
- 142.- CAILLA, H.L., RACINE-WEISBUH, M.S. and DELAAGE, M. A. "Adenosine 3'-5' Cyclic Monophosphate Assay at  $20^{-15}$  Mole Level". *Analytical Biochemistry* 56, 394-407, (1973).
- 143.- WILLIAMS, C. and CATT, K.J. "Actions of Chorionic Gonadotropin upon Cyclic AMP and Cyclic GMP in Isolated Testicular Interstitial Cells". *FEBS Letters*, 69, 1, 186-190, (1976).
- 144.- FOLMAN, Y., SOWELL, J.G. and EIK-NES, K.B. "The Presence and Formation of  $5\alpha$ -dihydrotestosterone in Rat Testes In Vivo and In Vitro". *Endocrinology*, 91, 702-710, (1972).

- 145.- VAN DER MOLEN, H.J., GROOTEGOED, J.A., DE GREEGF-BIJLEVELD, M.J., ROMMERTS, F.F.G. and VAN DER VUSSE, G.J. "Distribution of Steroids, Steroid Production and Steroid Metabolizing Enzymes in Rat Testes". In: Hormonal Regulation of Spermatogenesis. (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen and S. N. Naufeh, eds.). 3-23, (1975).
- 146.- COOKE, B.A. "Mechanism of LH and FSH Action on the Testis". In: Eukaryotic Cell Function and Growth. (J.E. Dumont, B.K. Brown and N.J. Marshall, eds.). 653-666, (1976).
- 147.- HONN, K.V. and CHAVIN, W. "ACTH Control of Adrenocortical CGMP". General and Comparative Endocrinology, 26, 374-381, (1975).
- 148.- HARRINGTON, C.A., FENIMORE, D.C. and FARMER, R.W. "Regulation of Adrenocortical Steroidogenesis by Cyclic 3'-5' Guanosine Monophosphate in Isolated Rat Adrenal Cells". Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1, 55-61, (1978).

- 149.- DUFAU, M.L., MELDENSON, C. and CATT, K.J. "A Highly Sensitive In Vitro Bioassay for Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin: Testosterone Production by Dispersed Leydig Cells". J. Clin. Endocr. Metab. 39, 610-613, (1974).
- 150.- COOKE, B.A., LINDH, L.M. and JANSZEN, F.H.A. "Role of Cyclic AMP in Steroidogenesis in Leydig Cells: - Discrepancies between Effects of Luteinizing Hormone and Cholera Toxin". FEBS Letters, 73, 1, 67-73, (1977).
- 151.- PALFREYMAN, J.W. and SCHULSTER, D. "On the Mechanism of Action of Cholera Toxin on Isolated Rat Adrenocorticotropin on Steroidogenesis and Cyclic AMP - output". Biochem. Biophys. Acta 404, 221-230, (1975).
- 152.- SHERIFF, D.S. and GOVINDARAJULU, P. "Role of Prolactin on the Development of the Prepubertal Testes of the Rat". Hormone Research. 9, 161-168, (1978).

- 153.- RUBIN, R.T., POLAND, R.E. and TOWER, B.B. "Prolactin Related Testosterone Secretion in Normal Adult Men". *J. Clin. Endocr. Metab.* 42, 112-116, (1976).
- 154.- RUBIN, R.T., POLAND, R.E., SOBEL, I., TOWER, B.B. and ODELL, W.D. "Effects of Prolactin and Prolactin plus Luteinizing Hormone on Plasma Testosterone Levels in Normal Adult Men". *J. Clin. Endocr. Metab.* 47, 447-452, (1978).
- 155.- HOLT, J.A., RICHARDS, J.S., MIDGLEY, A.R. and REICHERT, L.A. "Effects of Prolactin on LH Receptor in Rat Luteal Cells". *Endocrinology*, 98, 1005-1013, (1976).
- 156.- GRANDISON, L., HODSON, C., CHEN, H.T., ADVIS, J., SIMPKINS, J. and MEITES, J. "Inhibition by Prolactin of Post-Castration Rise in LH". *Neuroendocrinology*. 23, 312-322, (1977).
- 157.- WINTERS, S.J. and LORIAUX, D.L. "Suppression of Plasma Luteinizing Hormone by Prolactin in the Male Rat". *Endocrinology*, 102, 864-868, (1978).

- 158.- SMITH, O.W. and HAFS, H.D. "Competitive Protein - Binding and Radioimmunoassay for Testosterone in - Bulls and Rabbits Blood Serum Testosterone after - Injection of LH or Prolactin in Rabbits". Proc. - Soc. Exp. Biol. Med. 142, 904, (1973).
- 159.- DANUTRA, V., CHANDLER, J.A., HARPER, M.E. and GRIFFITHS, K. "Effects of 2-Br- $\alpha$ -ergocryptine (CB-154) on Plasma Hormones an Accessory Sex Organs in the Male Rat". Acta Endocr. (Kbh) 73, 23-29,(1973).
- 160.- NAGULESPAREN, V. and JENKINS, J.S. "Bromocriptine Treatment of Males with Pituitary Tumors, Hyperprolactinemia and Hypogonadism". Clin. Endocr. 9, 73-79, (1978).
- 161.- BARTKE, A., HAFIEZ, A. A., BEX, F.J. and DALTERIO, S. "Hormonal Interactions in Regulation of Androgen Secretion". Biol. Reprod. 18, 44-54, (1978).
- 162.- MAGRINI, G., EBINER, J.R., BURCKHARDT, P. and FELBER, J.P. "Study on the Relationship between Plasma Prolactin Levels and Androgen Metabolism in Man". J. - Clin. Endocr. Metab. 43, 944-947, (1976).

- 163.- DOERR, P. and PIRKE, K.M. "Cortisol-Induced Suppression of Plasma Testosterone in Normal Adult Males". J. Clin. Endocr. Metab. 43, 622-629, (1976).
- 164.- KINSON, G.A. and LIU, C.C. "Further Evidence of - Inherent Testicular Rhythms in the Laboratory Rat". J. Endocr. 56, 337-338, (1973).
- 165.- MOCK, E.J., KAMEL, F., WRIGHT, W.W. and FRANKEL, A. I. "Seasonal Rhythm in Plasma Testosterone and -- Luteinizing Hormone of the Male Laboratory Rat". Nature 256, 62-63, (1975).
- 166.- FROWEIN, J. and ENGEL, W. "Binding of Human Chorionic Gonadotropin by Rat Testis: Effect of Sexual Maturation, Cryptorchidism and Hypophysectomy". J. Endocr. 64, 59-64, (1975).
- 167.- THANKI, K.H. and STEINBERGER, A. "<sup>125</sup>I-LH Binding to Rat Testes at Various Ages and Posthypophysectomy". Endocr. Res. Commun. 3, 49-52, (1976).

