



24
17

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

**EFFECTO DE ESTRADIOL SOBRE LA ACTIVIDAD
ESTEROIDOGÉNICA TESTICULAR DE
RATAS MACHO ADULTAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A :

María Guadalupe Rodríguez Vidal

Asesores de Tesis :

M. en B. E. Joaquín Herrera Muñoz

Biólogo: Enrique Mendieta Márquez

**TESIS CON
FALLA LE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

1. INTRODUCCION
 - 1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS
 - 1.2. ANATOMIA TESTICULAR
 - 1.3. FISIOLOGIA DEL TESTICULO
 - 1.4. ESTEROIDOGENESIS TESTICULAR
 - 1.5. ORGANOS ANDROGENO - DEPENDIENTES
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
3. OBJETIVOS
4. HIPOTESIS DE TRABAJO
5. MATERIALES Y METODOS
 - 5.1. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES Y OBTENCION DEL MATERIAL BIOLOGICO
 - 5.2. DETERMINACION CUANTITATIVA DE ESTEROIDES POR MEDIO DEL METODO DE RADIOINMUNOANALISIS
 - 5.3. DETERMINACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS POR EL METODO DE GROVES
 - 5.4. ANALISIS ESTADISTICO
6. RESULTADOS
7. ANALISIS DE RESULTADOS
8. CONCLUSIONES
9. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUCCION.

1.1. Antecedentes Historicos.

Aproximadamente hace 2300 años. Aristóteles notó la analogía en los efectos de la castración entre niños y pájaros sexualmente inmaduros, también indicó los cambios regresivos que ocurren en el gallo después de la castración, incluyendo pérdida de la fertilidad, agresión, comportamiento sexual y características sexuales secundarias tales como la cresta y los espolones. Estas observaciones sugieren una amplia influencia fisiológica de las gonadas (1).

No fue sino hasta 2200 años más tarde, cuando el fisiólogo alemán A. A. Berthold (1849), demostró que la cresta de los gallos castrados no se atrofiaba si los testículos eran extirpados y colocados sueltos dentro de la cavidad abdominal del animal, supuso que la acción de los testículos sobre la cresta del gallo se ejercía a través de la sangre. Sus experimentos son considerados como el punto de inicio de la Endocrinología al proporcionar las primeras evidencias convincentes de la presencia de agentes que más tarde fueron llamados *Hormonas* (1,2,3,4).

Claude Bernard (1855-1878), estableció el proceso regulatorio dentro del organismo e inició el concepto en términos precisos y modernos (5).

En 1903, se encontraron lípidos en células de Leydig; sugiriéndose que la secreción interna del testículo es de naturaleza lípida (6).

En 1911, Pezard demostró que la inyección de extractos de testículo en solución salina era también efectivo en restaurar el crecimiento de la cresta en el capón (7).

Grandes esfuerzos fueron hechos por químicos para aislar las sustancias promotoras ó andrógenos; y en el año de 1935, Leslie

purificó la hormona esteroide, la T, del testículo de toro (8).

Experimentos subsiguientes establecieron que la T es el principal andrógeno secretado por el testículo de todos los animales; dándose a conocer más tarde su estructura (9).

El avance tecnológico en el desarrollo de métodos más sensibles para la separación e identificación de hormonas, han permitido la utilización de pequeñísimas cantidades de sustrato y tejido. La introducción de cromatografía de papel para esteroides de 19 átomos de carbono (C-19) permite utilizar menos de 50 mg de esteroide así como una cantidad comparable de tejido. La disponibilidad comercial de hormonas marcadas con ^{14}C - ^3H (Tritio), además de la introducción de cromatografía en capa fina, y cromatografía de gas para la separación; y espectrometría de masas para la identificación, dan como resultado una reducción gradual en el uso de sustratos de 100 a 200 ng y de homogeneizados, fracciones de 1 a 10 mg. Estos adelantos tecnológicos han permitido un incremento en el número de estudios de algunas especies animales, incluyendo el humano, en varias condiciones fisiológicas (9).

1.2. Anatomía Testicular.

El aparato reproductor masculino está formado por las siguientes cuatro estructuras con funciones diferentes:

- 1) Dos gónadas, los testículos; 2) Un órgano copulador, el pene; 3) Una larga y complicada serie de tubos y túbulos; 4) Glándulas anexas, que contienen una gran cantidad de músculo liso en sus paredes (10).

Son órganos bilaterales, uno usualmente de mayor tamaño que el otro. Cada uno es un órgano ovoide, midiendo aproximadamente 4 a 5 cm de largo y de 2 a 3 cm de diámetro, en el hombre pesan cerca de 30 g (11,12).

Los testículos se desarrollan dentro de la cavidad abdominal, pero en el hombre y en otros mamíferos descienden poco antes o después del nacimiento al saco escrotal, una evaginación de la pared corporal

cubierta por una bolsa laxa de piel. La posición de los testículos en el escroto y la dirección de su eje longitudinal en relación con el cuerpo varía con la especie. En los ruminantes son pendulosos con su eje longitudinal en posición vertical; en los equinos y caninos el eje longitudinal se acerca mucho a la horizontalidad; y en el cerdo el eje se encuentra diagonal.

El escroto además de proteger al testículo, mediante su tónica dartos ayuda junto con el músculo cremáster y la disposición anatómica de la vena espermática a mantener la temperatura adecuada para la espermatogénesis. El descenso normal de los testículos al escroto es necesario para la producción de espermatozoides (4.7).

Son glándulas tubulares compuestas, rodeadas por una gruesa cápsula fibrosa, llamada la Túnica Albugínea, que es rica en tejido fibroso blando. Al nivel del borde posterior de cada testículo se da un engrosamiento de tejido conectivo que penetra en la glándula para formar un tabique vertical incompleto. Como tiende a hallarse en el centro de la glándula, este tabique incompleto y la porción engrosada de la cápsula que le ha dado origen recibe el nombre de Mediastino (10) el cual está formado de un sistema plexiforme de conductos revestidos de epitelio, el denominado Rete de Testis. Unos delgados tabiques fibrosos los Septula Testis, se extienden radialmente a partir del mediastino hasta la túnica albugínea, y dividen al órgano en unos 200 compartimentos piramidales; los Lobulillos testiculares (11).

En la cara interna de la túnica albugínea, el tejido conjuntivo denso cede su lugar a una capa más laxa, provista de numerosos vasos sanguíneos, la Túnica Vascular.

Cada testículo está suspendido en el escroto por el extremo de un largo pedículo vascular, el Cordón Espermático, que está formado por el conducto ecretor del testículo, el Conducto Deferente, y los vasos sanguíneos y nervios que llegan al testículo (12).

A continuación se realizará una descripción breve de los principales departamentos de este órgano:

Túbulos Seminíferos.

La masa Testicular está compuesta predominantemente por los túbulos seminíferos, comprendiendo aproximadamente un 90% en volumen (14), miden entre 0.12 y 0.3 mm de diámetro y de 30 a 70 cm de largo (11).

La arquitectura fundamental del epitelio seminífero está constituido por dos categorías principales de células; las células de Sertoli (CS) y las células espermatogénicas que se encuentran rodeando a las CS (13).

Las CS tienen una configuración tridimensional bastante compleja, pero pueden imaginarse como células esencialmente cilíndricas, su contorno es irregular por formar el sostén de las células germinales, cada CS se extiende centripetamente sobre la lámina basal del tubo seminífero al centro del lumen.

Cuando las CS forman complejos de unión especiales cerca de la base del epitelio seminífero, sus superficies membranales se fusionan formando áreas oclusivas que junto con el tejido peritubular constituyen la Barrera Hemato-testicular. Esta barrera divide al epitelio en un compartimiento basal, que contiene las espermatogonias y los espermatoцитos preleptoténicos y un compartimiento yuxtaluminal, que contiene las fases más avanzadas de diferenciación de las células germinales, permitiendo así de esta manera, que las CS mantengan en este último compartimiento un microambiente diferente y adecuado para la diferenciación de las células germinales (15,16) ya que además esta barrera limita el paso de moléculas por el restante espacio tubular del testículo y viceversa (15,17,18).

Estas CS además de proporcionar el apoyo mecánico y la protección a las células germinales en desarrollo, están involucradas en la síntesis de proteínas, en la fagocitosis de las células germinales en degeneración y de los cuerpos residuales, en el metabolismo de esteroides, participan en el transporte de nutrientes y parecen desempeñar un papel activo en la liberación de los espermatozoides maduros (19).

La actividad funcional de las CS esta también modulada por los estadios del ciclo espermatogénico. Las múltiples interacciones bidireccionales entre las CS y las células germinales pueden ser mediadas por cualquier contacto directo de célula-célula, lo cual es muy desarrollado entre estas células y/o a través de difundibles factores paracrinos (6).

Durante la diferenciación progresiva de las células de la región basal del tubo a el lumen, la proliferación desplaza a las células hacia el interior del tubo en tanto que las más cercanas a el lumen se transforman en células libres móviles, los espermatozoides, dicho proceso se denomina Espermatogénesis.

Por conveniencia, la espermatogénesis suele describirse en 3 fases principales. En la primera, llamada espermatocitogénesis, las espermatogonias proliferan por división mitótica. En la segunda fase, la meiosis, los espermatocitos sufren dos divisiones de maduración produciendo las espermátides. En la tercera fase, llamada espermiogénesis, las espermátides sufren una serie de transformaciones citológicas que dan origen a la formación de espermatozoides (13).

La espermatogénesis se inicia con las células germinales primordiales, las espermatogonias, localizadas adyacentemente a la membrana basal del tubo; las cuales se clasifican en dos tipos distintos de células, A y B (11,20). Las espermatogonias de tipo A son las células básicas que se someten a división mitótica, formando células claras (Ap) y células oscuras (Ad), estas últimas se transforman en espermatogonias de tipo B, las cuales se dividen por mitosis y se diferencian para producir una nueva generación de células germinales; los espermatocitos primarios, estas células diploides son las células más grandes encontradas a nivel celular. Dichas células a continuación tienen la primera división meiótica formando dos células más pequeñas; los espermatocitos secundarios, cada uno de los cuales contiene el mismo número de cromosomas de las células primarias, estas células son poco frecuentes (21).

Los espermatocitos secundarios se dividen pronto por la segunda división meiótica y cada uno forma dos células más pequeñas; llamadas espermátides que se encuentran en el citoplasma de los extremos libres

de las CS. Las espermátides, ya no se dividen sino que tienen ahora una serie de cambios morfológicos, con formación final de espermatozoides, proceso llamado Espermiogénesis (10,11,12), en el cual sucede lo siguiente:

El núcleo de la espermátide se condensa, se aplana y se alarga un poco formando la mayor parte de la cabeza del espermatozoide.

El primer signo de diferenciación de un componente específico del espermatozoide es la aparición de uno ó de varios granulos que se encuentran dentro de las vacuolas del aparato de Golgi que entran en coalescencia para formar la granulación acrosómica. Esta a continuación se disemina sobre la superficie del núcleo como una cubierta delgada denominada capuchón acrosómico.

Los centriolos se mueven hacia un lado del núcleo, en sentido opuesto al capuchón acrosómico. Ahí, uno de los centriolos origina un Filamento Axial (FA) que crece hacia el exterior y atraviesa la superficie celular. Al mismo tiempo, las mitocondrias emigran hacia el FA y se distribuyen alrededor del mismo en forma de vaina ó collar.

En el extremo distal del collar mitocondrial hay una estructura de tipo anular, llamada anillo terminal. El collar y el anillo terminal se encuentran dentro de la parte media ó cuerpo del espermatozoide.

El resto del citoplasma se desprende del espermatozoide en desarrollo y se absorbe. El espermatozoide formado por completo deja ahora las CS y queda libre dentro del lúmen y del túbulo seminífero. A partir de este momento aunque tienen madurez morfológica no son bioquímicamente activos, lo cual es adquirido mediante un proceso de activación que precede a la fertilización.

Se ha calculado que la duración total de la espermatogénesis en el hombre desde la espermatogonia a espermatozoide es de 74 ± 5 días y en la rata es de 7 ± 4 días (11,22).

El número de asociaciones ó estadios celulares del ciclo del epitelio seminífero varía con la especie en particular, por ejemplo en la rata se sabe de 14 (1), en el cobayo de 12 y en el humano se sugieren 5 estadios (Figura 1) la duración de este último ciclo fue determinado mediante análisis autoradiográficos de biopsias

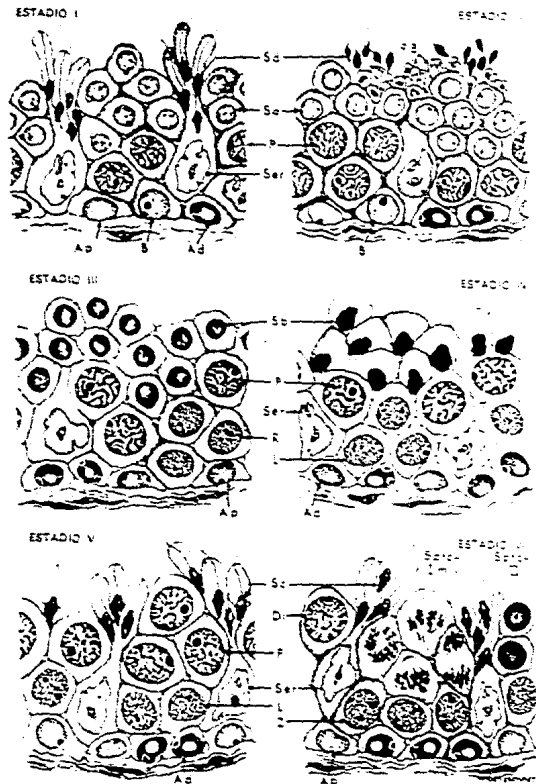


Figura 1. Esquemas de las seis asociaciones celulares reconocibles del ciclo del epitelio seminífero humano. Ser, célula de Sertoli; Ad y Ap, espermatogonias tipo A, oscura y pálida; B, espermatogonia tipo B; R, espermato cito primario en reposo; L, espermato cito leptóteno; D, espermato cito zigóteno; P, espermato cito paquíteno; D_i, espermato cito diplóteno; — Sptc-Ia, espermato cito primario en división; Sptc-II, espermato cito se cundario en interfase; As, Sb, Sc, Sd, espermátidas en varias fases de diferenciación; RR, cuerpos residuales de Regnaud. Tomado de Bloom y - col., (13), p. 821.

testiculares (13).

La espermatogénesis es dependiente de una alta concentración local de T, aunque no existen evidencias directas acerca de cualquier evento andrógeno-dependiente durante la espermatogénesis, varias observaciones morfológicas y bioquímicas sostienen el concepto de que algunos estadios del ciclo del epitelio seminífero pueden ser más dependientes por la estimulación de andrógenos que por otros, particularmente en los estadios VII y VIII en la rata (1,14,23).

Tejido Intersticial.

El tejido intersticial se localiza entre los tubulos seminíferos (Figura 2) y esta formado por fibras de colágena, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y pocos tipos celulares como son; fibroblastos, macrófagos, ocasionales células cebadas y algunas células mesenquimatosas relativamente indiferenciadas que ante estímulos gonadotróficos pueden dar lugar a las Células de Leydig (CL) (13), las cuales sintetizan y liberan la hormona masculina la T.

En la rata las CL aparecen entre el día 15-18 del periodo de gestación las cuales comienzan a producir la T (24) y declina su producción en los primeros 10-15 días de vida postnatal (25).

El desarrollo del fenotipo masculino durante la embriogénesis esta bajo el control de la T formada en el testículo fetal. Al parecer en el embrión humano la secreción de la T se inicia después de la diferenciación histológica del testículo fetal, que comienza a organizarse a las 7-8 semanas de gestación. El máximo contenido de la T del testículo fetal se encuentra entre las 10-15 semanas que se correlaciona con el máximo nivel de la T plasmática. La producción de la T durante las semanas 8-12 del desarrollo embrionario es esencial para el desarrollo normal del hombre y la formación del tracto urogenital masculino se completa en las semanas 12-13 (26), estas células intersticiales son muy abundantes en el cuarto mes de desarrollo embrionario. La T es secretada de forma local y produce inducción del sistema de conductos mesonefricos con formaciones de los conductos eferentes del testículo, el epididimo, los vasos deferentes

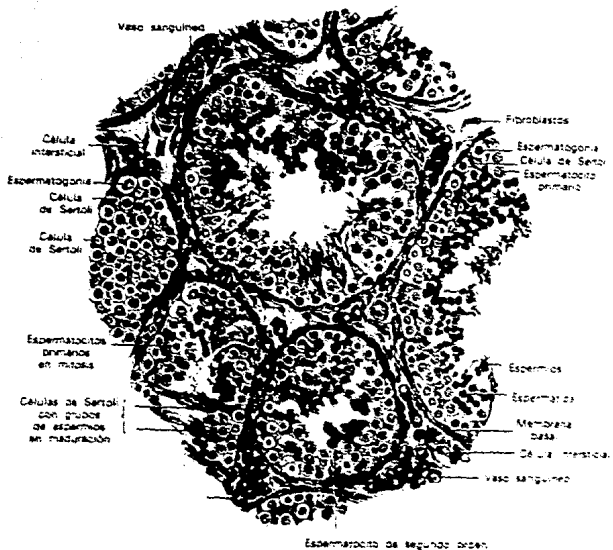


Figura 2. Corte de un testículo humano. Los túbulos cortados muestran diferentes fases de la espermatogénesis 170 X. Tomado de Bloom y col., (13). Pp. 806.

y las vesículas seminales (15). Después del nacimiento, las CL entran en un periodo de latencia sin tener ninguna influencia durante la infancia, posteriormente aumentan en cantidad después de la pubertad en donde al ser estimuladas por las hormonas gonadotróficas de la hipófisis empiezan a secretar T y A (27).

La T es necesaria en una concentración alta para mantener la espermatogénesis de los tubulos seminíferos (28); la que se encuentra circulando en la sangre es esencial para mantener la función de las glándulas accesorias del sexo masculino, incluyendo la próstata, el epididimo, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales, también es responsable de las características sexuales secundarias, ejerce substancial actividad anabólica sobre algunos órganos blanco no sexuales tales como la piel, apéndice, músculo esquelético, la médula del hueso y en el riñón. De igual manera ejerce profunda actividad metabólica sobre algunos tejidos linfáticos (el timo).

Para el humano la tasa de secreción de la T, es de 4 a 9 mg/día en el varón normal. La cifra de T plasmática (libre y unida) es aproximadamente de 0.85 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ en los varones adultos y de 0.63 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ en las mujeres adultas. Estas cantidades declinan con la edad en los varones (12,29,30).

El tejido intersticial varía dependiendo de la especie en cuestión. En el humano, es un tejido conjuntivo laxo excepcionalmente rico en líquido extracelular. En el cerdo, el caballo y la zarigüeya; las CL son muy abundantes ocupando la mayor parte del espacio intertubular. En la rata, constituyen solo el 1% del volumen testicular, se calcula que hay 22 millones de CL por gramo de testículo y 3720 cm^2 de retículo endoplásmico liso por gramo de tejido testicular y cada CL secreta cerca de 1.5 fmoI de T por día (13,15).

Las CL presentan características estructurales específicas al término de su completo desarrollo;

1) Se encuentran en grupos de tamaño variable a veces unidas a los vasos sanguíneos.

2) Ordinariamente de forma poliédrica irregular, de 14 a 20 μm de diámetro, cuando se compactan unas con otras, pero cuando están

separadas, pueden ser alargadas o fusiformes.

3) Su núcleo redondeado contiene una pequeña cantidad de heterocromatina dispuesta periféricamente con uno ó dos nucleolos, siendo frecuentemente binucleadas.

4) Prominente complejo de Golgi y un extenso retículo endoplásmico liso comprendiendo un área de 10.500 μm^2 , el cual contiene las enzimas necesarias para la biosíntesis de andrógenos.

5) Gran cantidad de mitocondrias, alcanzando la cifra de 600 por célula, estas varían en forma y tamaño.

Como resultado de estos datos morfométricos las CL son capaces de producir unas 10.000 moléculas de T por segundo.

6) Una característica particular es la presencia de cristales citoplasmáticos, cuyo grosor es 1 a 3 μm y de 20 μm de largo. Estos cristales de Rinte son exclusivos de la mayor parte de los varones desde la pubertad hasta la etapa senil. Son objeto de estudio por su variada abundancia y desconocida funcionalidad (13).

Rommerts y col., (31) mencionan que las CL también producen prostaglandinas, opionatos, angiotensinas y otros esteroides como son la 17-OHProg y E₂.

El E₂ es el principal estrógeno biológicamente activo en la mujer (7,15), estos son secretados por las células de la teca del folículo ovárico, por la placenta, la corteza suprarrenal y además se producen en menor cantidad fuera de estas glándulas por transformaciones de los esteroides no estrógenos (T y A) (32,33). Esta conversión de andrógenos a estrógenos involucra tres reacciones distintas genéricas que son catalizadas por el sistema enzimático P450 aromatasa (34). Experimentos in vitro con precursores marcados radiactivamente indican que en el tejido testicular de la rata tanto las CL como las CS participan en la síntesis de estrógenos (35). Callard y col., (36) mencionan que la T es un andrógeno aromatizado y que la aromatasa está asociada con las CS durante los estadios críticos de la proliferación de las espermatogonias en ratas inmaduras y con las CL en las ratas adultas. Payne y col., (37) y otros autores (38) demuestran que las CS son el principal sitio de aromatización en ratas neonatales y las CL son el principal ó el único sitio de aromatización durante el

desarrollo de la pubertad.

La síntesis de los estrógenos es importante durante el desarrollo de individuos prepúberes. Las posibles funciones de los estrógenos durante este periodo incluyen un efecto local en los tubulos seminíferos para preparar el medio adecuado para la iniciación de la espermatogénesis, provocando un segundo efecto sobre la producción de la T (39).

Cuando se administra continuamente altas dosis de E₂ a ratas adultas resulta una "hipofisectomía fisiológica" originando una inhibición del crecimiento y una regresión gonadal. Las dosis requeridas de E₂ en cualquier especie para causar un efecto particular varía ampliamente, por ejemplo, los ratones son mucho más resistentes que las ratas y los conejos. Cambios directos sobre los órganos accesorios del macho son también llevados a cabo por el tratamiento de estrógenos. En el hombre normal se presenta mayor resistencia a los efectos por E₂ que en hombres castrados (40).

Del mismo modo que la T desarrolla los caracteres sexuales masculinos, los estrógenos desarrollan los caracteres sexuales femeninos, intervienen en los procesos de la ovulación, implantación, embarazo, parto, lactancia. En las gallinas, determinan la pigmentación de las plumas (2,4). En animales como la rata y ratón los estrógenos provocan cambios conductuales y un estado de estró (41).

Se han mostrado evidencias de los variables efectos que producen los estrógenos en la economía vital y en particular del E₂ por ser el más activo.

La inhibición de la espermatogénesis por estrógenos fue demostrado primeramente en la rata, posteriormente fue observado en otras especies de mamíferos, en hamster, cuyo, toro, iso y en el hombre. Este efecto fue considerado secundario al suprimirse la liberación de gonadotropinas de la adenohipófisis por los estrógenos (42).

Datos referentes a los cambios producidos por el E₂ sobre la

secreción de la Hormona Luteinizante (LH) indican que el Ez responde diferentemente durante periodos cortos y largos de tratamiento (37).

Kalra y col. (43) encontraron que el Ez así como la T actúan en el sistema nervioso central (SNIC) para inhibir la secreción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH).

Bajo condiciones de cultivo, Laws y col. (44) demostraron que en células de pituitaria ovina hay una liberación de 2 a 3 veces más de LH en respuesta a 10 nM de la GnRH, cuando se pretrató con Ez hasta por 12 horas.

Otros trabajos presentados por Padmanabhan y col. (45) en cultivos de células de pituitaria bovina con tratamientos de Ez por 2 horas durante 5 días observaron que el Ez no afecta la liberación basal de la LH, pero con un tratamiento de 26 horas se llevó a cabo la estimulación de la LH, concluyéndose que los efectos del Ez son dependientes de la concentración y del tiempo de exposición.

El uso de estrógenos en combinación con la T en dosis adecuadas en cápsulas de polidimetilsiloxano (durante 8 meses) han sido propuestos como anticonceptivos masculinos ocasionando oligospermia, pero después de suspenderse dicho tratamiento este efecto es reversible (46,47).

Bajas dosis de Ez (aproximadamente 240 ng/día/animal) inducen efectos poco significativos sobre el sistema reproductivo masculino, en dosis altas (mayores de 1680 ng/día/animal) provocan efectos significativos en la reproducción masculina y en los órganos andrógeno-dependientes (48).

En hombres normales la administración crónica de altas dosis de la T (durante 6 meses) dio como resultado la inhibición de las gonadotropinas y de la espermatogénesis, resultando una azoospermia del 50-70% (49). En monos machos castrados, el Ez exógeno puede también actuar sinérgicamente con la T para mantener regulada la concentración de la LH en cantidades que inhiban la regulación por retroalimentación por cualquiera de estas dos hormonas (50).

El uso de estrógenos en la terapia para el tratamiento de cáncer de próstata es de gran importancia teórico-práctico. Se requieren grandes cantidades de estrógenos para inhibir el crecimiento de cáncer metastático de próstata. Es posible que los estrógenos inhiban por competencia las acciones de cualquier andrógeno. De este modo es posible controlar los tumores durante años (2,7).

La producción de E₂ en la mujer oscila entre 30 y 200 µg en 24 horas, dependiendo de la fase del ciclo menstrual. Aumentan de forma considerable durante el embarazo (2). En el varón adulto 70% del E₂ en plasma proviene de la aromatización de la T y A circulantes. Pequeñas cantidades son secretadas por la corteza suprarrenal pero la mayoría del 30% restante es producida por los testículos. Parte del E₂ en la sangre venosa testicular proviene de las CL así como de las CS. La concentración de E₂ plasmático en el varón es de aproximadamente 2 ng/100 ml y la tasa de producción total es de 0.05 mg/día (30).

1.3. Fisiología del Testículo.

El testículo es un órgano mixto, con funciones endocrinas y exócrinas. Estas funciones están controladas por factores intra y extratesticulares (11).

Los factores externos influyen en el sistema endocrino a través de la actividad del SNC sobre la adenohipofisis (5,6,12).

La función endocrina reside fundamentalmente en las CL, que liberan la T y la función exocrina en los túbulos seminíferos por llevar a cabo la espermatogénesis, cuyo producto exócrino son las células sexuales y por ello se le considera esencialmente como glándula citogénica (13).

Las neurohormonas secretadas por las neuronas del hipotálamo, las GnRH, llegan a los gonadotropos de la adenohipofisis a través de los vasos del sistema porta-hipotálamo-hipófisis para controlar la síntesis y liberación de gonadotropinas, LH y la Hormona Estimulante del Folículo (FSH) (51,52,53,54). La proteína G, la hidrólisis de la fosfoinositidina, la protein cinasa C, el ácido araquidónico, el Ca⁺²

y algunos metabolitos son identificados como posibles mediadores en este proceso (55).

El mecanismo seguido por estas gonadotropinas sobre la función testicular se presenta a continuación:

La LH (primer mensajero) actúa sobre las CL estimulando la esteroidogénesis y consecuentemente la producción de la T, fijándose a receptores específicos de la membrana plasmática de éstas (Figura 3a). Esto estimula la acción de la adenilato ciclasa que bajo la presencia de iones Mg^{+2} , esta enzima cataliza la producción de 3',5'-adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) (segundo mensajero) a partir de Adenosintrifosfato (ATP) dentro de la célula. El AMPc resultante es entonces degradado por una fosfodiesterasa a 5'AMPc ó se une a una subunidad regulatoria de una proteína cinasa causando la liberación de una subunidad catalítica libre. Las proteínas cinasas al ser estimuladas por la LH, catalizan la fosforilación de las proteínas intracelulares las cuales probablemente activen la secuencia de eventos involucradas en la biosíntesis de esteroides (56). La síntesis de proteínas también tiene lugar durante la activación hormonal de las CL y algunos autores sugieren (52,57) que es un requisito para una respuesta normal del esteroide, de aquí que la inhibición de la síntesis de proteínas podría bloquear la producción de la T ante la exposición de un corto tiempo de la LH.

La colesterol-esterasa produce colesterol libre a partir de los ésteres de Col contenidas en las gotitas lipídicas de las CL. La enzima 20-22 desmolasa escinde la cadena lateral del Col para formar la Preg, y las enzimas del retículo endoplásmico liso llevan a cabo las transformaciones siguientes para la formación de la T (8).

Aunque el testículo está bajo el control de las gonadotropinas de la adenohipófisis existen factores locales (intratesticulares) que controlan también la producción de la T. Probablemente uno de estos factores es la Hormona Liberadora de LH (LHRH) que al parecer puede tener el potencial para ejercer los efectos regulatorios sobre la función y estructura de las CL (58). Otros investigadores han observado que si se produce una lesión local de los túbulos

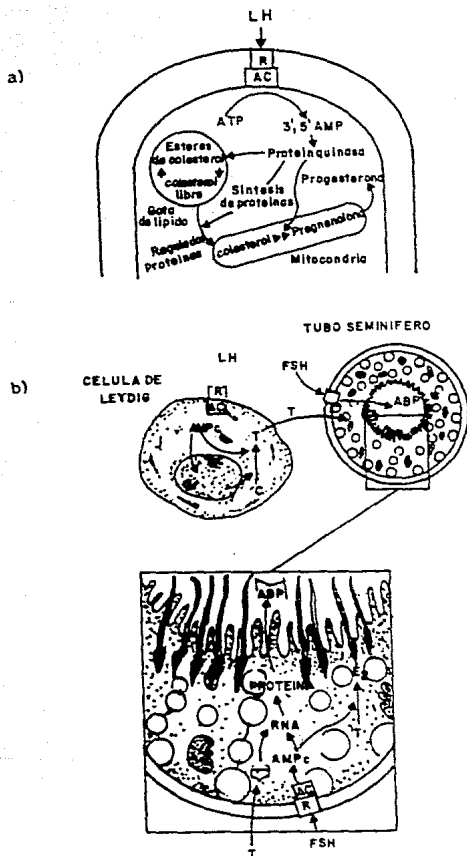


Figura 3. Comportamientos testiculares y posibles mecanismos de regulación. R, receptor hormonal; AC, adenilatociclasa; ABP, proteína unidora de andrógenos; FSH, hormona estimulante del folículo; LH, hormona luteinizante; AMPC, adenosin monofosfato cíclico; E₂, estradiol; C, colesterol; T, testosterona. Tomado de Rusell (8). Pp. 155.

seminíferos se podría evitar la inhibición por la LHRH resultando hipertrofia de las CL vecinas (14,60).

Posiblemente también se encuentran involucrados factores producidos por las CS que al actuar sobre las CL van a controlar directamente la secreción de la T ó más probablemente van a modular la T en respuesta a la LH (60).

Por otra parte se ha demostrado que el fluido intersticial del testículo (FIT) de rata adulta normal que rodea a los túbulos seminíferos, a las CL llenando los espacios intersticiales, puede ejercer importantes efectos estimulatorios sobre la secreción de la T de las CL. La acción del FIT parece ser diferente de la Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) y al de la LHRH, además tiene la capacidad para interactuar con cualquiera de estas hormonas (56).

Sharpe y col., (61) mencionan que la formación y volumen del FIT es regulado por factores endocrinos (LH/hCG) y paracrinos, sugiriéndose a las CL como el posible sitio de secreción de factores vasoactivos. Se ha observado que bajo la ausencia total de las CL, únicamente la T puede mantener el volumen normal del FIT, lo cual sugiere que las células que responden a los estímulos de los andrógenos en los túbulos seminíferos (células peritubulares ó de Sertoli) son el principal regulador fisiológico del volumen del FIT.

La FSH (Figura 3b) actúa específicamente sobre las membranas de las CS y junto con la T producida por las CL, mantienen la espermatogénesis y activan la síntesis de la Proteína Unidora de Androgenos (ABP) en las CS, tanto en condiciones in vitro como in vivo. La ABP se secreta a la luz de los túbulos seminíferos y transporta la T para mantener elevada la concentración de la misma en el epitelio seminífero que reviste los conductos eferentes y en el epididimo (15,26,62).

La FSH estimula la adenilatociclasa en los túbulos seminíferos incrementando la producción de 3'E'-AMPC, activan las protein cinasas, estimulan la producción de ABP, la activación de los plasminógenos y los estrógenos. Al parecer la FSH no influye directamente en otros

tipos celulares del testículo (39).

La actividad funcional de las CL está también relacionada con los estadios del ciclo espermatogénico. Se sabe que en los estadios VII-VIII de la rata las CS tienen las más altas secreciones de ABP, la más alta actividad de la fosfodiesterasa y la mínima unión de FSH y mínima estimulación de producción de AMPc por la FSH (6).

Se asume que la Prolactina (PRL) produce efectos sobre la función del testículo reflejándose directamente su acción sobre las CL. La PRL iodinada ha sido mostrada a ser localizada en el compartimento intersticial (52,53). Incrementa la producción de la T inducida por LH, facilitando la transformación del Col a Preg en ratas sexualmente inmaduras (64).

1.4. Esteroidogénesis Testicular.

La producción de la T a partir de Preg ha sido estudiada extensivamente desde 1956, cuando Slaunwhite y Samuels descubrieron la secuencia biosintética, incluyendo la Preg, 17-OHPreg y A, más tarde llamada vía $\Delta 4$. Esta vía fue predominante hasta 1962 cuando varios investigadores presentaron evidencias de una secuencia alternativa, la cual incluye 17α -OHPreg, DHEA, delta 5-androstendici llamada vía $\Delta 5$. Parece que ambas vías son operantes en menor ó mayor grado en algunas especies (Figura 4) (65,66).

Brandes (67) menciona que cuando un compuesto se acumule ó sea secretado por el testículo, no es necesariamente un índice de que se halle en la vía principal.

Ha quedado establecido que la esteroidogénesis del ovario, de la adrenal y del testículo producen sus hormonas características por mecanismos similares que difieren en una ó dos enzimas requeridas para la isomerización final, la oxido-reducción ó la escisión carbono-carbono. En la esteroidogénesis del testículo ocurren aproximadamente 20 reacciones, siendo las dos principales los tipos de oxido-reducción, que son deshidrogenaciones e hidroxilaciones. La producción de los esteroides testiculares como resultado de la

BIOSINTESIS DE ANDROGENOS

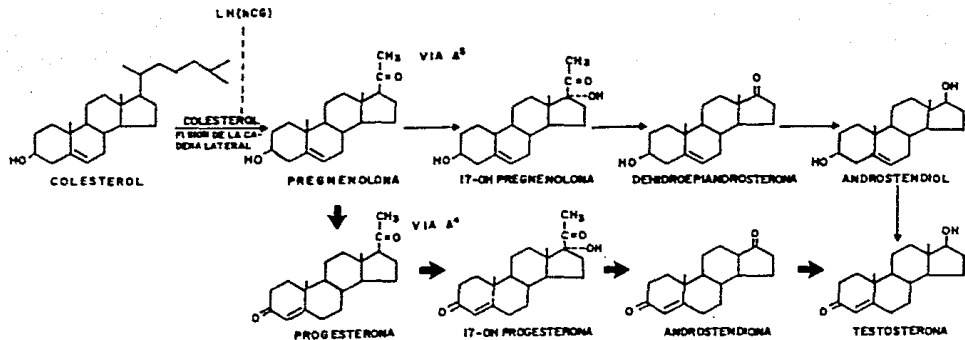


Figura 4. Las flechas gruesas indican la vía preferencial de biotransformación para los esteroides en el testículo de rata. Tomado de Odell y Moyer (11). Pp. 29

combinación de estas reacciones, esta bajo la influencia de moléculas reguladoras, de sustratos adecuados, de cofactores y de condiciones intracelulares específicas (31,38).

La producción de esteroides endógenos va a depender de un gran número de factores, algunos serán inherentes a las actividades biológicas conocidas del esteroide en particular, a su relación como intermediario o de la velocidad de secreción, a los sistemas de transporte o bien a una combinación de éstos (68).

Desde 1964, F. Lynen y K. Block reportaron la secuencia de pasos en la vía esteroidogénica desde Acetil CoA hasta Col, el precursor básico de la biosíntesis de todas las hormonas esteroides (69). Uno de los primeros pasos en la biosíntesis de la T es el movimiento del Col libre hacia la membrana mitocondrial de la CL, dicho transporte es incrementado por la LH ó AMPc (42,56).

La respuesta esteroidogénica de las CL ante la LH, depende principalmente de las enzimas que controlan la escisión de la cadena lateral del Col intramitocondrial, además de la activación de la colesterol-esterasa para originar la liberación del Col a partir de ésteres de Col que pueden probablemente estar también involucrados (52).

Se cree que la LH, ejerce sus principales efectos en estimular la hidroxilación del Col para formar 20 y 22 hidroxil-colesterol (56), bajo la presencia de $NADH^+$, Mg^{+2} ó Ca^{+2} y la enzima 20-22 desmolasa dependiente del citocromo P450, la cual cataliza la escisión de la cadena lateral del Col para producir esteroides C-21, Preg. Esta reacción es considerada como el paso limitante en la biosíntesis de la T (52,56,70).

La producción de andrógenos, a partir de precursores C-21, Preg y Prog, requiere las actividades de dos enzimas; la 17 α -hidroxilasa y la C 17-20 liasa. La primera cataliza la reacción de hidroxilación de los esteroides C-21 y en seguida la C 17-20 liasa elimina los 2 carbonos de la cadena lateral para producir esteroides C-19, la DHEA y A respectivamente. La dirección que pueden seguir estas hormonas al

tomar el camino 14 ó 15 va a depender de la especie, del sexo, de la edad, de la constitución hormonal y genética, de la etapa sexual, etcetera. En la rata la vía preferencial es la 14 (65,70).

Los múltiples caminos reguladores que existen en las CL pueden operar no solamente en el control de la esteroidogénesis, sino también regulan total o parcialmente otras funciones de las CL (31).

La biosíntesis de las hormonas en el ovario y testículo está regulada por un mecanismo de control fundamental que incluye la LH y por un mecanismo de control que involucra a las hormonas sintetizadas por estas mismas glándulas (78). El Ez se ha considerado un factor importante en la regulación de la esteroidogénesis testicular. Se ha establecido una amplia controversia de los efectos que produce el Ez sobre la actividad testicular. Se ha observado que las CL cuando son tratadas con hCG ó AMPc previo tratamiento con Ez da como resultado una inhibición de la síntesis de la T. Esto sugiere que estrógenos afectan un paso distal a la unión de hCG ó formación de AMPc (75). Otros autores han señalado el efecto a nivel de los intermediarios de la síntesis de la T (66,60,65).

1.5. Órganos Andrógeno-Dependientes.

Vesícula Seminal (VS).

Son dos glándulas en las que su volumen y función dependen sobre todo del control hormonal; por lo tanto, el volumen y la forma de estas estructuras varían considerablemente con la edad.

En el varón sexualmente maduro son órganos alargados, con numerosas evaginaciones laterales, que parten de una luz irregularmente ramificada. Se originan como evaginaciones de los conductos deferentes y se asemejan a ellos en su estructura básica.

La pared del tubo tiene 3 capas; una capa externa de tejido conectivo fibroso rico en fibras elásticas; una capa media de músculo liso y un epitelio que reposa sobre una capa delgada de tejido conjuntivo laxo (mucosa de revestimiento interno).

La capa muscular es importante, no es tan gruesa como el conducto deferente, está constituida por dos estratos; uno interno de fibras circulares y otro externo de fibras longitudinales.

El revestimiento epitelial está formado esencialmente de una capa de células cilíndricas altas, pero entre ellas y la lámina propia puede haber irregularmente distribuidas células de menor volumen.

Las células epiteliales, contienen granulos de secreción cuyo producto es un líquido bastante viscoso, ligeramente de color amarillo que va a parar al conducto eyaculador en el momento de la eyacuación y constituye una parte de los líquidos que forman el vehículo para los espermatozoides (13). La característica más remarcable de la composición del líquido de las VS es el alto contenido de sustancias reductoras (32).

La mucosa de las VS, es extraordinariamente rica en pliegues, ello permite que la vesícula tenga una superficie enorme de epitelio secretorio, haciendo posible que el tubo sea también distendido por la secreción sin que sufra estiramiento la membrana de células secretorias que reviste la VS.

El tamaño y capacidad de almacenaje de las VS y su potencial, están sujetas a variaciones individuales, que son particularmente conspicuas en el hombre (74).

Cuando una célula de la VS ó de la próstata se desarrolla en un medio sin T, es pequeña, no tiene nucléolo ni basofilia citoplásmica y resulta bioquímicamente inactiva. El tratamiento con la T tiene como resultado la aparición de un gran nucléolo visible, con intensa basofilia en el citoplasma, y recuperación de un conjunto normal de enzimas (42).

Epididimo.

Es un órgano muy vascularizado, tiene una cubierta fibrosa similar pero algo más delgada a la túnica albugínea del testículo; se encuentra dividido en tres regiones; la cabeza, el cuerpo y la cola.

El volumen máximo se localiza en la porción inicial de la cabeza que es el lugar metabólicamente más activo, el cuerpo y la cola están formados por el conducto del epididimo junto con el tejido conectivo.

Este órgano tiene una función dual, actúa como un reservorio para espermatozoides y también produce una secreción y en este camino participa junto con la próstata, la VS y otros órganos accesorios en

la formación del plasma seminal (32).

Kelce y col. (75) indican que la maduración de los espermatozoides en el epididimo es un proceso andrógeno-dependiente, el cual parece tener lugar en la región cabeza-cuerpo del epididimo de mamíferos. Los andrógenos responsables para esta maduración se cree que son los metabolitos de la T, 5 α -reducidos y 3 α -reducidos de la DHT.

El transporte del espermatozoide en el epididimo, se realiza de acuerdo a la especie, desde unos pocos días a varias semanas, depende además de un mecanismo neuromuscular, el cual involucra contracciones rítmicas espontáneas de los mismos túbulos. No hay una evidencia directa de que el espermatozoide contribuya substancialmente con su propia migración o bien sean ayudados por la secreción del epididimo (29).

En general no hay un acuerdo sobre la cuestión de la secreción del epididimo; si ella misma se provee de un medio favorable para mantener la viabilidad del espermatozoide, o si el órgano ejerce influencia en alguna otra forma. En analogía a las secreciones epiteliales de otros órganos accesorios, la integridad y características químicas del epitelio tubular en el epididimo tienen una relación dependiente sobre la presencia de hormonas del sexo masculino y es por lo tanto consecuentemente afectado por la castración, la hipofisectomía y tratamiento de andrógenos (32).

Otra faceta de la función secretoria del epididimo, es la destrucción y fagocitosis del espermatozoide por el epitelio y espermiofagos, posiblemente esto es ayudado en alguna parte por el mismo fluido de secreción (42).

Se sabe que la ABP producida por las CS es transportada al epididimo donde es absorbida, probablemente esta proteína transportadora de andrógenos que actúa en el testículo puede también hacerlo en el epididimo (76).

Próstata.

Esta glándula puede describirse comparandola a una castaña, por su forma y su volumen. Se le conocen dos porciones; el cuerpo y la porción diseminada. El cuerpo es una pequeña protuberancia transversal en forma de anillo que rodea a la uretra en su origen, en la base de la vejiga urinaria, y la porción diseminada se encuentra distribuida en toda la longitud de la uretra bajo una capa muscular. Tiene consistencia firme, esta rodeada de una capsula delgada, formada de tejido conectivo, que se extiende por su interior para constituir el abundante estroma.

La secreción prostática, es un líquido opalescente y fluido, de reacción ligeramente acida. Tiene un contenido proteínico bajo, formado por diastasa, betaglucoronidasa, varias enzimas proteolíticas y una poderosa fibrinolisisina. Esta ricamente innervada con plexos de fibras nerviosas amielínicas unidas a pequeños ganglios simpáticos. Hay terminaciones nerviosas sensitivas de diferentes clases (bulbos terminales, corpusculos genitales, etc.) diseminados por el tejido conjuntivo intersticial, existiendo además terminaciones libres en el epitelio (74).

Es un conglomerado de 20 a 50 glándulas pequeñas compuestas de 16 a 32 conductos excretorios. Estas glándulas que están incluidas en la substancia de la próstata son de tres tipos diferentes y se hallan distribuidas en tres zonas separadas situadas mas ó menos concentricamente alrededor de la uretra. Las glándulas mucosas, son las de menor volumen y se hallan en el tejido periuretral. Tienen gran importancia en relación con los aumentos de la substancia prostática que se produce en el hombre de edad, son estas glándulas las que suelen hipertrofiarse para constituir nodulos adenomatosos. Las glándulas submucosas; se hallan en el anillo tisular que rodea al tejido periuretral. Las glándulas principales externas ó propias (las que proporcionan la mayor parte de la secreción se hallan dispuestas en la parte mas extensa y voluminosa de la glándula), es ampliamente aceptada que estas glándulas son el lugar de origen de la hiperplasia prostática, en tanto que la próstata propiamente dicha es el lugar preferido para el desarrollo de cancer (32).

Basándose en estudios embriológicos, la próstata ha sido subdividida tradicionalmente en lobulillos medio, lateral y posterior, todos de forma piramidal. En el hombre adulto, los bordes de estos lobulillos se fusionan y pierden importancia. Sin embargo, se ha tenido confusión acerca de la nomenclatura de los lobulillos de la próstata de la rata y su relación con las partes de los órganos accesorios en el hombre (42).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la actualidad se conoce que el testículo esta regulado por factores intra y extratesticulares. Su principal hormona de secreción, la T, permite mantener las características sexuales secundarias, la espermatogénesis, la función de las glándulas accesorias masculinas (el epididimo, la vesícula seminal, la próstata y las glándulas bulbouretrales) y es útil en forma de anticonceptivo.

Sin embargo, la naturaleza de los factores responsables de modular la capacidad esteroidogénica testicular aun no es bien conocido, aunque hay varios candidatos potenciales a este respecto, entre los cuales se encuentra el Ez.

El Ez es la hormona biológicamente más activa de los compuestos estrogénicos. Se le ha atribuido una serie de efectos en la función reproductora masculina, en combinación con la T actúa como anticonceptivo, en la osificación de los huesos, en la mujer interviene en los procesos de ovulación, embarazo, parto, etc.

Se han presentado una gama de posibilidades de los efectos producidos por el Ez en la esteroidogénesis testicular.

Es por ello, que estudiosos en el campo de la esteroidogénesis testicular han realizado investigaciones concernientes a los efectos producidos por el Ez, sugiriéndose que existe una inhibición en la secreción de GnRH del hipotálamo, de gonadotropinas hipofisarias, modificación de la morfología del testículo, alteraciones en la síntesis de la T, además se ha sugerido que el Ez, en la vía biosintética $\Delta 4$ afecta alguna(s) etapa (s) previas a la formación de la T, para lo cual se proponen tratamientos crónicos de Ez durante espacios de tiempo de 6 y 12 semanas, para poder así dilucidar los efectos producidos por esta hormona.

3. OBJETIVO GENERAL.

Determinar los efectos del estradiol liberado de implantes en diferentes dosis y tiempos sobre la actividad esteroideogénica del testículo de ratas.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

3.1.1. Determinar Cuantitativamente los Esteroides de los Homogeneizados Testiculares.

3.1.2. Determinar la Cantidad de Proteínas presentes en los Homogeneizados.

3.1.3. Evaluar el Efecto del estradiol sobre la Esteroidogénesis Testicular.

3.1.3.1. Evaluar el Efecto de Dosis.

3.1.3.2. Evaluar el Efecto de Tiempo.

4. HIPOTESIS DE TRABAJO.

Los tratamientos de estradiol disminuirán la síntesis de la testosterona producida en el testículo al modificarse las concentraciones endógenas de los esteroides en las etapas en la vía esteroidogénica testicular.

5. MATERIALES Y METODOS.

5.1. Tratamiento de los Animales y Obtención del Material Biológico.

Se utilizaron animales ratas macho adultos de la cepa Wistar, divididos en lotes de 8 animales. Se les colocó un implante de polidimetilsiloxano de 1, 3 o 7 mm de longitud vacíos para los grupos control y conteniendo estradiol para los experimentales por medio de un trocar en forma subcutánea en la región dorsolateral del tórax (46).

Todos los animales fueron mantenidos en condiciones de bioterio (alimentación y agua "ad libitum" y periodos de luz-obscuridad de 12 horas) durante 6 y 12 semanas. Los animales fueron pesados semanalmente durante todo el experimento, al término de cada periodo de tratamiento fueron sacrificados por decapitación, se extrajeron los testículos por vía abdominal y se perfundieron con solución de Krebs.

El tejido testicular fue liberado de la túnica albugínea y se homogeneizó con amortiguador de fosfatos (fosfatos 0.1 M, NaCl 0.15 M, ácido de sodio 0.1 N) en una proporción p/v del 5% en un homogeneizador tipo Potter de vidrio, los homogeneizados se fraccionaron en alícuotas y se almacenaron en congelación a -20°C hasta su utilización.

5.2. Determinación Cuantitativa de Esteroides por medio del Método de Radioinmunoanálisis (RIA).

Las pozas metabólicas de los esteroides fueron determinadas utilizando RIAs específicos, de acuerdo a lo reportado previamente (77,78,79). Estos procedimientos implican varias etapas las que se describen a continuación:

Extracción y purificación:

En tubos de vidrio para centrifuga y capacidad de 15 ml así como en viales de control, se colocaron alícuotas de 10µl de cada uno de los esteroides (Prog. Prog. 17-OHProg. A y T) marcados con ³H este trazador en cantidad aproximada de 1000 cpm (cuentas por minuto).

A los tubos se les agregó 1 ml de homogenizado testicular de la muestra correspondiente, o bien agua destilada para los "blancos" del método.

La extracción de los esteroides se realizó con 5 ml de éter etílico, se agitó mecánicamente durante un minuto y se dejó reposar hasta obtener dos fases; la acuosa se congeló al introducir los tubos en un baño de hielo seco-acetona. La fase orgánica se decantó a un tubo de vidrio con fondo cónico. La operación se repitió en una ocasión y las fases orgánicas reunidas se dejaron evaporar a sequedad.

El extracto adherido a las paredes del tubo se redisolvió con una mezcla de éter etílico-metanol (2:1) agregando 10. 8 y 8 gotas, lo cual se transfirió a cromatoplaques (Silica Gel 60, F254, 0.25 mm de espesor, 20 x 20 cm) a zonas de aplicación de 1 cm de ancho; en puntos particulares de cada placa se colocaron 2 µg de cada uno de los correspondientes esteroides como referencias cromatográficas. Las cromatoplaques se desarrollaron en Benceno y después de permitir que el disolvente alcanzara el borde superior, las cromatoplaques se sacaron y se cambiaron a un sistema Benceno-Acetato de Etilo (9:2), después de secarlas al igual que en cada cambio de sistema, se colocaron en un sistema de Benceno-Metanol (9:1).

Los esteroides de referencia se localizaron en la cromatoplaque con una lámpara de luz ultravioleta a 254 nm, aprovechando la fluorescencia de la sílica gel y la característica de los esteroides con función Δ^4 -3-cetona de absorber a esta longitud de onda, en el caso de la Preg se reveló con reactivo de Certel (ácido sulfúrico-etanol 2:1). A continuación se trazaron líneas horizontales uniendo las zonas de los estándares, de la parte superior e inferior de cada zona revelada y con líneas verticales los límites de cada zona de aplicación, quedando perfectamente delimitada la localización de los esteroides en cada muestra.

La sílica se desprendió por raspado con una navaja, se aspiró con una pipeta Pasteur previamente empacada con fibra de vidrio, y se eluyó con aproximadamente 1.1 ml de una mezcla de éter etílico-metanol (9:1) en tubos de 10 x 75 mm y se concentraron a sequedad.

Posteriormente se agregó exactamente 1.0 ml de éter a cada tubo, se agitó y se tomó una alícuota de 500 µl, se colocó en viales de conteo, se dejó evaporar y se le adicionó 5.0 ml de líquido de conteo

(Instagel-Tolueno 1:2) midiendo de esta manera el porcentaje de recuperacion. Los restantes 500 μ l permanecieron en el tubo para medir por RIA la cantidad de esteroide no marcado.

RIA.

Se realizo una curva patrón para para cada esteroide Preg. Prog. 17-OHProg. A y T.

Las condiciones bajo las cuales se construyeron las curvas patrón para cada uno de los esteroides fueron:

Amortiguador de RIA (AR): fosfatos de sodio 0.1 M, NaCl 0.15 M, Gelatina 0.1%, Azida de sodio 0.1%, pH 7.0.

# Tubo	Esteroides frío (pg)	vol. de esteroide radioactivo para obtener 5000 cpm/ 500 μ l	Dilución del Anti cuerpo
Total	-		
0	-		
1	2	Preg: 15 μ l en 90 ml de AR.	Anti-Preg: 1 : 5000
2	5		
3	10	Prog: 20 μ l en 100 ml de AR.	Anti-Prog: 1 : 5000
4	30		
5	50	17-OHProg: 10 μ l en 80 ml de AR.	Anti-17-OH Prog: 1 : 1500
6	100		
7	300	A: 60 μ l en 90 ml de AR.	Anti-A: 1 : 5000
8	500		
9	1000	T: 15 μ l en 100 ml de AR.	Anti-T: 1 : 5000
10	10000		
N	50000		

Una vez que fue agregado la respectiva masa de esteroide frío (Cno marcado) por duplicado, se dejó evaporar a temperatura ambiente.

Después de ello se preparó una solución con cada uno de los esteroides radioactivos en AR hasta obtener aproximadamente 5000 cpm/500 μ l. A partir de esta solución, se preparó la dilución del anticuerpo en particular como lo señala la tabla anterior, y se agregaron 500 μ l a cada tubo curva y muestra dejándose incubar aproximadamente 18 horas a 4°C.

Al término de dicho periodo se agregaron 200 μ l de suspensión carbón activado-dextran T 70 (625 mg y 62.5 mg en 100 ml de agua desionizada) a excepción de los tubos totales e inmediatamente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. esto con la finalidad de separar la fracción unida de la no unida.

Se decantó el sobrenadante en viales de conteo, se les agregó 5.0 ml de solución de Centelleo (Instagel-Tolueno 1:1) y las fracciones unidas se midieron en un espectrómetro de centelleo líquido Beckman LS 7500 en condiciones óptimas para 3 H, durante un minuto.

Se trazaron las curvas patrón al expresar gráficamente la transformación Logit del cambio del porcentaje de unión neta de esteroide marcado como función del Log de la cantidad de esteroide no marcado presente en el tubo. Se calculó el porcentaje de unión de esteroide radioactivo de cada muestra y se interpoló en la curva patrón correspondiente, se hizo la corrección pertinente de acuerdo a la recuperación de cada trazador y en cada tubo, obteniendo al final la cantidad de esteroide por ml de muestra.

5.3. Determinación Cuantitativa de Proteínas (Método de Groves) (80).

Se realizó una curva patrón por duplicado, la cual se construyó de la siguiente manera:

Solución proteínica de referencia: 1 mg/ml de Albúmina Sérica de Bovino Fracción V.

Amortiguador de fosfatos 0.1 M: NaCl 0.15 M. Azida de sodio 1% .
pH 7.0.

Reactivo de Groves: Detergente Brij 35, preparado al 1% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M.

# Tubo	Proteína (μ g)	Agua (ml)	Reactivo de Graves (ml)
0	-	1.000	2.000
1	5	0.995	-
2	10	0.990	-
3	15	0.985	-
4	20	0.980	-
5	25	0.975	-
6	50	0.950	-
7	75	0.925	-
8	100	0.900	-
9	140	0.860	-
10	180	0.820	-

La proteína de referencia se disolvió en el amortiguador y se leyó su absorbencia a dos longitudes de onda a 224 y a 233 nm.

Para poder determinar la cantidad de proteína presente en las muestras se tomaron de los homogeneizados testiculares fracciones de 50 μ l los cuales recibieron el mismo tratamiento que los de la curva patrón.

La medición espectrofotométrica se realizó en un espectrofotómetro Cary Modelo 118, tomando las lecturas en las longitudes de onda anteriormente mencionadas, con esto se obtuvo un Δ de absorbencias, restando la lectura de 233 nm a la lectura de 224 nm. Esta diferencia se tomó como función de la cantidad de proteína construyendo así una curva patrón.

Los Δ de absorbencias de los experimentales fueron interpolados en la curva patrón.

5.4. Analisis Estadístico.

Los resultados obtenidos se analizaron comparando los promedios \pm error estandar de la media (e.e.m.) de los grupos control y experimental utilizando la prueba "t" de Student y solo se consideraron como estadísticamente significativas aquellas diferencias de $p \leq 0.05$.

5. Resultados.

Si bien es cierto que se inició con lotes de 6 animales, el cambio en el número al final se debió a la muerte de los animales.

En el diseño experimental llevado a cabo, se observó que los resultados obtenidos de los grupos control en los tratamientos de 6 y 12 semanas no mostraron diferencias significativas; esto nos permitió formar un sólo grupo control (c), el cual fue comparado con los grupos experimentales para poder así determinar los efectos producidos por el E₂.

5.1. El Peso corporal.

Se observó que al inicio de los tratamientos no hubo diferencias significativas entre los diversos lotes de los animales, no obstante al final del tratamiento los animales del grupo control ganó peso llegando a 430 gramos. En los grupos experimentales se observó que el peso corporal disminuyó significativamente conforme mayor fue el tamaño del implante y mientras mayor tiempo duró el tratamiento (Tabla 1).

5.2. El Peso Testicular.

En la Figura 5 se muestra el efecto que sobre el peso testicular se manifestó por la presencia de los implantes liberadores de E₂. Se encontró que el peso testicular disminuyó significativamente en forma progresiva respecto al aumento en la longitud del implante y al tiempo de tratamiento.

5.3. Extracción y Purificación.

Durante la extracción y purificación se tuvieron los cuidados necesarios para cumplir los propósitos de ambas etapas. Obteniéndose de manera general con la primer etapa un volumen de extracto constante para todas las muestras; permitiendo así una extracción homogénea

Longitud del Implante (mm)	S e m a n a	
	6	12
Control	430 ± 6 (10)	430 ± 6 (10)
1	346 ± 8 ^a (6)	362 ± 17 ^a (5)
3	340 ± 5 ^a (6)	329 ± 10 ^a (4)
7	330 ± 4 ^a (6)	322 ± 8 ^a (6)

Tabla 1. Efecto del Et liberado de implantes de polidimetilsiloxano sobre el peso corporal (g) (media ± e.e.m.) durante 6 y 12 semanas.

El valor entre paréntesis indica el número de animales.

a. $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

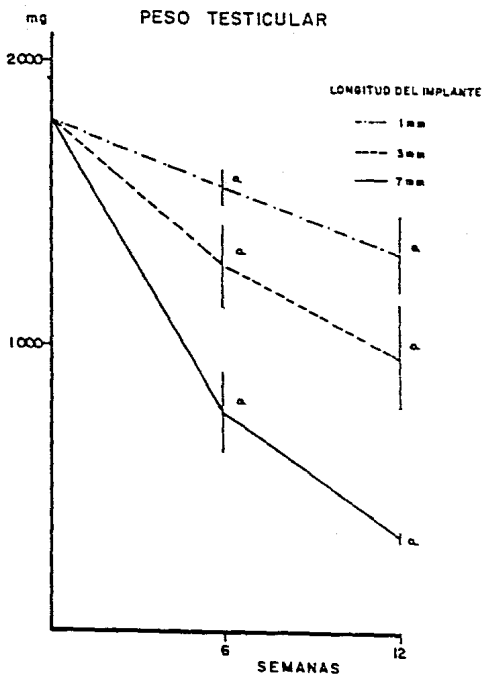


Figura 5. Efecto del E_2 liberado de implantes de polidimetilsiloxano sobre el peso testicular (g) (media \pm e. e.m.) durante 6 y 12 semanas.

a, $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

separando los esteroides de interés, del resto del material biológico soluble en agua.

Este extracto fue purificado, con el objeto de mantener radioquímicamente puro cada esteroide, para ello se tuvieron las precauciones pertinentes durante la transferencia (no raspar la sílica, agregar exactamente la cantidad de gotas al redissolver, lavar correctamente la pared del tubo, etc.) para poder así dar la especificidad adecuada a la metodología y utilizar los disolventes adecuados para el desarrollo cromatográfico para obtener posteriormente como resultado una cuantificación más exacta de las hormonas.

6.4. RIA.

6.4.1. Sensibilidad de las Curvas Patrón.

En la elaboración de las curvas patrón para Preg, Prog, 17-OHProg, A y T el rango de sensibilidad que se manejó para todas fue de 0.0 pg a 50000 pg, obteniéndose coeficientes de correlación (r) de 0.977, 0.994, 0.995, 0.989 y 0.985 respectivamente.

6.4.2. Recuperación de Trazadores.

En términos porcentuales la recuperación total de los trazadores fue:

Para Preg; 84% de recuperación, con coeficiente de variación (c.v.) del 8%.

Para Prog; 86% de recuperación, con c.v. del 7%.

Para 17-OHProg; 88% de recuperación, con c.v. del 7%.

Para A; 67% de recuperación, con c.v. del 18%.

Para T; 91% de recuperación, con c.v. del 7%.

6.5. Cuantificación de Proteínas (Método de Groves).

En lo que respecta a la cuantificación de proteínas mediante el método de Groves, la curva estándar obtenida mostro un r de 0.996.

Con base a esta curva estándar, las concentraciones de los

esteroides se expresarán en términos de la cantidad de proteínas (pg/mg de proteína) para así evaluar los efectos producidos por el Ez en dichas sustancias, los cuales se presentan a continuación:

Preg; en la tabla 2 se muestra que a las 6 semanas de tratamiento disminuyó significativamente, en tanto que a las 12 semanas se encontró disminución significativa con el implante de 1mm, mientras que con los implantes de 3 y 7mm se observó una acumulación en la concentración de la Preg

Prog; en la tabla 3 se observa que la Prog disminuyó a las 6 y 12 semanas, encontrándose diferencias estadísticamente significativas a las 6 semanas con los implantes de 1mm y 3mm y a las 12 semanas con el implante de 1mm.

17-OHPreg; como se observa en la tabla 4 la 17-OHPreg disminuyó significativamente conforme mayor fue la longitud del implante y mayor tiempo de tratamiento.

A; a pesar de la pequeña concentración de A obtenida en el grupo control (tabla 5) puede observarse que los efectos que produce el Ez van dirigidos a disminuir la síntesis de este esteroide a las 6 y 12 semanas.

T; en la tabla 6 se aprecia que el Ez liberado de los implantes disminuyó la síntesis de T progresivamente conforme aumento la duración del tratamiento y la longitud del implante, reduciendola drásticamente con el implante de 1mm hasta llegar a una inhibición total con el implante de 7mm a las 6 semanas.

En la Figura 8, se resumen gráficamente estos resultados observando que el efecto que produce el Ez sobre la esteroidogénesis testicular se localiza a nivel de la 17-OHPreg y A, inhibiéndose la síntesis de la T.

Por otra parte, si expresamos estos mismos resultados en términos de porcentaje de cambio con respecto al control considerando a este como un 100% observamos que para la mayoría de los esteroides su síntesis fue aproximadamente inhibida un 80% (Figura 7).

Longitud del Implante (mm)	S e m a n a	
	6	12
Control	767 ± 89 (10)	767 ± 89 (10)
1	156 ± 21 ^a (6)	264 ± 26 ^a (5)
3	125 ± 30 ^a (6)	499 ± 112 (4)
7	223 ± 45 ^a (6)	1332 ± 388 (6)

Tabla 2. Efecto del Ez liberado de implantes de polidimetilsiloxano sobre la concentración de la Pregnenolona (pg/mg de proteína) (media ± e.e.m.) durante 6 y 12 semanas.

El valor entre paréntesis indica el número de animales.

a. $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

Longitud del Implante (mm)	S e m a n a	
	6	12
Control	1085 ± 154 (10)	1086 ± 124 (10)
1	515 ± 111 ^a (6)	453 ± 96 ^a (5)
3	603 ± 95 ^a (6)	953 ± 266 (4)
7	692 ± 68 (6)	1173 ± 262 (5)

Tabla 3. Efecto del Ez liberado de implantes de polidimetilsiloxano sobre la concentración de la Progesterona (pg/mg de proteína) (media ± e.e.m.) durante 6 y 12 semanas.

El valor entre paréntesis indica el número de animales.

a. $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

Longitud del Implante (mm)	S e m a n a	
	6	12
Control	702 ± 71 (10)	702 ± 71 (10)
1	320 ± 53 ^a (6)	209 ± 40 ^a (5)
2	325 ± 40 ^a (6)	228 ± 97 ^a (4)
7	129 ± 21 ^a (6)	29 ± 4 ^a (6)

Tabla 4. Efecto del E₂ liberado de implantes de polidimetilsiloxano sobre la concentración de la 17-OHProgesterona (pg/mg de proteína) (media ± e.e.m.) durante 6 y 12 semanas.

El valor entre parentesis indica el número de animales.

a. p ≤ 0.05 comparado con el grupo control.

Longitud del Implante (mm)	S e m a n a s	
	5	12
Control	24 ± 5 (10)	24 ± 5 (10)
1	16 ± 4 ^a (6)	5 ± 1 ^a (5)
3	5 ± 1 ^a (5)	9 ± 1 ^a (4)
7	7 ± 1 ^a (5)	10 ± 2 ^a (6)

Tabla 5. Efecto del E2 liberado de implantes de polidimetilsiloxano sobre la concentración de la Androstendiona (pg/mg de proteína) (media ± e.e.m.) durante 5 y 12 semanas.

El valor entre parentesis indica el número de animales.

a. $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

Longitud del Implante (mm)	S e m a n a	
	6	12
Control	2024 ± 208 (10)	2024 ± 208 (10)
1	39 ± 12 ^a (6)	161 ± 40 ^a (5)
3	12 ± 4 ^a (6)	179 ± 98 ^a (4)
7	- ^a (6)	5 ± 2 ^a (6)

Tabla 8. Efecto del E2 liberado de implantes de polidimetilsiloxano sobre la concentración de la Testosterona (pg/mg de proteína) (media ± e.e.m.) durante 6 y 12 semanas.

El valor entre paréntesis indica el número de animales.

a. $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

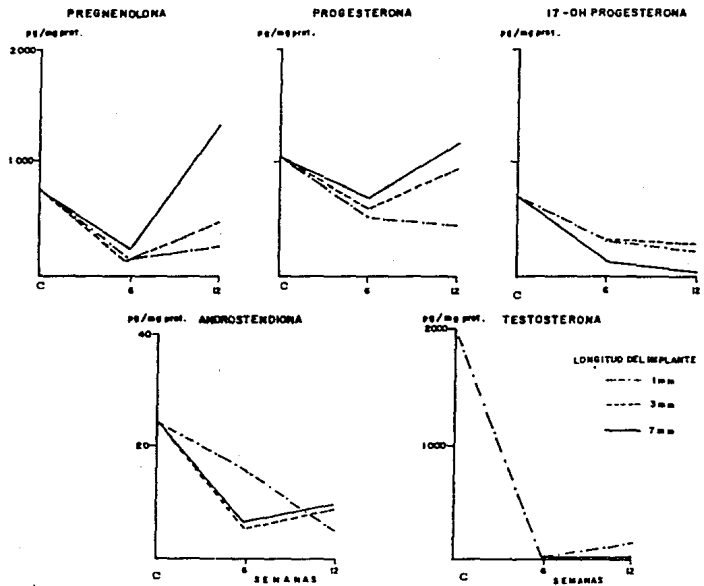


Figura 6. Representación general de los efectos producidos por el E₂ sobre las concentraciones de los esteroides (pg/mg de proteína) durante 6 y 12 semanas.

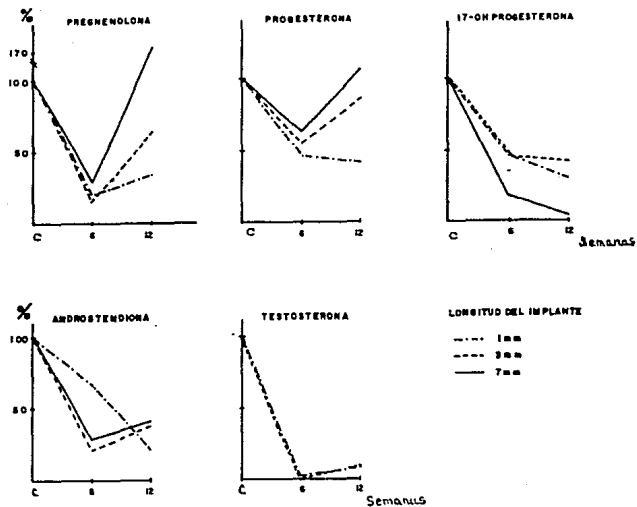


Figura 7. Porcentaje de cambio respecto del grupo control en las concentraciones de esteroides (pg/mg de proteina) durante 6 y 12 semanas.

7. Análisis de Resultados.

El diseño experimental utilizado para el desarrollo del presente estudio permitió demostrar los efectos que produce el E₂.

Nuestros datos indican que el E₂ afectó el peso corporal de las ratas disminuyendolo conforme se incremento el tamaño del implante y la duración del tratamiento. Existen evidencias de que los estrógenos reducen el crecimiento, al actuar sobre los centros hipotalámicos; mostrandose que en ratas macho adultas y jóvenes tratadas con estrógenos sintéticos ó naturales disminuyeron la concentración de la hormona del crecimiento (2,29).

El peso testicular también disminuyó con el tratamiento de E₂ conforme mayor fue el tamaño del implante y mayor el tiempo de tratamiento. Al respecto se ha observado que cuando a ratas adultas Wistar se les colocó subcutáneamente cápsulas de silastic liberando E₂ durante 8 semanas, los testículos fueron severamente atrofiados (81). Sin embargo nuestros resultados muestran algunas divergencias con lo reportado por Robaire y col., (48) en sus experimentos al trabajar con dosis bajas y altas de E₂ (240 y 1680 ng/día/rata respectivamente) y por Saksena y col.,(62) con tratamientos cortos (5 días) al indicarnos ambos autores que el E₂ no tiene efectos significativos sobre el peso del testículo. Nuestros resultados difieren de los de Saksena porque en nuestro caso son tratamientos a largo plazo (8 y 12 semanas).

Se ha establecido que el testículo esta modulado por mecanismos locales (72) y aunque su principal producto de secreción no es el E₂, se ha sugerido que el E₂ exogeno influye en la función reproductora masculina, administrado durante periodos a corto y largo plazo produce diferentes efectos biológicos (39,43,48).

Los resultados obtenidos en cuanto a los efectos del E₂ sobre la T, indican que el E₂ inhibió drásticamente la síntesis de la T, lo cual concuerda con estudios in vivo llevados a cabo en ratas normales, considerando al testículo un órgano blanco para los estrógenos (83,84).

Otros investigadores han mostrado bajo condiciones in vitro con dosis de Ez de 1µg una significativa disminución de la T (85).

Brinkmann y col. (86) han demostrado que la síntesis de la T es inhibida con tratamientos combinados de hCG con Ez, encontrándose que el efecto no se localiza a nivel de los receptores de Ez citoplasmáticos.

Por otra parte, en este experimento se encontró que el Ez disminuyó la síntesis de la Preg y Prog a las 6 semanas acumulándose ambas a las 12 semanas. A este respecto se ha observado que la síntesis de la T es inhibida como consecuencia del Ez de manera dosis-dependiente (86), pero este patrón no ha sido extensivo a los precursores de la T (87).

Keel y col. (73) señalan que el Ez afecta la actividad esteroidogénica en un paso distal a la unión de la hCG ó AMPc de las CL.

En cuanto a los efectos causados por el Ez en las pozas metabólicas de los esteroides 17-OHProg y A (tabla 4 y 5) notamos que fueron disminuidas a las 6 y 12 semanas de tratamiento lo cual podría sugerirnos que el Ez actúa a nivel de los intermediarios.

Varios grupos han indicado posibles sitios de acción del Ez en la vía esteroidogénica. Hunter y col. (87) trabajando con células de la teca de porcino indican que el Ez actúa posterior a la unión de la LH inhibiendo la síntesis de la Prog. Algunos autores (82-85) han planteado que la A también disminuye, pero para este caso en particular observamos que la concentración de la A fue baja incluso en el grupo control. Esto quizá podría deberse a que su precursor inmediato pudo haberse transformado en otros metabolitos, además hay que tener en cuenta que estos resultados fueron obtenidos bajo condiciones in vivo.

Este descenso en las concentraciones de las pozas metabólicas de los esteroides podría reflejarnos la actividad de las enzimas involucradas en la vía esteroidogénica. Es probable que las enzimas

encargadas de la transformación de Preg a Prog no esten severamente afectadas por lo cual se sugiere que el Ez produjo sus efectos a nivel de las enzimas 17 α -hidroxilasa y C17-20 liasa responsables de la conversión de Preg a 17-OHPreg y 17-OHPreg a A respectivamente, con la resultante inhibición de la T. Sin embargo no solamente se ha encontrado que el Ez actúe en estos sitios (58,71,73,88) sino que otros estudios han demostrado que el Ez puede inhibir varias enzimas en la vía esteroidogénica permitiendo la disminución de los andrógenos. Murono y col.,(89) sugieren que es la 17-cetoesteroido reductasa, otros investigadores (90,91) opinan que el Ez funciona como inhibidor competitivo de la 3 β -hidroxisteroido deshidrogenasa. Payne y col.,(37) demostraron en las CL de rata sexualmente madura bajo condiciones de cultivo y administrando Ez el altas dosis (1 μ M) que el Ez no tuvo efectos sobre la actividad de la enzima C 17-20 liasa.

Otros autores sugieren (85,92,93) que los estrógenos pueden alterar la producción de la T a través de dos mecanismos diferentes; 1) la inhibición de la LH por la glándula pituitaria y 2) un efecto directo de los estrógenos sobre el testículo. En nuestro experimento y con bases bibliográficas suponemos que el Ez causo una "castración fisiológica" al interrumpirse la conexión del sistema hipotálamo-hipófisis-testículo inhibiéndose la síntesis de las GnRH, por lo que la LH y la FSH no son producidas, de manera que al no existir el estímulo de estas hormonas tróficas se producen alteraciones en las CL y CS respectivamente sobre la síntesis de la T y en la espermatogénesis (42,43).

Por otra parte se podría esperar que existiera una correlación entre un mayor efecto como respuesta de una mayor dosis y mayor duración de tratamiento del Ez sobre las etapas de la vía esteroidogénica. Aunque este comportamiento no fue operativo para los precursores de la T, para los intermediarios y para la misma T si lo fue, la posible explicación a esto pareciera ser que el testículo se hiciera refractario al Ez con un tratamiento crónico y la respuesta de los precursores ante esto es incrementar su síntesis e incluso la T tiende ligeramente a incrementarse a las 12 semanas, como si el testículo "quisiera" re-establecerse.

Resultados anexos a los efectos causados por el E2 son aquellos relacionados con los órganos andrógeno-dependientes, en las que observaciones hechas por participantes del mismo proyecto encontraron que el E2 disminuyó el peso de dichos órganos (epididimo, vesícula seminal, próstata) (Comunicación personal Dr. A. Rosado, Depto. de Biología de la Reproducción, UAM Iztapalapa) lo cual coincide con lo reportado por la literatura (48,82) por lo que podría suponerse que el epididimo carece de su principal metabolito, la DHT (94).

Se hacen necesarios otros estudios complementarios, como son el evaluar cuantitativamente el E2 en el testículo con la finalidad de conocer si es almacenado en éste órgano; realizar estudios sobre las enzimas involucradas en las transformaciones de los precursores de la vía $\Delta 4$ anteriores a la formación de la DHT, así como poder comprobar que las gonadotropinas han dejado de ser producidas y de ser posible determinar LHRH de origen hipotalámico para demostrar que nuestro experimento dejó de producirla.

8. CONCLUSIONES.

1. Se determinaron las concentraciones de los precursores e intermediarios de la biosíntesis de la T así como a esta última en los homogeneizados testiculares por RIAs específicos.
2. Se obtuvo la cantidad de proteínas presentes en los homogeneizados testiculares utilizando el método de Groves.
3. Se demostró que el efecto del Ez es dosis-dependiente sobre el peso corporal y peso testicular.
4. El Ez disminuyó la concentración de cada una de las etapas previas a la formación de la T a las 6 semanas de tratamiento.
5. Se probó que el Ez bloqueó la esteroidogénesis testicular a nivel de la 17-OHPreg y A.
6. Se encontró que el Ez inhibió la síntesis de la T a las 6 semanas con el implante de imm.
7. Indirectamente se observó que el Ez inhibió las actividades de las enzimas microsomiales dependientes del citocromo P450; 17 α -hidroxilasa y C 17-20-liasa causando la disminución en la síntesis de andrógenos.
8. Se observó que la longitud de los implantes no mostró relación directa con el efecto de tiempo en la esteroidogénesis testicular.
9. Se sugiere realizar estudios complementarios para determinar el lugar exacto y el mecanismo de acción del efecto del Ez.

9. BIBLIOGRAFIA.

1. Horecker L. B. and Stadtman R.E. (1973): Current Topics in Cellular Regulation. vol.7. Academic Press. New York. Pp. 221.
2. Tausk M. (1975): Farmacologia de las Hormonas. Alhambra. Madrid. Pp. 226.
3. Rusell C.A. (1975): Hormones in Reproduction. University Press. Cambridge. Pp. 117.
4. Clark. T.S.M.D. (1989); The hormones Endocrine Physiology. Brown and Company. USA. Pp. 308.
5. Jones W. R. (1972): Principles of Biological Regulation. An Introduction to Feedback Systems. Academic Press. New York. Pp. 357.
6. Saez M.J., Perrard-Sapori H.M., Chatelain G.P., Tabone E. (1987); Paracrine Regulation of Testicular Function. J Steroid Biochem. 27: 317.
7. Tepperman J. (1975): Fisiologia Metabolica y Endocrina. 3a. edición. Interamericana. Mexico. Pp. 255.
8. Russell C. A. (1972): Reproduction in Mammals. University Press. Cambridge. Pp. 681.
9. Kochakian D. Ch. (1990): Metabolites of Testosterone: significance in the vital economy. Steroid. 55:92.
10. Hamm W. A.(1986): Tratado de Histologia. Interamericana. Mexico. Pp. 1079.
11. Odell W.D., M.D.Ph.D. and Moyer L.D..M.D. (1971): Physiology of Reproduction. The C.V. Mosby Company. USA. Pp. 152.
12. Vick L. R. (1987): Fisiologia Medica Contemporanea. McGraw-Hill. Mexico. Pp. 1041.
13. Bloom W.M.D., Fawcett D.M.D. (1990): Tratado de Histologia. Interamericana. Mexico. Pp. 1026.
14. Sharpe M. R. (1984): Intratesticular factors controlling testicular function. Biol. Reprod. 30:29.
15. Shearman P. R. (1979): Human Reproductive Physiology. 2a. edición. Blackwell Scientific Publication. Gran Bretaña. Pp. 491.
16. Nagano T. and Suzuki, F. (1976): Freeze-fracture observations of the intercellular junctions of sertoli and Leydig cells in the human testis. Cell Tissue Res. 166:37.

17. McKinley D., Podalsky E. and Porvankar M. (1978): Intercellular junctional complexes of the rat seminiferous tubules. A freeze-fracture study. *Anat Rec.* 189:211.
18. Gannell C.J. (1978): A freeze-fracture and lanthanum tracer study of the canine testis. *J Cell Biol.* 76:87.
19. Dym M. and Caviochia J.C. (1978): Functional morphology of the testis. *Biol Reprod.* 19:1.
20. Snell S. R. (1976): *Embriologia Medica. Interamericana.* 2a. edición. USA. Pp. 390.
21. Heller C.G. and Clermont Y. (1964): Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog Horm Res.* 20:545.
22. Clermont Y. and Bustos-Chregon E. (1969): Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *Amer J Anat.* 122:122.
23. Parvinen M., Nikula H. and Huntaniemi I. (1984): Influence of rat seminiferous tubules on leydig cell testosterone production in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 37:331.
24. Murano P. E. (1989): Maturational changes in steroidogenic enzyme activities metabolizing testosterone and dihydrotestosterone in two populations of testicular interstitial cells. *Acta Endocrinologica.* 121:477.
25. Yin L. A. A., Farley M. R. A. and Dwyer W. W. (1991): Regulation of testicular P-450 cholesterol side-chain cleavage and P-450 C17-20/C17 hydroxylase enzymes in the neonatal and adult rat. *Acta Endocrinologica.* 124:449.
26. Word A. R., George W. F., Wilson D. J. and Carr R. B. (1989): Testosterone synthesis and adenylate cyclase activity in the early human fetal testis appear to be independent of human chorionic gonadotropin control. *J Clin Endocrinol Metab.* 69:204.
27. Arey B. L. (1969): *Anatomía del Desarrollo. Tratado y Manual de Laboratorio.* Vazquez, Argentina. Pp. 547.
28. Sharpe M.R. (1987): Testosterone and spermatogenesis. *J Endocrinology.* 103:1.
29. William H. and Daughaday M.D. (1991): *Endocrine Control of Growth.* Elsevier, New York. Pp. 269.
30. Ganong F.W. (1989): *Fisiología Medica. El Manual Moderno.* Mexico. Pp. 691.

31. Rommerts J.F.F., Toerds K., Thermen N.P.A., Noort Van M. (1987): Multiple regulation of testicular steroidogenesis. *J Steroid Biochem.* 27:309.
32. Thaddeus M. and Lutwak M.C. (1981): *Male Reproductive Function and Semen*. Londres. Pp. 495.
33. Fishman J. and Hahn F. E. (1987): The nature of the final oxidative step in the aromatization sequence. *Steroid.* 50:339.
34. Wright N. J. and Akhtar M. (1990): Studies on estrogen biosynthesis using radioactive and stable isotopes. *Steroids.* 55:142.
35. Steinberger E., Browning Y.J. and Jr Grotjan E.H. (1993): Another look at steroidogenesis in testicular cells. In: *Recent Advances in Male Reproduction: Molecular Basis and Clinical Implications*. R. D' Agata, M.B. Lippset, P. Polosa and H.J. Van der Molen (eds). Raven Press, New York. Pp. 330.
36. Gailard G., Mak P., Dubois W. (1989): Regulation of spermatogenesis: The shark testis model. *J Exp Zool Suppl.* 2:23.
37. Payne H. A., Perkins M. L., Georgiou M. and Quinn G. P. (1987): Intratesticular site of aromatase activity and possible function of testicular estradiol. *Steroid.* 50:435.
38. Rommerts G.F.F. and Brinkman O.A. (1981): Modulation of steroidogenic activities in testis Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 21:15.
39. Dorrington J.H., Fritz I.B. and Armstrong A.T. (1979): Control of testicular estrogen synthesis. *Biol Reprod.* 19:55.
40. Cole H.H. and Cupps P.T. (1969): *Reproduction in Domestic Animals*. vol. I. Academic Press, New York. Pp. 507.
41. Kopera H. (1973): Estrogens and Psychic Functions. In: *Frontiers of Hormone Research. Ageing and Estrogens*. R. Hall, Inna Werner and H. Holgate (eds). vol. II. Switzerland. Pp. 191.
42. Balin H. G. S. (1972): *Reproductive Biology*. vol. II. Excerpta Medica, Amsterdam. Pp. 973.
43. Kalra P.S. and Kalra S.P. (1989): Do Testosterone and estradiol-17 β enforce inhibition or stimulation of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone secretion? *Biol Reprod.* 41:559.

44. Laws G. S., Webster C. J. and Miller L. W. (1990): Estradiol alters the effectiveness of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in ovine pituitary cultures: GnRH receptors versus responsiveness to GnRH. *Endocrinology*, 127:381.

45. Padmanabhan V., Kesner S.J. and Convey M.E. (1979): Effects of estradiol on basal and Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) induced release of Luteinizing Hormone (LH) from bovine pituitary cell in culture. *Biol. Reprod.* 19:609.

46. Ewing L. L., Gorski A. R., Shordone J. R., Tyler V. J., Desjardins C. and Robaire B. (1979): Testosterone-estradiol filled polydimethylsiloxane subdermal implants: Effect on fertility and masculine sexual and aggressive behavior of male rats. *Biol. Reprod.* 21:755.

47. Pang S. (1990): Editorial: Relevance of biological properties of progestan of oral contraceptives in treatment of androgen excess symptoms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71:6.

48. Robaire B., Duron J. and Hales F. B. (1987): Effect of estradiol-filled polydimethylsiloxane subdermal implants in adult male rats on the reproductive system, fertility and progenie outcome. *Biol. Reprod.* 37:327.

49. Matsuzoto M. A. (1990): Effects of chronic testosterone administration in normal men: Safety and high dosage testosterone and parallel dose-dependent suppression of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and sperm production. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70:292.

50. Roselli E. Ch. and Resko A. J. (1990): Regulation of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone levels by testosterone and estradiol in male rhesus monkeys. *Brain Res.* 509:349.

51. Bosch C. A. y Sibina B. J. (1973): Reproducción. *Toray. España*. Pp. 269.

52. Bartke A., Hafiez A.A., Sax J.F. and Daiteris S. (1978): Hormonal interactions in regulation of androgen secretion. *Biol. Reprod.* 19:44.

53. Hauger R.L., Chen I.Y.D., Kelch R.P. and Payne H.A. (1977): Pituitary regulation of Leydig cell function in the adult male rat. *J. Endocrinology*, 74:57.

54. Eckland A.J. and Lightman L.S. (1987): Hypothalamo-Hypophysial blood flow: A novel control mechanism in pituitary function? *J Endocrinol.* 113:R1.
55. Dan-Cohen H., Ben-Menahem D., Naor Z. (1990): The Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor: signals involved in gonadotropin secretion and biosynthesis. *Horm Res.* 33:76.
56. Purvis N., Cusan L. and Hansson V. (1991): Regulation of steroidogenesis and steroid action in Leydig cells. *J Steroid Biochem.* 15:77.
57. Cook B. (1987): Endocrine asymmetry. *J Endocrinol.* 113:331.
58. Sharpe M. R. (1995): Intratesticular regulation of testosterone secretion: comparison of the effects and interactions of hCG, an LHRH agonist and testicular interstitial fluid on Leydig cell testosterone secretion in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 41:247.
59. Britani C., Farini D., Canipari R. and Bardin W. C. (1989): Estradiol and plasminogen activator secretion by cultured rat sertoli cells in response to melanocyte-stimulating hormone. *J Andrology.* 10:202.
60. Reventos J., Ferrard-Saproni H.M., Chatelain G.P. and Saez M.J. (1999): Leydig cell and extracellular matrix effects on sertoli cell function. Biochemical and morphologic studies. *J Andrology.* 10:353.
61. Sharpe M.R., Bartlett J.M.S. and Allenby G. (1991): Evidence for the control of testicular interstitial fluid volume in the rat by specific germ cell types. *J Endocrinol.* 129:359.
62. Danzo J.B., Spyracos N.P. and Heather L.A. (1990): Hormonal regulation of androgen-binding protein in the rat. *Endocrinology.* 127:2829.
63. Besser G.M. and Thorner M.D. (1975): Prolactin and gonadal function. *Pathol Biol. (Paris).* 23:179.
64. Dufau M., Hsueh A.J., Cigarraga S., Backal A.J. and Catt K.J. (1978): Inhibition of Leydig cell function through hormonal regulatory mechanism. *Int J Andrology Suppl.* 2:19.
65. Payne H.A. (1993): Hormonal Regulation of Cytochrome P450 enzymes, cholesterol side chain cleavage and 17 α -Hydroxylase/C17-20 Lyase in Leydig cells. *Biol Reprod.* 48:399.

66. Johnson A.D., Gomes M.D. (1977): The Testis. vol. IV. Academic Press. USA. Pp. 637.
67. Brandes E. (1974): Male Accessory sex organs. Academic Press. USA. Pp. 527.
68. Molen H.J. Van der and Rommerts F.F.G. (1981): Testicular steroidogenesis. In: The Testes. Burger, H. and Dekretser D.M. (eds). Comprehensive Endocrinology Series. Raven Press. New York.
69. Orozco C. (1982): Aromatización de esteroides neutros por la fracción microsomal de la vesícula seminal y de la próstata de conejo adulto castrado. Informe final de servicio social presentado como tesis (Lic. Biología) UAM-I. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Pp. 37.
70. Freedman M.D., M.A., Freedman M.D., S.A. (1970): Introduction to Steroid Biochemistry and its Clinical Application. Thelma C. and Harriet L. (eds). Harper and Row. Publishers. USA. Pp. 201.
71. Nozu K., Dufau L. M. and Catt J. K. (1981): Estradiol receptor-mediated regulation of steroidogenesis in gonadotropin-desensitized Leydig cells. J Biol Chem. 256:1915.
72. Freeman A. D. (1985): Estradiol acts as a competitive inhibitor of the 3 β -hidroxysteroid dehydrogenase/15- Δ 4 isomerase enzyme of cultured Leydig tumor cells. Endocrinology. 117:2127.
73. Keel A.B. and Abney O.T. (1982): Effects of estradiol administration in vivo on testosterone production in two populations of rat Leydig cells. Biochem Bioph Res Commun. 107:1340.
74. Galina C., Satiel A., Valencia J., Becerril J., Bustamante G., Calderón A., Duchateau A., Fernández S., Olguín A., Parano R., Zarco L., (1986): Reproducción de Animales Domésticos. Limusa, México. Pp. 375.
75. Kelce R.W. and Ganjam K.V. (1987): Radiometric quantitation of 14-3-ketosteroid-5 α -oxidoreductase utilizing high performance liquid chromatography. Steroid. 52:217.
76. Balbotin J.B. and Bustos-Oregon E. (1989): Identification of androgen binding-protein (ABP) from testis and epididymis of the seasonal rodent, Octodon degus (Molina, 1952). J Andrology. 10:289.
77. Bermudez J.A., Leon C., Herrera J. (1973): Fundamento y estudio comparativo de dos metodos por saturación. Rev Med. IMSS. 12:11.

78. Herrera J., Montalvo I., Gonzalez-Garcia M.T., Sotelo A. and Bermudez J.A. (1983): Cottonseed flour effects on androgen testicular content and serum level in rats. Arch Androl. 11:161.

79. Herrera J., Montalvo I., Gonzalez-Garcia M.T., Sotelo A.G.S. and Bermudez J.A. (1984): Modifications in the testis steroidogenic pathways in rat fed with cottonseed flour. Arch Androl. 12:253.

80. Groves E. W., Franklin F.C. Jr and Sell B.H. (1968): Spectrophotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference. Anal Biochem. 22:195.

81. Morris D.J., Sardin W.C., Gunsalus G. and Ward A.J. (1990): Prolonged suppression of spermatogenesis by oestrogen does not preserve the seminiferous epithelium in procarbazine-treated rats. Int J Andrology. 19:190.

82. Saksena K.S., Lau I.F. and Chang C.M. (1978): Estrogens in the seminal vesicle fluid and the effect of exogenous estradio-17 β on hormonal profile in the male rat. Biol Reprod. 18:521.

83. Tsang B.K., Leung K.C.P. and Armstrong T.D. (1979): Inhibition by estradiol-17 β of porcine thecal androgen production in vitro. Mol Cell Endocrinol. 14:131.

84. Sanford M.L. (1985): Evidence that estrogen regulation of testosterone secretion in adult rams is mediated by both indirect (gonadotropin dependent) and direct (gonadotropin independent) means. J Andrology. 6:308.

85. Sairam R.M. and Bersan M.I. (1979): Direct inhibitory effects of estrogens on rat Leydig cells in vitro. Steroid. 33:233.

86. Brinkmann O.A., Leenborg G.F. and Molen J.H. Van der (1981): hCG-induced inhibition of testicular steroidogenesis: An oestradiol-mediated process? Mol Cell Endocrinol. 24:65.

87. Hunter G.M. and Armstrong T.D. (1997): Oestrogens inhibit steroid production by dispersed porcine thecal cells. Mol Cell Endocrinol. 50:165.

88. Cigorruga B. S., Dufau L.M. and Catt J.K. (1978): Regulation of luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in gonadotropin-desensitized Leydig cells. J Biol Chem. 253:4297.

89. Muroto E.P. and Payne A.H. (1978): Distinct testicular 17-Ketosteroid reductases one in interstitial tissue and one seminiferous tubules. Differential modulation by testosterone and metabolites of testosterone. *Biochim Biophys Acta*. 450:89.

90. Lee T. H. and Bohr M.J. (1990): Inhibition of the activities of P450 cholesterol side-chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the amount of P450 cholesterol side-chain cleavage by testosterone and estradiol-17 β in hen granulosa cells. *Endocrinology*. 126:779.

91. Danforth R.D., Elkind-Hirsch K. and Hodgen D.G. (1990): In vivo and in vitro modulation of gonadotropin-releasing hormone metabolism by estradiol and progesterone. *Endocrinology*. 127:319.

92. Kalla R.N., Nisula C.B., Menard R. and Loriaux L. (1980): The effect of estradiol on testicular testosterone biosynthesis. *Endocrinology*. 106:35.

93. Nozu K., Dehejia A., Zawistowich L., Catt K.J. and Dufau L.M. (1982): Gonadotropin-induced desensitization of Leydig cells in vivo and in vitro: Estrogen action in the testis. In: Bardin W.C. and Sherins J.R. (eds). *The Cell Biology of the Testis*. Annals of the New York Academy of Sciences. USA. Pp.543.

94. Gaytán F., Aceitero J., Bellido C., Pinilla L., Aguilar R. and Aguilar E. (1990): Are eosinophil leucocytes involved in the oestrogenic response of the postnatal rat epididymis ?. *Int J Andrology*. 13:500.