

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



**MEDICION DE POZAS METABOLICAS DE
ESTEROIDES EN TESTICULO HUMANO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:

LAURA CALDERON DE LOS SANTOS

MEXICO, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

| | Página |
|---|--------|
| 1.0 INTRODUCCION | 1 |
| 1.1.-Descripción Anátomo-Histológica del Testículo Humano. | |
| 1.2.-Fisiología del Testículo. | 2 |
| 1.3.-Esteroides. Aislamiento y Determinaciones. | 4 |
| 1.4.-Metabolismo y Síntesis de Andrógenos. Células de Leydig. | 9 |
| 1.5.-Objetivo | 12 |
| 2.0 MATERIAL Y METODO | 16 |
| 2.1 METODOLOGIA | 19 |
| 3.0 RESULTADOS | 26 |
| 4.0 DISCUSION | 31 |
| 5.0 CONCLUSIONES | 41 |
| 6.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 43 |

ABREVIATURAS EMPLEADAS.

| | |
|------|-----------------------------------|
| Ci | Curie |
| cpm | cuentas por minuto |
| g | fuerza gravitatoria |
| mm | milímetros |
| µm | micrómetros (10^{-6} metro) |
| nm | nanómetros (10^{-9} metro) |
| ml | mililitros |
| µl | microlitros (10^{-6} litro) |
| µg | microgramos (10^{-6} gramo) |
| ng | nanogramos (10^{-9} gramo) |
| pg | picogramos (10^{-12} de gramo) |
| M | molar |
| RE | retículo endoplásmico |
| RIA | radioinmunoanálisis |
| A | Androstendiona |
| DHT | dihidrotestosterona |
| DHEA | dehidroepiandrosterona |
| Preg | pregnenolona |
| Prog | progesterona |
| T | testosterona |

TABLA 1

NOMENCLATURA DE ESTEROIDES EN TESTICULO

| Nombre trivial | Nombre sistemático (IUPAC) |
|---------------------------------|---|
| Androstendiona | 4-androsten-3,17-diona |
| Dehidroepiandrosterona | 5-androsten-3 β -ol-17-ona |
| 17 α hidroxipregnenolona | 5-pregnen-3 β ,17 α -diol-20-ona |
| 17 α hidroxiprogesterona | 4-pregnen-17 α -ol-3,20-diona |
| Pregnenolona | 5-pregnen-3 β -ol-20-ona |
| Progesterona | 4-pregnen-3,20-diona |
| Testosterona | 4-androsten-17 β -ol-3-ona |

1.0 I N T R O D U C C I O N

1.1.- Descripción Anátomo-Histológica del Testículo Humano.

Los testículos son dos órganos que forman parte del aparato reproductor masculino. Su forma es ovoide y miden de cuatro a cinco centímetros de largo y tres a cuatro centímetros de ancho. Se desarrollan en la cavidad abdominal, a partir de las gónadas indiferenciadas del embrión, y posteriormente migran, en la vida extrauterina, a través del canal inguinal, localizándose en los bordes anteriores de la raíz de los muslos, dentro del escroto. Están cubiertos por una cápsula gruesa denominada albugínea, cuya porción más desarrollada se conoce como mediastino, el cual se encuentra perforado por conductos que, en su conjunto, constituyen el rete testis.

Los testículos presentan fundamentalmente las siguientes características:

Los túbulos seminíferos, cuyas paredes están formadas por células epiteliales que forman el epitelio germinativo, donde se encuentran, además, las llamadas células de Sertoli, que son células voluminosas, y se extienden de la base del epitelio hacia el interior del túbulo.

La segunda característica es la presencia de células que

se encuentran entre los túbulos seminíferos, en el tejido intersticial del testículo, y son denominadas células de Leydig o intersticiales, las cuales son consideradas células endócrinas.

1.2.- Fisiología del Testículo.

Los testículos llevan a cabo dos funciones fundamentales, una reproductiva y otra hormonal. La primera consiste en la espermatogénesis, que se lleva a cabo en el interior de los túbulos seminíferos, e incluye el desarrollo y maduración de las células germinales o espermatogonias. Dichas células proliferan y se diferencian pasando por tres etapas: Una de crecimiento, en que las células aumentan de volumen y son conocidas como espermatocitos primarios. Divisiones mitóticas y divisiones meióticas, que darán como resultado los espermatocitos secundarios y las espermátidas (estas últimas células tienen ya la mitad de cromosomas). Las espermátidas se transformarán en los espermatozoides o células reproductoras masculinas por medio del fenómeno llamado espermiogénesis, liberándose hacia la luz de los túbulos seminíferos para llegar al rete testis y seguir su trayecto por el tracto genital masculino.

La segunda función incluye la síntesis y secreción de los andrógenos, nombre genérico para las sustancias con activi-

dad de hormona sexual masculina, dicha síntesis se lleva a cabo en las células intersticiales o de Leydig.

Ambas funciones testiculares están controladas por las hormonas gonadotróficas, secretadas por la glándula pituitaria anterior. Dichas hormonas son la hormona estimulante de los folículos FSH, que actúa sobre las células germinales para promover la espermatogénesis; y la hormona estimulante de las células intersticiales ICSH (hormona luteinizante), que actúa en las células de Leydig, promoviendo la secreción de andrógenos y estrógenos (21, 52).

Las células intersticiales o de Leydig como ya fue mencionado, se encuentran entre los túbulos seminíferos, en el tejido conectivo. Su principal función es la de la secreción de andrógenos que regulan el desarrollo del tracto reproductor masculino y mantienen las características masculinas externas o caracteres sexuales secundarios (musculatura del cuerpo, patrones de crecimiento del vello, timbre de la voz etc.). En el humano, el tejido intersticial ocupa cerca del 34% del volumen testicular, y las células de Leydig constituyen el 12% de éste (48). La secreción de las células de Leydig es de aproximadamente siete miligramos del principal andrógeno, la testosterona, diarios en un hombre normal. Esta hormona sale al tejido intersticial siguiendo tres rutas posibles: vasos sanguíneos, vasos linfáticos y túbulos seminíferos, aunque la mayor parte de la testosterona va a la sangre. Se piensa que ésta entra libremente a los

túbulos seminíferos (45), y es allí donde probablemente promueve o ayuda a la espermatogénesis (53,23). Existen evidencias de que las células de Leydig fetales ya secretan testosterona (2,8,9,29), y que es ésta, precisamente, la que estimula el desarrollo genital del feto masculino.

La función de las células de Leydig fue desconocida por mucho tiempo, aún cuando ya se sabía que los testículos ejercían un control sobre los caracteres sexuales masculinos. En 1850, Franz Leydig ya había descubierto en el testículo de varios mamíferos un tipo diferente de células (41), pero no fue sino hasta 1903, en que Bouin y Ancel (10) postularon la función endócrina de estas células, basándose en cuatro observaciones:

- A) la forma que presentaban era epitelbidea y su núcleo prominente como en muchas células secretoras.
- B) su orientación hacia los vasos sanguíneos y no hacia los túbulos, hacía pensar en transporte de una hormona.
- C) la permanencia de los caracteres sexuales secundarios en individuos cuyos testículos presentaban los túbulos seminíferos dañados, pero no así las células de Leydig.
- D) su presencia, en gran número, en el testículo embrionario, cuando el tracto reproductor masculino se encontraba en desarrollo.

1.3.- Esteroides. Aislamiento y Determinaciones.

Ya para 1935, se aisló e identificó la testosterona (15, 19) como la hormona masculina del testículo, pero no se podía

precisar si era sintetizada en las células de Leydig o en otro sitio dentro del testículo.

La testosterona, así como otros compuestos biológicos de gran importancia (hormonas adrenocorticales, estrógenos, ergosterol, colesterol), son esteroides, compuestos orgánicos que contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. Están compuestos por tres ciclohexanos, un anillo ciclo pentano y una cadena lateral, que varía en tamaño. Dependiendo del número de átomos de carbón de estos compuestos se les agrupa en: Estranos, Androstanos, Pregnanos y Colestanos, según tengan 18, 19, 21 ó 27 átomos respectivamente.

Se han establecido cuatro glándulas como fuente de producción de esteroides:

Testículos, ovarios, corteza suprarrenal y placenta.

Debido a la gran importancia fisiológica de los esteroides, la química, en este campo, empezó a florecer y desarrollarse. Primeramente se dedicaron a aislar e identificar una serie de esteroides, llegando a cerca de doscientos.

Posteriormente, se intensificaron los estudios sobre el metabolismo de los esteroides, entendiéndose por metabolismo, aquellas reacciones biosintéticas que conducen a la producción de una hormona o sustancia específica, y las transformaciones que ésta pueda tener en los tejidos periféricos.

La biosíntesis de las hormonas esteroideas, incluyendo la posible conversión a andrógenos y estrógenos, fue una fase del metabolismo considerada por los primeros investigadores. Se encontraron con problemas respecto a las posibles vías de biosíntesis seguidas por los esteroides, que se fueron aclarando posteriormente conforme fueron descubriéndose nuevas técnicas para su estudio.

En la cuarta década del siglo veinte, se descubrieron dos técnicas de gran valor. Gerard y Sandulesco (1936) introdujeron agentes eficientes para la separación de esteroides cetónicos de estructuras no cetónicas. Reichstein (1936) introdujo el uso de la columna de adsorción cromatográfica para la separación de esteroides adrenocorticales, que Callow y Callow utilizaron. Gracias a estas dos técnicas, se obtuvieron resultados de mejor rendimiento en la obtención de esteroides de la orina. Posteriormente, se adaptaron nuevas modalidades a la técnica de cromatografía. La cromatografía en papel (1950) por Zaffaroni, aplicada a los esteroides, marcó una nueva era en el análisis, y permitió la experimentación a nivel de microgramos; la columna de partición y las cromatografías de placa fina y de gases, permitieron otro avance, pudiéndose separar e identificar cantidades del orden de 10 a 100 nanogramos.

El empleo de técnicas físicas ha sido de gran ayuda para probar la estructura de los compuestos esteroideos, su separación y su fraccionamiento. El desarrollo de la espectroscopía infrarroja por Furchgot (1946) y por Jones y Dorbiner (1948) fue un avance muy importante para la identificación de esteroideos. Las determinaciones por ultravioleta de Dorfman (1953); la resonancia magnética de Shoolery y Rogers (1958); la espectrometría de masas de Ried (1958) y el análisis cristalográfico de rayos X de Bernal (1932) y Crowfoot (1957), fueron otros avances. Fue de gran ayuda, también, el desarrollo de ciertas reacciones de color como la de Kober (1938), la de Zimmerman (1935) y el análisis fluorescente de Cohen y Bates (1947).

Otro avance considerable fue el uso de isótopos radiactivos y de procedimientos enzimáticos, Hurlock y Talalay (1958), así como de preparaciones de enzimas biosintéticas de esteroideos, como reactivos.

El metabolismo de las hormonas esteroideas y las sustancias relacionadas directamente con éstas, se ha estudiado con una variedad de técnicas, incluyendo las de perfusión y el uso de material biológico tanto "in vivo" como "in vitro". Primeramente, predominaron los estudios "in vivo", consistiendo en la administración, generalmente, a humanos (16) de grandes cantidades de hormonas esteroideas y sustancias relacionadas que se pudieran convertir a éstas, aislándose los productos metabó-

licos de la orina. Las técnicas posteriores utilizaron la perfusión de glándulas, cortes de tejido, homogenizados de tejido, e incluso enzimas de tejido, con esteroides marcados en uno o varios puntos del núcleo o de la cadena lateral (C_{14} , deuterio, tritio).

Con estas técnicas se pudieron elaborar algunas vías de biosíntesis para los esteroides adrenocorticales (Hechter 1949, 1951).

Las técnicas "in vivo" que se han utilizado para conocer los productos finales obtenidos, han aportado gran utilidad, sin embargo, los pasos intermediarios de las reacciones esteroideas no han sido posible establecerlos de esta manera.

Las técnicas "in vitro" son de gran ayuda y a su vez complementarias para delinear los pasos y mecanismos involucrados en la vía metabólica de los esteroides.

Por otra parte, con el desarrollo de técnicas químicas, en 1958 se localizó la enzima esteroideogénica 3β - hidroxí-esteroide dehidrogenasa (40, 56) en muchos mamíferos. Su actividad fue difícilmente probada en el testículo humano (43), pero finalmente se logró, escogiendo sustratos y condiciones de incubación adecuados (20). En otros mamíferos se probó su actividad específica en las células de Leydig. Posteriormente se lograron separar los componentes testiculares (túbulos y células intersticiales) y se incubaron por separado con Prog³H. Se ob-

servó que las células de Leydig tenían una habilidad preponderante en convertir la progesterona a andrógenos, mientras que los túbulos seminíferos mostraban poca actividad. Otro factor muy importante que se observó fue que la conversión de colesterol a andrógenos ocurría solamente en el tejido intersticial (24).

Un avance más fue el empleo de la microscopía electrónica y el fraccionamiento celular por centrifugación, al conocerse mejor las estructuras citológicas de las células de Leydig, y sus componentes.

1.4.- Metabolismo y Síntesis de Andrógenos. Células de Leydig.

En el hombre, las células de Leydig tienen forma poligonal y un diámetro de 15 a 20 μ m. El orgánulo más abundante y prominente es el retículo endoplásmico (RE), que consiste en una serie de túbulos interconectados. Las mitocondrias se presentan en tamaño y número moderado, su forma es lamelar por lo general, algunas veces tubular. El aparato de Golgi tiene de cuatro a seis sacos aplanados y sus vesículas son muy pequeñas, encontrándose en la periferia. Presenta dos centriolos, gotas de grasa y unos cristales que se conocen como cristales de Reinke siendo exclusivos de las células del hombre. Presentan, además, microtúbulos, microfilamentos, lisosomas primarios, vacuolas digestivas (lisosomas secundarios) que son muy comunes. El núcleo es muy grande y su forma es semiovoide,

Por medio de estudios químicos de fracción celular (50), ha sido posible determinar el lugar donde se localizan las enzimas y/o sistemas enzimáticos que llevan a cabo la biosíntesis de esteroides en la célula de Leydig.

Por el gran tamaño del núcleo de las células de Leydig, su forma, la orientación de éstas a vasos sanguíneos, la gran cantidad de retículo endoplásmico liso, la presencia de enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides y la gran habilidad para sintetizar andrógenos, a diferencia de los túbulos seminíferos, se comprobó que las células de Leydig son células secretoras cuya principal función es la síntesis de andrógenos a partir del colesterol.

Actualmente se han señalado las posibles vías de biosíntesis que sigue el colesterol dentro de la célula para llegar a testosterona, principal andrógeno secretado. También se conocen las enzimas involucradas. (Fig 1).

La biosíntesis de colesterol se lleva a cabo en el RE de las células intersticiales por medio de enzimas unidas a éste, cuya abundancia ofrece una gran superficie de interacciones(1,3,4 5). La mayoría del colesterol utilizado para la biosíntesis es elaborado en las mismas células (37,57), utilizando muy poco del derivado del plasma sanguíneo.

Una vez sintetizado el colesterol es esterificado y acumulado en gotas de lípido, proporcionando así más colesterol

para nuevas biosíntesis de esteroides. Este colesterol primeramente entra en la mitocondria, y es allí donde se lleva a cabo el rompimiento de su cadena lateral, por acción de las 20 y 22-hidroxiilasas y las 20-22 liasas o desmolases, que se cree están localizadas en las crestas de las mitocondrias (58,59). Se desconoce la manera de como atraviesa el colesterol la membrana interna de la mitocondria (14).

Algunas mitocondrias contienen gotas de lípidos donde posiblemente se pudiera acumular el colesterol, o la Pregnenolona allí formada. Se ha sugerido que la HL regula el sistema de rompimiento de la cadena lateral del colesterol, teniendo como intermediario al AMPc, y se considera que este es un paso limitante para el control de la biosíntesis de esteroides (24).

Una vez formada la Preg, sale de la membrana mitocondrial al citoplasma celular, donde se encuentran las enzimas necesarias para la conversión de Preg a testosterona, la cual, se encuentra íntimamente unida al RE (30). Algunas de estas enzimas se encuentran asociadas a transportadores de electrones, la 17^α hidroxiilasa se encuentra asociada a flavoproteínas y al citocromo P₄₅₀.

Hay dos caminos o vías posibles a seguir para la biosíntesis de andrógenos en el testículo humano, el de la Δ_4 Prog y el de la Δ_5 DHEA, este último considerado como la vía predominante por algunos autores (60). Sin embargo, se desconoce cual

sea el camino preferente para el metabolismo de la Preg en la gónada masculina.

Como se ha mencionado con anterioridad, el problema de detectar pequeñas cantidades de esteroide en muestras biológicas ha sido solucionado, en parte, por el desarrollo de técnicas durante los últimos diez años. Con estas técnicas ha sido posible efectuar estudios tanto "in vivo" como "in vitro", ya que, anteriormente, en la mayoría de los casos se agregaban precursores de esteroides marcados con isótopos radiactivos, rompiéndose la estructura celular (homogenizados y fracciones subcelulares). Como consecuencia, había alteraciones de las condiciones fisiológicas normales del órgano.

Es importante señalar, que se conocen los esteroides presentes en el testículo, las enzimas involucradas en las vías de biosíntesis de éstos, las vías metabólicas posibles, pero aún son desconocidas las "pozas metabólicas" de dichos esteroides, es decir, las concentraciones reales involucradas en el proceso metabólico.

1.5.- Objetivo.

El objetivo de este trabajo es precisamente estudiar las "pozas metabólicas" de los esteroides presentes en el testículo humano, empleando el radioinmunoanálisis para la medición de los compuestos esteroideos involucrados en la biosíntesis de hormonas androgénicas.

Este método se basa en el análisis por saturación, cuyo principio es la ley de acción de masas (27, 60), la cual establece que al mezclar una sustancia P con otra E, cada una con una concentración inicial, se genera una velocidad de reacción K_1 para la formación del complejo PE, y otra velocidad K_2 , para su disociación.

En el análisis por saturación tenemos que E corresponde a moléculas del mismo tipo (esteroides) que compiten por los sitios de unión de otra molécula P, encontrada en menor concentración. Dependiendo del esteroide que se une a los sitios de unión de la proteína P, se formará un complejo PE* o PE si el esteroide es radiactivo o no. Como las concentraciones de E y E*, exceden los sitios de unión de P, se establece una competencia entre ambos.

En el radioinmunoanálisis la proteína P es un anticuerpo específico para el esteroide.

Finalmente, establecido el problema del desconocimiento del metabolismo endógeno de los esteroides en el testículo, y con la posibilidad de aplicar el RIA como metodología, con las características de confiabilidad requeridas para los límites de sensibilidad del orden de picogramos, se pretende llevar a cabo el objetivo de este trabajo, cuya hipótesis se plantea en los siguientes términos.

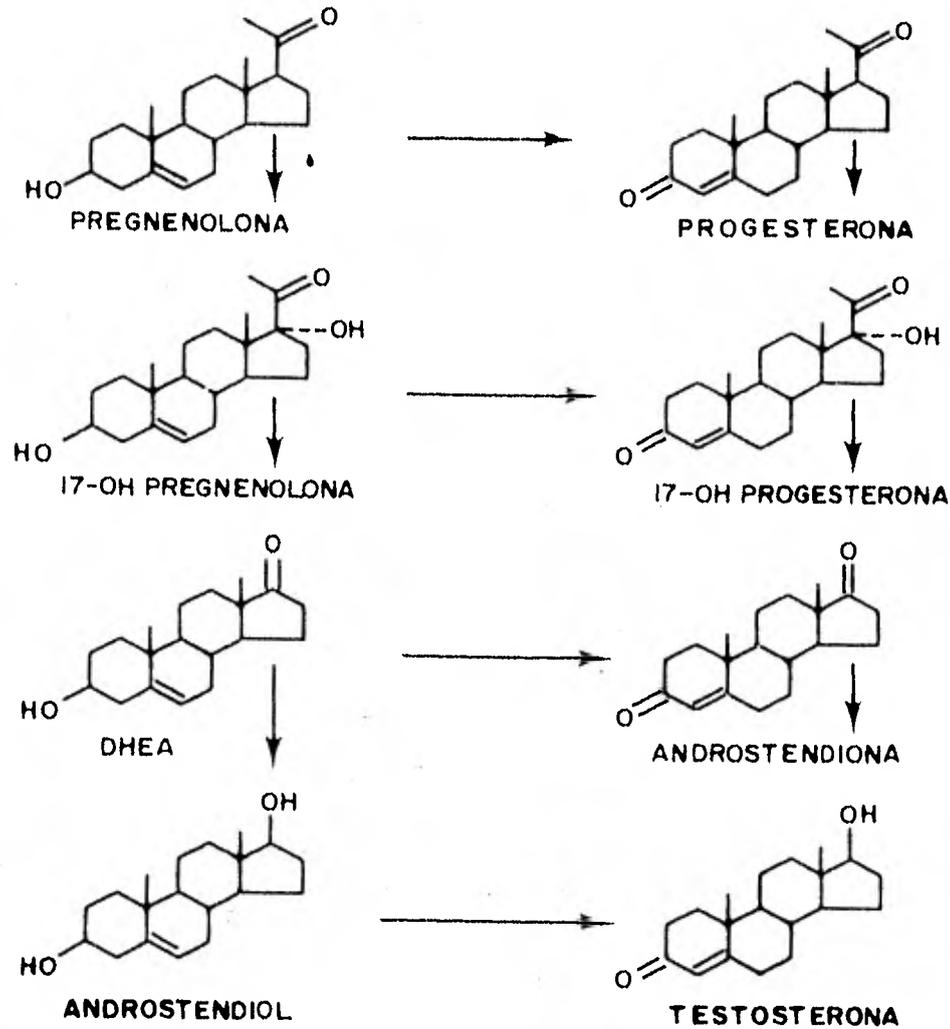
Se ha demostrado que la biosíntesis de testosterona en

el tejido testicular humano se inicia a partir del colesterol e incluye una serie de pasos metabólicos que siguen por Preg- Prog- 17 OH Prog- A- T, siendo la vía metabólica que cuenta con mayores evidencias; por lo dicho, se esperan encontrar las mayores pozas metabólicas en esos compuestos.

BIOSINTESIS DE ANDROGENOS

ESQUEMA GENERAL

FIGURA No. 1



2.0.- M A T E R I A L Y M E T O D O .

Material biológico:

Se colectaron veinte muestras de testículo humano, durante la autopsia de personas que no hubieran tenido enfermedades relacionadas directamente con las vías genitourinarias. Las muestras fueron tomadas en el Servicio de Patología del Hospital General del Centro Médico Nacional, dentro de las 24 horas después de fallecido el paciente.

Se procuró mantenerlas a baja temperatura (0-4°C), desde su obtención hasta su posterior procesamiento.

Reactivos:

Solución amortiguadora: con fosfato dibásico de sodio de Baker Chemical Co., gelatina. lote 508696 de BBL, azida de sodio de Eastman Organic Chemicals (este último con preservativo).

Acido etilen diaminotetracético (EDTA) en forma de sal.

Sal tetrasódica lote 800641 de Calbiochem.

Carbón activado Norit-A lote 289 de Matheson Coleman and Bell.

Dextrán T-70 lote 7981 de Pharmacia.

Acido Clorhídrico.

Todos los reactivos anteriores en grado analítico.

Disolventes:

Eter etílico, metanol, etanol, benceno, acetato de etilo, tolueno, acetona, cloruro de metileno.

Solución de cloruro de sodio al 0.9%.

Todos los disolventes se destilaron antes de su uso y fueron de grado analítico.

Esteroides no radiactivos:

Progesterona, 17-hidroxiprogesterona, androstendiona, testosterona, dihidrotestosterona, dehidroepiandrosterona, pregnenolona y estradiol. Se obtuvieron de Steraloids Inc.; siendo recristalizados antes de ser utilizados.

Esteroides radiactivos:

Progesterona 1, 2-³H; 17 α hidroxiprogesterona 1, 2-³H; pregnenolona 7-³H; 17 Pregnenolona 7-³H; androstendiona 1, 2-³H; dihidrotestosterona 1, 2-³H; testosterona 1, 2-³H; dehidroepiandrosterona 7-³H, sulfato de pregnenolona 7-³H, estradiol 17 β -6, 7-³H.

Todos con actividad específica entre 20 y 50 Ci/mM, se obtuvieron de New England Nuclear Corp, y se purificaron por cromatografía en capa fina (CCF) antes de ser utilizados. Se comprobó su pureza radioquímica, agregando una pequeña alícuota a una cantidad conocida de esteroide no radiactivo, y cristalizán

dose a una actividad específica constante.

Se utilizaron cromatoplacas de Sílica-gel con fluorescencia en 254 nm y con 0.25 mm de espesor de E. Meck, A. G. Darmstadt lote 147351.

Como soluciones de centelleo se usaron:

2, 5 difenioxasol (PPO) y p-bis (2, 5 feniloxasisolil) benceno (POPOP) de grado de centelleo de New England Nuclear Corp. en la proporción de cuatro gramos y 0.05 gramos respectivamente por litro de tolueno.

Anticuerpos:

Los anticuerpos fueron producidos en los laboratorios de la Sección de Andrología de la División de Endocrinología y Reproducción de la Unidad de Investigación Biomédica, CMD IMSS.

Todos los anticuerpos obtenidos fueron titulados y valorados en cuanto a su especificidad antes de ser utilizados para el radioinmunoanálisis.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos: suero anti-progesterona, suero anti-pregnenolona, suero anti-estradiol, suero anti-androstendiona, suero anti-dihidrotestosterona, suero anti-testosterona, suero anti-dehidroepiandrosterona.

En la determinación de proteínas se utilizó como pa-

trón, albúmina sérica bovina, fracción V de Sigma Chemical Co.

Equipo:

Balanzas analíticas Mettler modelos B y M.

Potenciómetro Beckman digital modelo 3550.

Mezcladores por vibración y magnéticos.

Horno con presión reducida, Thelco, modelo 19.

Espectrómetro de centelleo líquido, Packard Tricarb, modelo 3320.

Homogenizador Virtis; otro tipo Potter con émbolo de teflón y tubo de vidrio liso.

Metodología.

Tratamiento de las muestras.

Una vez obtenidos los testículos, se limpiaron, separando la túnica albugínea, se pesaron y se homogenizaron con 25 ml de solución de NaCl al 0.9%. Esto se efectuó a 4°C.

Se centrifugó el homogenizado, usando el sobrenadante y desechando el sedimento. Esto se hizo a baja velocidad (500) rpm.

Cuantificación de proteínas.

Las proteínas fueron medidas por el método de Groves (22), utilizando como patrón, albúmina sérica bovina y haciendo lecturas a dos longitudes de onda, 244 nm y 233 nm, con un espec

trofotómetro Pye UNICAM-SP 6-500.

Determinación de esteroides.

El radioinmunoanálisis fue empleado para cuantificar las pozas metabólicas de Prog, Preg, A, DHT, T, DHEA y estradiol.

Método general: (Posteriormente se describirá para cada esteroide). El método consta de las siguientes etapas. Se pone un volumen de muestra (del sobrenadante obtenido en la centrifugación), y se le agregan 1000 cpm aproximadamente del esteroide radiactivo (trazador), poniendo las mismas alícuotas de radiactividad a viales de conteo. Esto, con el objeto de controlar las pérdidas ocurridas durante el desarrollo metodológico posterior.

Extracción.- Se agrega un disolvente orgánico adecuado en cuanto a la polaridad de los esteroides por extraer, se agita un minuto aproximadamente, se separa la fase acuosa de la orgánica por congelación de la primera, mediante la inmersión del tubo en una mezcla de hielo seco-acetona. Se decanta la fase orgánica a otro tubo y se evapora a sequedad con una corriente de aire seco en un baño de agua a 30°C.

Purificación.- El residuo obtenido es transferido con una mezcla de éter etílico-metanol a una cromatoplaqueta de sílica-gel. En los extremos de la placa se aplican uno o dos µg de los esteroides, como una referencia (estándar). Una vez aplicada la muestra y el estándar, se desarrolla la placa, siempre en

el mismo sentido, en una serie de sistemas de disolventes, que resulten apropiados para la mejor separación entre los esteroides a medir. Las placas se revelan posteriormente, ya sea con una lámpara de luz ultravioleta, o por reacciones químicas específicas, marcando así las zonas correspondientes a los esteroides con un círculo (estándar), y en el resto de la placa se marcaron las áreas respectivas, tomando un centímetro hacia arriba y hacia abajo del centro de la zona revelada para cada esteroide. Se desprende esta área y se aspira mediante succión a una pipeta Pasteur que estará previamente empacada con fibra de vidrio.

Elución.- Se eluye el esteroide de la sílica gel con 1.1 ml de mezcla de éter etílico-metanol. Se toman dos alícuotas del volumen obtenido por la elución, una para calcular la recuperación del trazador y corregir las pérdidas durante la extracción y la purificación. La otra alícuota se coloca en un tubo de ensaye y se evapora a sequedad.

Análisis.- Se prepara una curva tipo con concentraciones conocidas de esteroide no radiactivo: 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 5000 pg. Cada tubo es elaborado por duplicado. Se prepara una solución con el anticuerpo en la dilución requerida dependiendo de su título y del rango de sensibilidad, con la solución amortiguadora de fosfato 0.25 M, conteniendo azida de sodio y gelatina, ambas al 1% y a un pH de 7.0. Se añade además el esteroide radiactivo en una concentración de 5000 cpm

aproximadamente en cada 500 μ l de la mezcla.

A los tubos de la curva y de las muestras, después de que se ha evaporado el disolvente, se les agregan 500 μ l de la mezcla, se agitan y se incuban a 4°C durante 18 horas, tiempo más que suficiente para llegar al equilibrio.

Separación de fases.- Se agregan a los tubos 200 μ l de una suspensión de carbón activado-dextrán, se agitan y se centrifugan a 800 x/g durante 15 minutos, a 4°C. El sobrenadante se decanta a viales de conteo. Se agregan 5 ml de solución de centelleo a los viales de recuperación y a los del análisis. Finalmente se cuenta la radiactividad presente en el espectrómetro de centelleo líquido.

Para todos los esteroides se procedió según se indica en la metodología general, presentándose algunas variaciones que se citarán a continuación.

Radioinmunoanálisis para Progesterona y 17 α hidroxiprogesterona (7).

La extracción se llevó a cabo con éter etílico, 10 ml. El residuo obtenido de la extracción y evaporación fue reconstituido con éter etílico-metanol en una proporción de 3:1, para su posterior aplicación a cromatoplasmas. Las placas se desarrollaron en los siguientes sistemas: Benceno 100%; Eter etílico-benceno 2:1.

La elución se realizó con éter-metanol 95:5.

El anticuerpo requerido para la mezcla se diluyó para la Prog y para la 17 OH Prog 1:2500.

El carbón dextrán utilizado estaba en una relación de 0.25-0.25 %.

Radioinmunoanálisis para Androstendiona, Dihidrotestosterona y Testosterona (39).

La extracción se hizo con éter etílico 10 ml. El residuo obtenido de la extracción y evaporación se reconstituyó con éter metanol 2:1 y se aplicó a cromatoplacas. Estas se desarrollaron en Benceno 100%; Benceno-acetato de etilo 7:3; y en Benceno-metanol 9:1.

Se hicieron curvas para cada esteroide y se mezclaron el esteroide radiactivo, la solución amortiguadora y el anticuerpo en las diluciones siguientes:

Para Androstendiona 1:5000 DHT 1:10 000

Testosterona 1:5000

Se incubó y se separaron fases con carbón-dextrán 0.25-0.25%.

Radioinmunoanálisis para Estradiol (38).

La extracción se hizo con éter etílico 10 ml. Se evaporó y se reconstituyó con éter etílico-metanol 9:1, dejando un volumen de 1.1 ml para posteriormente tomar alícuotas de recuperación y análisis.

Una vez hecha la curva, se preparó la mezcla poniendo el esteroide radiactivo en una concentración de aproximadamente 10 000 cpm en cada 500 μ l, el anticuerpo en una dilución de 1:100 000.

Se incubó y se separaron las fases con carbón activado-dextrán 0.625-0.0625 g.

Radioinmunoanálisis para Pregnenolona, Dehidroepiandrosterona y sus formas sulfoconjugadas (28).

En este radioinmunoanálisis se hicieron dos extracciones con el objeto de separar, primeramente, las formas sulfoconjugadas de Preg y DHEA. En la primera extracción se usó tolueno, y una vez separada la fase orgánica de la inorgánica, se trataron por separado. En la fase acuosa se encontrarían los esteroides sulfoconjugados. Se les agregó 20% de NaCl (saturado), y se ajustó con HCl a un pH de 1; se efectuó una segunda extracción con 10 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se incubó a 37°C durante 12 horas. Se evaporó posteriormente.

La fase orgánica de la primera extracción, se evaporó también y se aplicó a cromatoplasmas de la misma manera que se hizo con la obtenida de la segunda extracción, cada una por separado y para cada muestra.

Se usó éter etílico-metanol 2:1 para aplicar a las placas, las cuales se desarrollaron en benceno 100%; benceno-acetato

de etilo 8:2 y benceno-metanol 95:5.

Se revelaron las placas con el reactivo de Oërtel (ácido sulfúrico-etanol 2:1).

Se eluyó con 1.5 de éter etílico-metanol 95:5.

Elaboradas las curvas para DHEA y Preg, se preparó la mezcla para cada esteroide con las siguientes condiciones:

Para Preg se puso el anticuerpo en una dilución de 1:8000 y el esteroide radiactivo en 5000 cpm aproximadamente pa ra cada 500 μ l.

Para DHEA se diluyó el anticuerpo 1:6000, y el esteroide radiactivo a 5000 cpm en cada 500 μ l.

Se incubaron los tubos de la curva y del ensayo con la mezcla durante 24 horas. Se separaron las fracciones con carbón dextrán 0.25-0.25 %.

3.0 .- R E S U L T A D O S

Con respecto al método empleado, el radioinmunoanálisis, se consideraron ciertos parámetros como determinantes para la confiabilidad de los resultados obtenidos, entre otros tenemos:

La sensibilidad del método, es decir, la variabilidad de la dosis 0 ng, encontrándose que el coeficiente de variación (C. V.) para todos los esteroides analizados fue menor al 2%.

La mínima dosis que se detectó fue de 10 pg para el estradiol, de 15 pg para DHEA y Preg; de 10 pg para A, DHT y T; de 50 pg para Prog y 17 α OH Prog.

Los blancos determinados en el método fueron menores de 20 pg, excepto en los radioinmunoanálisis para Prog y 17 α OH Prog, que se encontraron con un valor promedio de 50 pg.

La exactitud del método, considerada como la recuperación de una cantidad del esteroide a medir, agregado al inicio, fue de aproximadamente el 80%.

La recuperación del trazador fue, para todos los casos, superior al 70%, solo para Preg fue del 40% y para Androstendiona del 60%.

Los errores del pipeteo (10 y 50 μ l) fueron del 2% como coeficiente de variación, coincidiendo con el error de con-

teo propio del espectrómetro.

Con respecto al homogenizado del tejido testicular, se tuvieron ciertos problemas al utilizar el homogenizador de aspas Virtis, ya que los túbulos seminíferos difícilmente se rompían debido a su elasticidad, enredándose y formando un conglomerado. Después de procesar las muestras en el Virtis, se pasaron a un homogenizador de tipo Potter con émbolo de teflón, y se obtuvo así una mezcla más homogénea.

A cada una de las muestras se les determinaron las proteínas totales y se obtuvieron resultados similares, presentando, todas ellas, un contenido uniforme, de 17.5 mg proteína/ml de homogenizado, promedio y límites de 15.1 mg/ml a 20.8 mg/ml de homogenizado.

La cantidad medida para cada esteroide se encuentra en la tabla 11 y se representa en la Figura 2.

Como se observa en la Figura 2, se separaron los esteroides determinados en dos grupos: Los que son sintetizados dentro de las células de Leydig y aquellos que se sintetizan fuera de éstas.

Dentro del primer grupo, el esteroide encontrado en mayor concentración fue la testosterona, 0.460 ng/mg proteína, siendo la poza metabólica de mayor tamaño. Siguen las de Prog, 17 α OH Prog y Preg, y por último, las correspondientes a A y DHEA, que resultaron las pozas más pequeñas.

De los esteroides bioformados fuera de la célula de Leydig, la 5α dihidrotestosterona fue más abundante que los estrógenos.

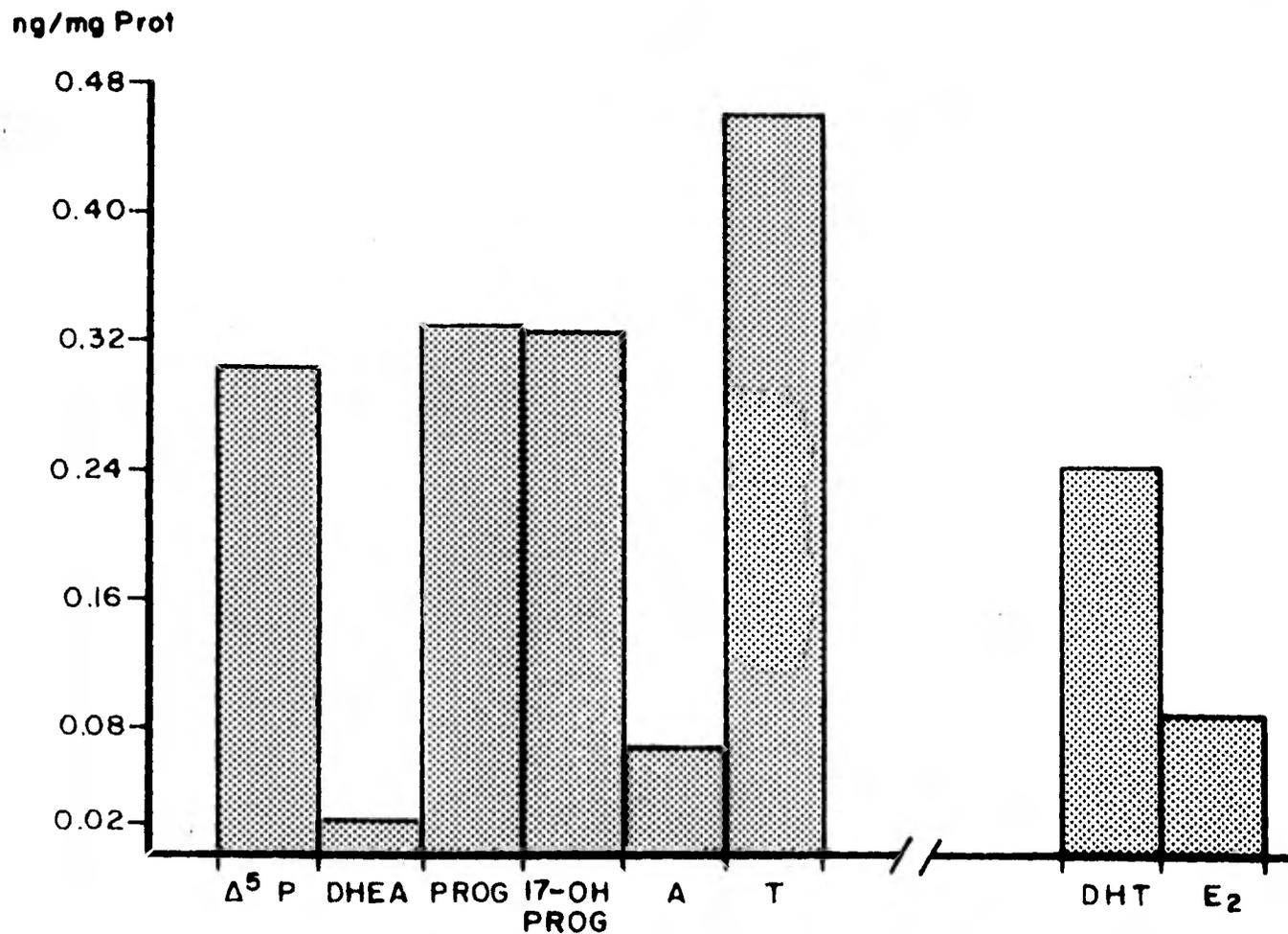
T A B L A II

ESTEROIDES EN EL TESTICULO HUMANO EXPRESADOS EN
ng/mg de protefna.

| Esteroides | \bar{X} | E.S. | Rango | n |
|------------------------|-----------|-------|-------------|----|
| Progesterona | 0.328 | 0.073 | 0.114-1.025 | 19 |
| 17 OH Progesterona | 0.326 | 0.047 | 0.135-0.795 | 19 |
| Androstendiona | 0.067 | 0.02 | 0.049-0.292 | 19 |
| Testosterona | 0.46 | 0.168 | 0.048-2.359 | 19 |
| Pregnenolona | 0.306 | 0.055 | 0.069-0.891 | 19 |
| Dehidroepiandrosterona | 0.022 | 0.005 | 0.009-0.066 | 19 |
| Dihidrotestosterona | 0.24 | 0.089 | 0.021-1.285 | 19 |
| Estrógenos | 0.085 | 0.016 | 0.017-0.275 | 19 |

POZAS METABOLICAS DE ESTEROIDES EN TESTICULO HUMANO.

FIGURA No. 2



D I S C U S I O N

Dado que las muestras fueron obtenidas de sujetos con diversas enfermedades, se consideró que éstas pudieran ser variables a las que se debería tomar en cuenta, por lo tanto, se analizaron las repercusiones que pudieran tener.

En relación a los estados patológicos, las muestras se separaron en tres grupos: Grupo A.- pacientes sin enfermedades aparentes "normales"; Grupo B.- pacientes con diabetes; Grupo C.- pacientes con cirrosis.

Según los resultados obtenidos los tres grupos presentan concentraciones de andrógenos y estrógenos similares. Ver Tabla III.

En el caso de la testosterona en pacientes con cirrosis, se observa una diferencia estadísticamente significativa, aparente con respecto a las cifras obtenidas para el grupo de los individuos normales, si se toma en cuenta el valor promedio y el error estándar de la media $P < 0.05$. Pero si se considera la desviación estándar, la significación estadística desaparece.

En el caso de las muestras de los pacientes con diabetes, se tiene que la DHT difiere con respecto a las muestras de los pacientes "normales". Pero en este caso también, al considerar la desviación estándar, coinciden dichos grupos.

De lo anterior se puede decir que, las muestras empleadas, fueron homogéneas, y para el análisis de pozas metabólicas

efectuado, se pueden considerar, en conjunto, como muestras de pacientes "normales", pues los estados patológicos considerados, no alteraron las concentraciones o el tamaño de las pozas metabólicas mencionadas.

Con respecto a la edad de los pacientes, fluctuó de 42 a 85 años. Se tomó el valor promedio y se separaron en dos grupos, las menores al valor promedio y las mayores al valor promedio (57 años). Si se considera solamente el error estándar, se encuentran diferencias entre las cifras correspondientes a Preg, Prog, 17 OH Prog, A, T y DHEA.

En el caso de la DHT y los estrógenos no hubo diferencia significativa entre ambos grupos. Ver Tabla III.

Sin embargo, al tomar en cuenta el valor promedio de las determinaciones y la desviación estándar para todos los esteroides analizados, estadísticamente son iguales.

El número de muestras empleado para el análisis es significativamente mayor a aquellos utilizados en otros trabajos (13).

Es muy importante hacer notar que las muestras se obtuvieron de autopsias efectuadas después de 8 horas de fallecido el individuo, y no de muestras obtenidas de individuos vivos, aunque el tejido analizado (testículo), no presentaba alteraciones anatómicas ni histológicas, en el momento de su obtención.

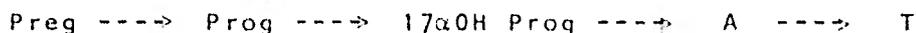
Con respecto a los resultados obtenidos, se observó

que la poza metabólica de mayor tamaño fue la de testosterona, considerada como el andrógeno que principalmente se secreta en el testículo.

Le siguen, en tamaño, las pozas de Pregnenolona, Progesterona y $17\alpha\text{OH}$ progesterona, resultando la más pequeña la de dehidroepiandrosterona.

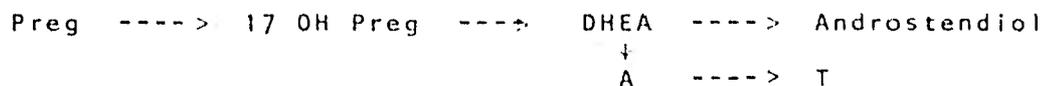
A través de estudios previos (34) se han logrado establecer en el testículo, las posibles vías metabólicas de biosíntesis de testosterona, a partir de pregnenolona. Se han sugerido dos vías principales, una que considera a los esteroides de la serie Δ_4 como los intermediarios más comunes, y otra en que se consideran a los Δ_5 esteroides como pasos intermediarios más importantes. Ver Figuras 3 y 4.

En estudios hechos con ratas se estableció que la vía preferente para la biosíntesis de testosterona es:



Estos estudios se apoyan en datos obtenidos para cada paso intermediario.

Sin embargo, se presentan otras vías con relativa frecuencia:



La actividad en estas vías es menor en comparación con la vía mencionada primeramente (34).

Se han hecho experimentos "in vivo" en testículos normales de humano (36) y parece ser que ocurren eventos similares a los mencionados.

En este tipo de estudios se han utilizado precursores de testosterona radiactivos, sin embargo, en los experimentos efectuados ya sea "in vivo" como "in vitro", se han presentado algunos problemas como son: los de permeabilidad a los precursores radiactivos, las diferencias inherentes en las preparaciones experimentales, y el, que no se midan o no se tomen en cuenta las p_ozas metabólicas de los precursores. Al no tomar en cuenta las p_ozas metabólicas, se pueden acumular, en exceso, ciertos esteroides, como en el caso de la Δ_5 Preg, 17 OH Preg y Prog, teniendo como consecuencia el que se bloqueen parcial o totalmente las transformaciones metabólicas posteriores.

Cuando un tejido testicular "in vivo" o "in vitro", es expuesto a un precursor radiactivo, se ha puesto mucho énfasis en registrar a los metabolitos formados. En la mayoría de estos experimentos, las interpretaciones hechas, toman en cuenta cual de los metabolitos se encuentra en mayor cantidad o concentración, considerándolo como el más importante en la formación de testosterona, sin tomar en cuenta las vías endógenas. Es muy importante tener en cuenta, que si un metabolito se encuentra en mayor concentración que otros puede significar: que, en efecto, sea más importante para la formación de testosterona; o que la razón por

la que se encuentra en mayor concentración es debido a que es metabolizado muy lentamente, y, por lo tanto, se está acumulando en mayor cantidad que otros.

Si se observa la Figura 5, con los resultados que obtuvimos para cada esteroide intermediario en la biosíntesis de testosterona, se tendrá que, la vía en la cual se han encontrado las pozas metabólicas de mayor tamaño es la correspondiente a los Δ_4 . En cambio, la vía de los Δ_5 tiene algunos esteroides que no fueron detectados, como en el caso de la $17\alpha\text{OH Preg}$, y otros como la DHEA fueron encontrados en cantidades muy pequeñas. Esto nos puede hacer pensar que la vía preferente para la biosíntesis es la de los Δ_4 . Sin embargo, hay que considerar a las enzimas involucradas en ambos caminos, pues es importante conocer la cantidad de éstas, así como la velocidad de transformación de un compuesto a otro.

También cabría la posibilidad que en la vía de los Δ_5 encontremos pozas de esteroides más pequeñas debido a la rápida transformación que sufre el esteroide a testosterona. Y en el caso de los Δ_4 esteroides se podría acumular el esteroide en las pozas metabólicas por falta de enzima que lo transformara (por saturación), o por que fuese más lenta la transformación a testosterona.

Apoyando los puntos tratados con anterioridad, se sabe que la enzima que se encuentra en mayor cantidad en el testículo

es la $3\beta\text{OH}$ esteroide dehidrogenasa e isomerasa, involucradas en la vía de los Δ_4 esteroides. Se ha visto que es más lenta que las otras enzimas, pero se encuentra en una mayor proporción, de tal manera, que no se satura, por lo que resultaría muy difícil la alternativa de que se acumulara esteroide por estas vías.

Con esto podemos apoyar a la vía de los Δ_4 esteroides como la preferente para la síntesis de testosterona en el testículo.

T A B L A III

CONCENTRACIONES DE ESTEROIDES EN LOS DIFERENTES
GRUPOS DE MUESTRAS DE TESTICULO HUMANO.

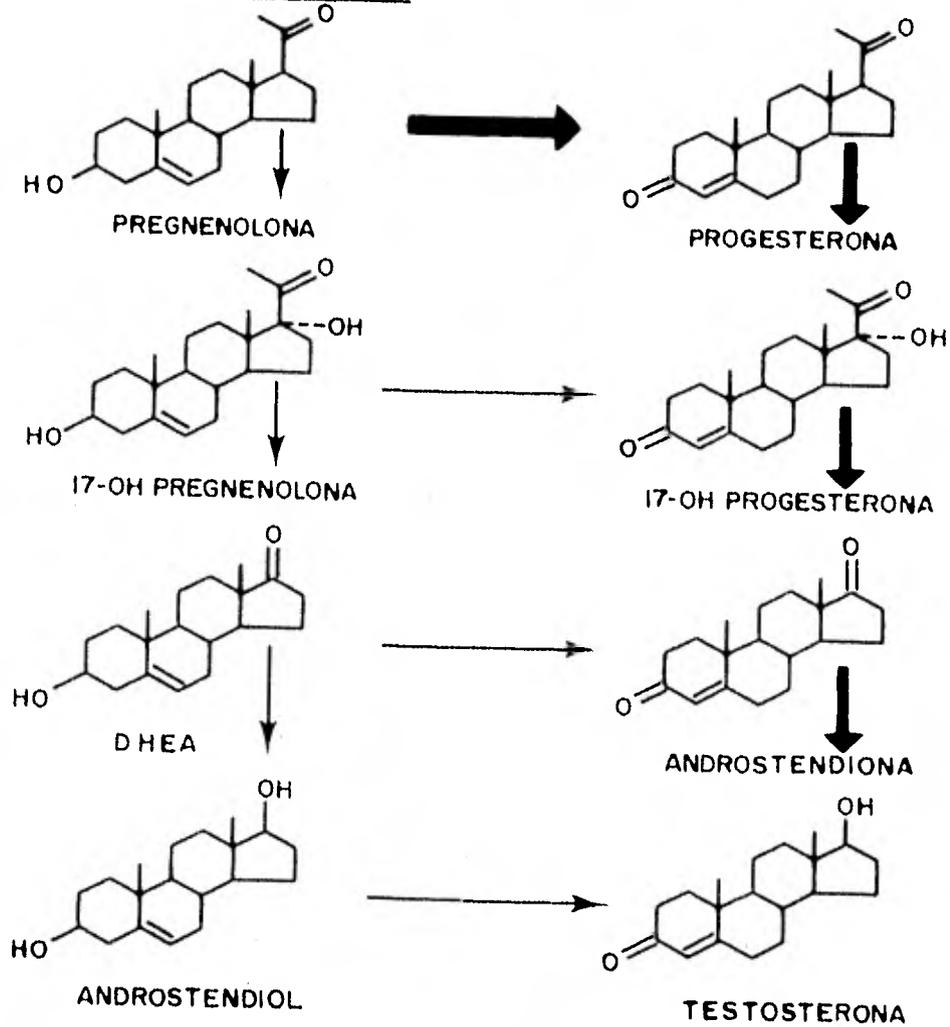
| Grupos de muestras | Concentraciones de esteroide expresadas en ng/mg de proteína. | | | | | | | |
|--------------------|---|-------|------|-------|--------|-------|-------|-------|
| | 5 ^P | P | 17 P | A | T | DHEA | DHT | E |
| "Normales " | 0.32 | 0.40 | 0.42 | 0.072 | 0.64 | 0.02 | 0.328 | 0.093 |
| Diabetes | 0.31 | 0.32 | 0.31 | 0.045 | 0.51 | 0.02 | 0.13 | 0.07 |
| Cirrosis | 0.265 | 0.275 | 0.19 | 0.072 | 0.078* | 0.065 | 0.30 | 0.08 |
| <hr/> | | | | | | | | |
| Mayores de 57 años | 0.37 | 0.64 | 0.56 | 0.10 | 0.98 | 0.02 | 0.35 | 0.04 |
| Menores de 57 años | 0.33 | 0.20 | 0.27 | 0.05 | 0.15 | 0.018 | 0.18 | 0.07 |

* No significativo estadísticamente.

BIOSINTESIS DE ANDROGENOS

VIA Δ^4

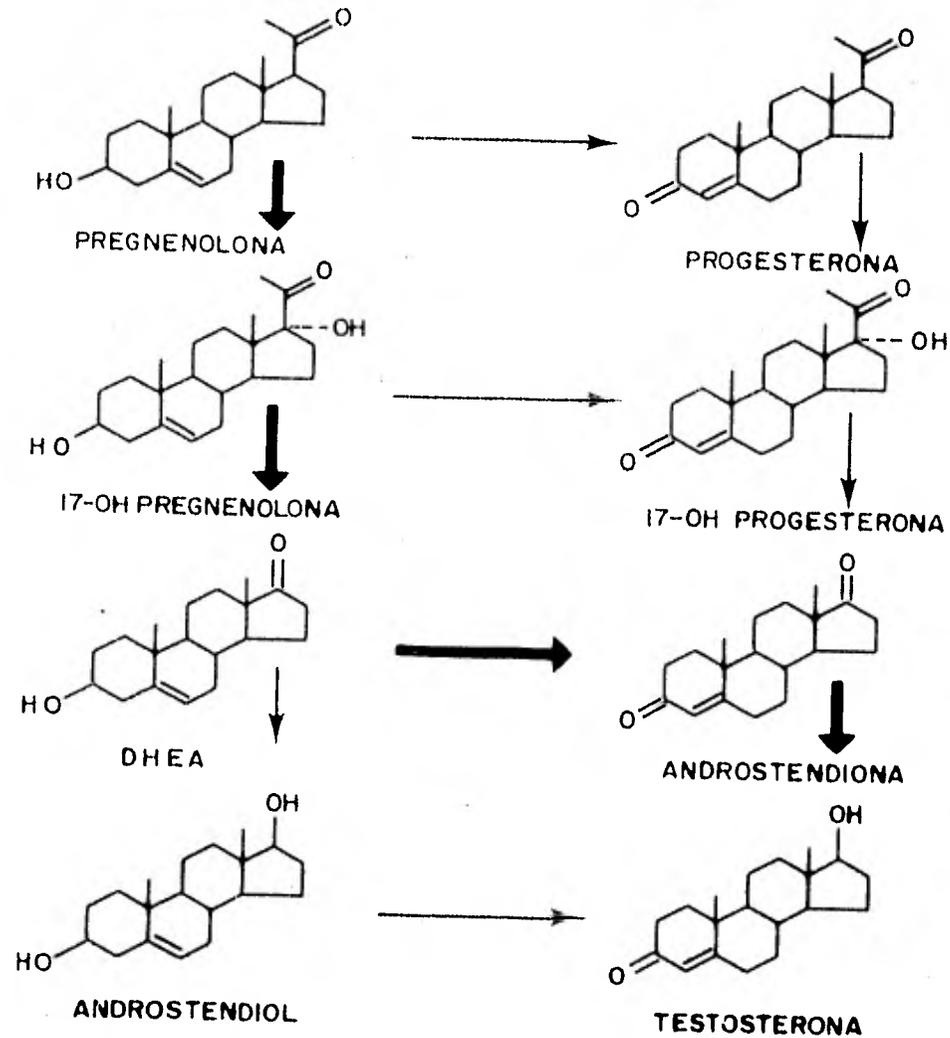
FIGURA No. 3

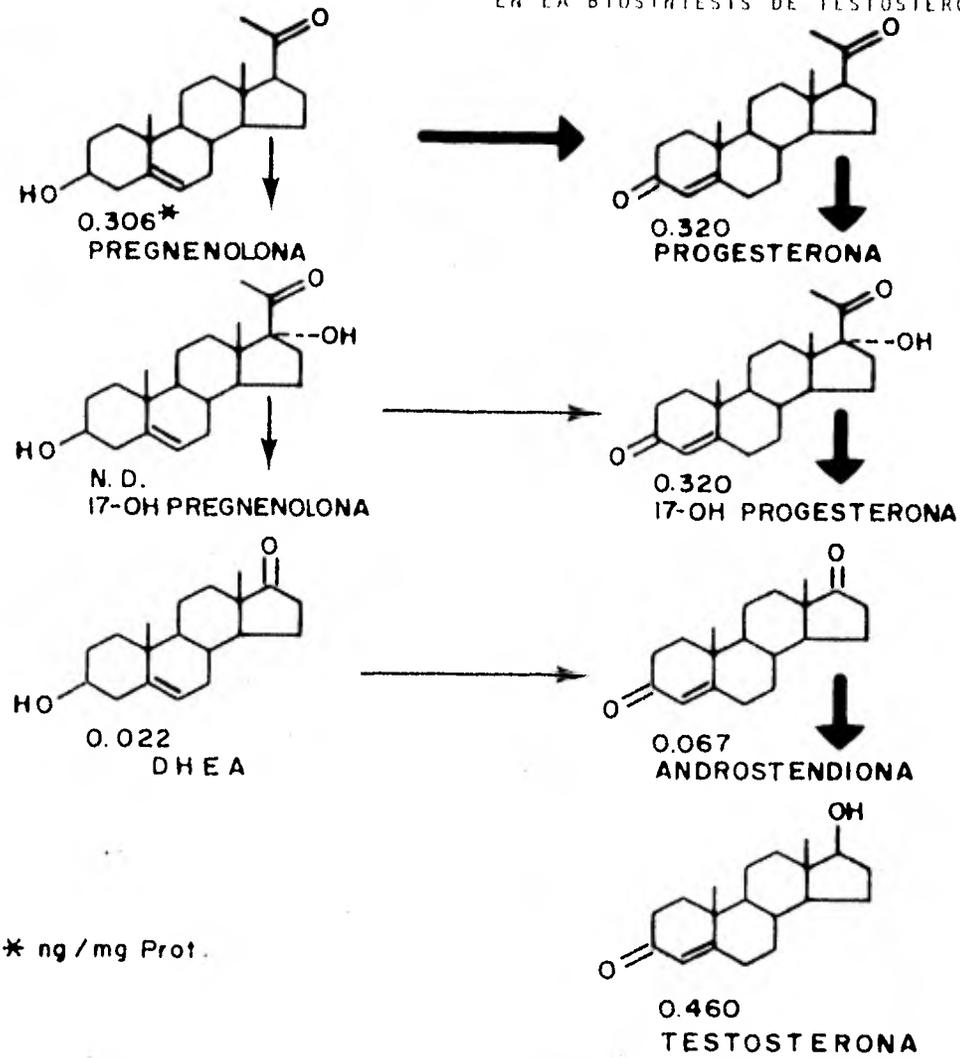


BIOSINTESIS DE ANDROGENOS

VIA Δ^5

FIGURA No. 4





* ng / mg Prot .

5.0.- C O N C L U S I O N E S

Después de haber analizado algunos resultados en este trabajo, es importante hacer notar algunos puntos.

La poza metabólica de mayor tamaño en el testículo humano fue la de testosterona, considerada como el andrógeno principal de secreción o producción fisiológica de la porción endócrina del testículo.

De los esteroides intermediarios en la biosíntesis de la testosterona, los que presentaron pozas metabólicas de mayor tamaño fueron: la pregnenolona, la progesterona y la $17\alpha\text{OH}$ progesterona, esteroides pertenecientes a la vía metabólica de los Δ_4 esteroides.

Los esteroides involucrados en la vía de los Δ_5 esteroides se encontraron en muy pequeñas cantidades, algunos no fueron detectables.

Según los resultados obtenidos, la vía preferente para la biosíntesis de testosterona es la vía de los Δ_4 esteroides.

Sería aconsejable probar las vías referidas con estudios en los que se involucraran pruebas dinámicas, como estimulaciones o inhibiciones para corroborar o corregir los datos obtenidos por nosotros.

Resultaría también interesante efectuar este tipo de trabajo en biopsias de personas normales, con el fin de esta-

blecer ciertas comparaciones en cuanto a la fisiología del testículo. Teniendo cuidado de agrupar las muestras dependiendo de la edad de los pacientes.

6.0.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- Abdel-Raouf, M. The postnatal development of the reproductive organs in bulls, with special reference to puberty (including growth of the hypophysis and the adrenals). 1960. Acta. Endocrinology Suppl. 49: 1-10.
- 2.- Acevedo, H. F. and col. 1963. Studies in fetal metabolism of progesterone-4-C¹⁴ and pregnenolone-7-H³ in human fetal testes. J. Clin. Endocrinol. Metab. 23: 885-890.
- 3.- Allanson, M. 1934. The reproductive processes of certain mammals. VII. Seasonal variation in the reproductive organs of the male hegehog. Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B 223: 277-303.
- 4.- Aoki, A. 1970. Hormonal control of Leydig cell differentiation. Protoplasma 71: 209-225.
- 5.- Applegreen, L. E. 1977. Sites of steroid hormone formation. Autoradiographic studies using labelled precursors. Acta Physiol. Scand. 71: Suppl. 301: 1-108.
- 6.- Baillie, A. H. and col. 1969. Developments in Steroid Histochemistry. New York: Academic Press.
- 7.- Benítez Lee D. y col. 1974. Concentración plasmática de Andrógenos durante el ciclo menstrual ovulatorio. Archivos de Investigación Médica IMSS. 5, 3, 1974.
- 8.- Bloch, E. 1964. Metabolism of 4-¹⁴C-progesterone by human fetal testes in vitro. Endocrinology 74: 883-885.
- 9.- Bloch, E. 1967. The conversion of 7-³H-pregnenolone and 4-¹⁴C-progesterone, testosterone and androstendione by mammalian fetal testis in vitro. Steroids 9: 415-430.
- 10.- Bouin, P. and P. Ancel. 1903. Recherches sur les cellules intersttielles du testicule des mammiferes. Arch. Zool. Exptl. Gen 1: 437-523.
- 11.- Burstein, S. and M. Gut. 1971. Biosynthesis of pregnenolone. Recent Progr. Hormone Res. 27: 303-345.
- 12.- Burstein, S. and R. I. Dorfman. 1971. Biosynthesis of C₁₉

- steroids from 4-¹⁴C-cholesterol and 7-³H-pregnenolone in vivo: considerations of new pathways. *Acta Endocrinol.* 40: 188-202.
- 13.- Christensen K. A. 1975. Leydig Cells. In *Handbook of Physiology, Male Reproductive Tract*. Sec 7. Vol 7. Cap 3. American Physiological Society, Washington, D. C. pps 57-85.
- 14.- Christensen, A. K. and N. R. Mason. 1965. Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial cells of rat testes for synthesize androgens from progesterone-4¹⁴C in vitro. *Endocrinology* 76: 646-656.
- 15.- David, K. and col. Ueber krystallinisches männliches Hormon aus Hoden (Testosterone), wirk samer als a us Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. *Z. Physiol. Chem.* 84: 495-500. 1959.
- 16.- Dorfman R. and Ungar F. 1965. *Metabolism of steroid hormones*. Academic Press. New York.
- 17.- Dorfman, R. I. and R. A. Shipley. Relative activities of androgens. In: *Androgens*. New York. 1965. pps 116-119.
- 18.- Dufau, M. L. and col. Steroid metabolism by adult rat testicular tubular explants in tissue culture. *Endocrine Soc. Meeting*, 52nd, Abstr., St. Louis, Mo., June, 1970. p 89.
- 19.- Gallagher, T. F. and F. C. Koch. 1929. The testicular hormones. *J. Biol. Chem.* 84: 495-500.
- 20.- Goldberg, B. and col. 1964. A histochemical study of substrate specificity for the steroid 3 α -ol-dehydrogenase and isomerase system in human ovaries and testis. *J. Histochem. Cytochem.* 12: 880-889.
- 21.- Greep, R. O. and col. 1956. Effect of two hypophyseal gonadotropic hormones on the reproductive system of the male rat. *Anat. Record.* 65: 261-271.
- 22.- Groves W. E. and col. Spectrophotometric determination of micrograms quantities of protein without nucleic interference. *Anal. Biochem.* 22: 195-210, 1968.

- 23.- Guyton A. C. 1971. Fisiología Médica. Ed. Interamericana. México. pps: 997-1006.
- 24.- Hall, P. F. 1970. Endocrinology of the testis. In: The Testis, edited by Johnson A. D., Acad. Press, vol 2. pps 1-71.
- 25.- Hall, P. F. and D.C. Irby. 1969. Conversion of cholesterol to androgens by rat testis: comparison of interstitial cells and seminiferous tubules. *Endocrinology* 84: 488-496.
- 26.- Ham, W. A. 1970. Tratado de Histología. Ed. Interamericana. México. pps: 927-931.
- 27.- Herrera, M. J. 1973. Medición de las pozas metabólicas de esteroides en la corteza suprarrenal de la rata. Efecto de la hormona adrenocorticotrófica. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 28.- Herrera J. y col. Radioinmunoanálisis de pregnenolona, 17 hidroxipregnenolona, dehidroepiandrosterona y sus formas sulfoconjugadas. *Archivos de Investigación Médica IMSS*. 5, 3, 1974.
- 29.- Ikonen, M. and M. Niemi. 1966. Metabolism of progesterone and 17 hydroxypregnenolone by the fetal human testes in vitro *Nature* 212: 716-717.
- 30.- Inano, H. and col. 1970. Studies on enzyme reactions related to steroid biosynthesis. II. Submicrosomal distribution of the enzymes related to androgen production from pregnenolone and of the cytochrome P-450 in testicular gland of rat. *J. Steroid Biochem.* 1:83-91.
- 31.- Inano, H. and col. 1967. The influence of various factors upon testicular enzymes related to steroidogenesis. *Biochem. Biophys. Acta* 137: 540-548.
- 32.- Jungman, R. A. 1968. Androgen biosynthesis. I. Enzymatic cleavage of the cholesterol side-chain to dehydroepiandrosterone and 2-methylheptane-6-one. *Biochem. Biophys. Acta* 164: 106-123.
- 33.- Koritz, S. B. and P. Hall. 1964. End-product inhibition of the conversion of cholesterol to pregnenolone in an adrenal extract. *Biochemistry* 3: 1298-1304.

- 34.- Kristen B. E. 1975. Biosynthesis and secretion of testicular steroids. In Handbook of Physiology. Male Reproductive tract. Sec. 7. Vol 7. Cap 4. American Physiological Society. Washington, D. C. pps 95-109.
- 35.- Laavikainen, T. E. and col. Secretion of neutral steroid sulfates by the human testis. J. Clin. Endocrinol. Metab. 29: 219-224. 1969.
- 36.- Laavikainen. T. and col. Secretion of free and sulfate-conjugated neutral steroids by the human testis. Effect of administration of human chorionic gonadotrophin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 32: 59-64, 1971.
- 37.- Lebeau, M. C. and E. Bulieu. 1966. Contribution du cholestérol et du sulfate de cholestérol circulants a la biosynthese des hormones testiculaires et corticosurrénales. Compt. Rend. 263: 158-161.
- 38.- Lee B. D. y col. Método rápido para medir estrógenos por radioinmunoanálisis. Archivos de Investigación Médica IMSS. 6, 1, 1975.
- 39.- León C. y col. 1974. Medición en plasma de androstendiona por radioinmunoanálisis utilizando anticuerpos obtenidos con un hapteno conjugado en el carbono 19. Archivos de Investigación Médica IMSS. 5, 2, .
- 40.- Levy, H. H.W. Deane and B. L. Rubin. 1959. Visualization of steroid - 3β -ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. Endocrinology 65: 932-943.
- 41.- Leydig, F. 1850. Zur Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane und Anldrüsen der Säugethiere. Z. Wiss. Zool 2: 1.
- 42.- Lynn, W. S. and R. H. Brown. The conversion of progesterone to androgens by testis. J. Biol. Chem. 232: 1015-1031. 1958.
- 43.- Maeir, D. M. 1965. Species variation in testicular Δ_5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity: absence of activity in primate Leydig cells. Endocrinology 76: 463-469.

- 44.- Morris, M. D. and I. L. Chaikoff. The origin of cholesterol in liver small intestines, adrenal gland and testis of the rat: dietary versus endogenous contributions. *J. Biol. Chem.* 234: 1095-1097. 1959.
- 45.- Parvinem, M. and col. 1970. Penetration of exogenous testosterone, pregnenolone, progesterone and cholesterol into the seminiferous tubules of the rat. *Endocrinology* 87: 1082- 1084.
- 46.- Payne, A. H. and M. Mason. 1965. Conversion of dehydroepiandrosterone sulfate to androst-5-enediol-3-sulfate by soluble extracts of rat testis. *Steroids* 6: 323-337.
- 47.- Samuels, L. T. and col 1951. An enzyme in endocrine tissue which oxidizes Δ_5 -3 hydroxysteroids to unsaturated ketones. *Science* 113: 490-491.
- 48.- Schinz, H. R. and B. Slotopolsky. 1972. Methodik experimenteller und histologischer Untersuchungen am Hoden. In: *Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden*. Berlin and Vienna Urban and Schwarzenberg, vol. 5, sec. 3B, part 4 install-238.
- 49.- Shimizu, K. and col. 1961. The transformation of 20α -hydroxy-cholesterol to pregnenolone to isocaproic acid and C_{21} steroids. *J. Biol. Chem.* 236: 695-699.
- 50.- Siekevitz, P. 1963. Protoplasm: endoplasmic reticulum and microsomes and their properties. *Ann. Rev. Physiol.* 25: 15-40.
- 51.- Slaunwith, W. R. and L. T. Samuels. 1958. Progesterone as a precursor of testicular androgens. *J. Biol Chem.* 232: 1030-1015.
- 52.- Smith, P. P. 1930. Hypophysectomy and a replacement theory in the rat. *Am. J. Anat.* 45: 205-273.
- 53.- Steinberg, E. 1971. Hormonal control in mammals spermatogenesis. *Physiol. Rev.* 51: 1-22.
- 54.- Strott, C. A. and col. 1969. Plasma progesterone and 17-hydroxiprogesterone in normal men and children with congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Invest.* 48: 930-939.

- 55.- Talalay, P. and V. S. Wang Enzimic isomeration of Δ_5 -3-ke-
tosteroids. Biochem. Biophys. Acta 18: 300-301. 1955.
- 56.- Wattenberg, L. W. 1968. Microscopic histochemical demons-
tration of steroid -3 β -ol dehydrogenase in tissue sections.
J. Histochem. Cytochem. 6: 225-232.
- 57.- Werbin, H. and I. L. Chaikoff. 1961. Utilization of adrenal
gland cholesterol for synthesis of cortisol by the intact
normal and the ACTH treated guinea pig. Arch. Biochem.
Biophys. 93: 476-482.
- 58.- Yago, N. and col. 1970. Further studies on submitochondrial
localization of cholesterol side chain-cleavage enzyme in a-
drenal cortex by sonic treatment. J. Biochem, 68: 775-783.
- 59.- Yago, N. and S. Ichii. Submitochondrial distribution of
components of the steroid 11-hidroxilasa and cholesterol
side chain cleaving enzyme systems in adrenal cortex. J.
Biochem. 65: 775-783. 1970.
- 60.- Yanaihara, T. and P. Troen. 1972. Studies of the human tes-
tis. I. Biosynthetic pathways for androgen formation in
human testicular tissue in vitro. J. Clin. Endocrinol.
Metab. 34: 783-792.