



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
PLANTEL IZTACALA

“PRESENCIA Y VARIACIONES DEL RECEPTOR LIBRE
PARA ESTRADIOL DURANTE LA MADURACION Y LA
DISFUNCION TESTICULAR HUMANA”

T E . S I S

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

MEXICO 1985



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.

Dedicado para

Aurea Eunice

Con todo el Amor del SER

Con el más grande amor y cariño

A mi Padre

Filemón Lizarde

Fuente de fortaleza y entereza.

Por sus sabios consejos y ejemplo de

Honradez, Superación y Paciencia.

A mi Madre

Celia Sandoval

Máxima expresión de amor y comprensión,

por ser mi apoyo en los momentos en que

sentí flaquear.

A mis Hermanos

Rafael, Juan, Antonio, Remedios, Filemón,

Manuel, Fernando, Carmelo y Rocio.

Por esforzarse en comprender a un Biólogo

y su Biología.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de la manera más profunda al Dr. Agustín Sosa Romero por su desinteresada labor en mi formación personal y profesional.

A la Química Elba Loustaunau Vidrio por brindarme su - amistad, ayuda y colaboración en el desarrollo de mi - trabajo profesional.

Al Jurado Revisor por sus finas y amables atenciones.

Dr. Luis H. Perez Astudillo

M. en C. Gabriel Camarena Gutiérrez

Biol. José del Carmen Bêñitez

Dra. Elsa Calleja Quevedo

A mi hermano Filemón Lizarde por su valiosa colaboración en el diseño y realización de Figuras y Gráficas.

A todos mis Maestros, Condiscípulos y Amigos que intervinieron en mi formación personal y profesional.

GRACIAS.

Este trabajo fué realizado en la Sección de
Neuroquímica de la División de Bioquímica
del Centro Médico Nacional, IMSS.

INDICE

1.- INTRODUCCION

1.- Morfología Testicular -----	1
2.- Células de Sertoli -----	8
3.- Células Germinales -----	12
4.- Epitelio Seminífero -----	21
5.- Ciclo y Onda del Epitelio Seminífero -----	23
6.- Barrera Hematotesticular -----	29
7.- Tejido Intersticial o Intertubular -----	32
8.- Regulación Hormonal del Testículo -----	36
9.- Efecto del Estradiol en la Fisiología Testicular ---	43

II.- OBJETIVOS ----- 55

III.- MATERIAL Y METODOS

1.- Obtención de Muestras Biológicas -----	56
a) Muestras de Tejido Testicular de Hombres de Diferentes Edades.	
b) Biopsias Testiculares de Pacientes Infértiles.	
2.- Clasificación de las Muestras Biológicas -----	57
a) Durante el crecimiento.	
b) En pacientes infértiles.	

3.- Procesamiento de las Muestras Biológicas -----	59
a) Diagnóstico Histológico.	
b) Determinación de Receptores para Estradiol.	
4.- Determinación de Hormonas Esteroides en los Pacientes Infértiles -----	64

IV.- RESULTADOS

1.- Concentración del Receptor para Estradiol durante el Desarrollo Testicular -----	65
2.- Concentración del Receptor para Estradiol en el Testículo de Pacientes Infértiles -----	68
3.- Diagnóstico Histológico -----	71
4.- Concentración Sanguínea de Estradiol, Testosterona y Progesterona en los Pacientes Infértiles -----	77

V.- DISCUSION -----	83
---------------------	----

VI.- CONCLUSIONES -----	99
-------------------------	----

VII.- ANEXO

1.- Material -----	100
2.- Lavado y Preparación de la Hidroxilapatita -----	100

3.- Determinación de Proteínas por el Método de Lowry --	102
4.- Determinación de Estradiol -----	106
5.- Determinación de Testosterona -----	108
6.- Determinación de Progesterona -----	110
7.- Técnica Histológica -----	111
VIII.- BIBLIOGRAFIA -----	119

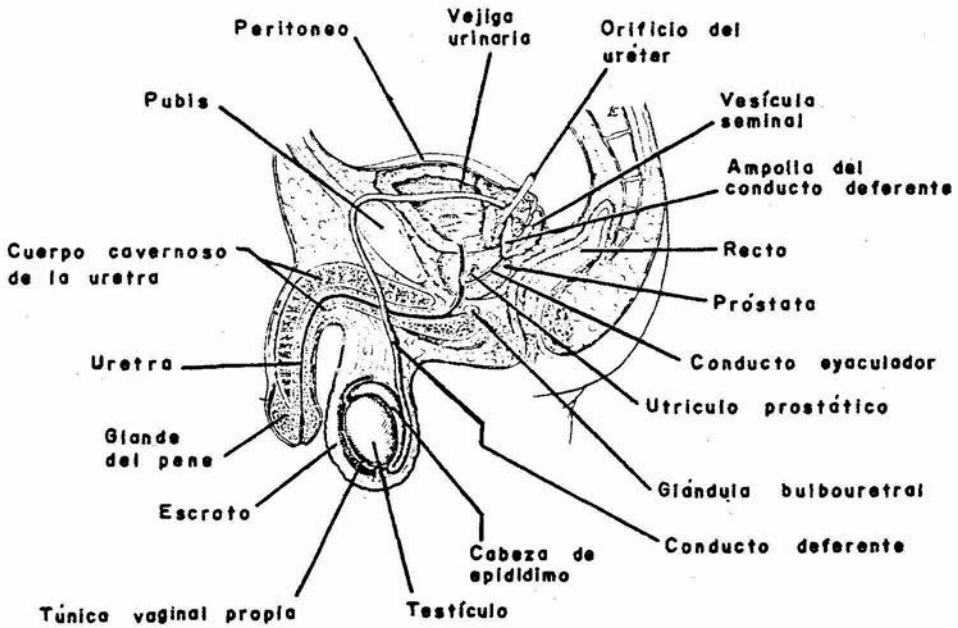
I.- INTRODUCCION

1.- Morfología Testicular.

El testículo, en el hombre y en la mayoría de los mamíferos, se encuentra suspendido fuera de la cavidad abdominal, dentro de una serie de capas faciales, musculares y de la piel (abdominal e inguinal), que en conjunto constituyen el escroto. (Figura 1). La posición externa del testículo tiene implicaciones fisiológicas importantes, ya que algunas de sus funciones requieren para su realización de temperaturas inferiores a las que se encuentran en la cavidad abdominal. El descenso del testículo al escroto se lleva a cabo al final de la gestación; posteriormente, el testículo permanece en este sitio durante toda la vida postnatal. Si se presenta cualquier falla en el descenso del testículo (Criptorquidia), ésta resulta invariablemente en infertilidad y frecuentemente, también trae como consecuencia un desajuste en la función endócrina, debido a la exposición del testículo a temperaturas más elevadas que la escrotal.

La piel flexible y corrugable del escroto carece de grasa subcutánea y contiene una gran cantidad de glándulas sudoríparas, que facilitan la pérdida de calor por evaporación y ayudan

FIGURA 1

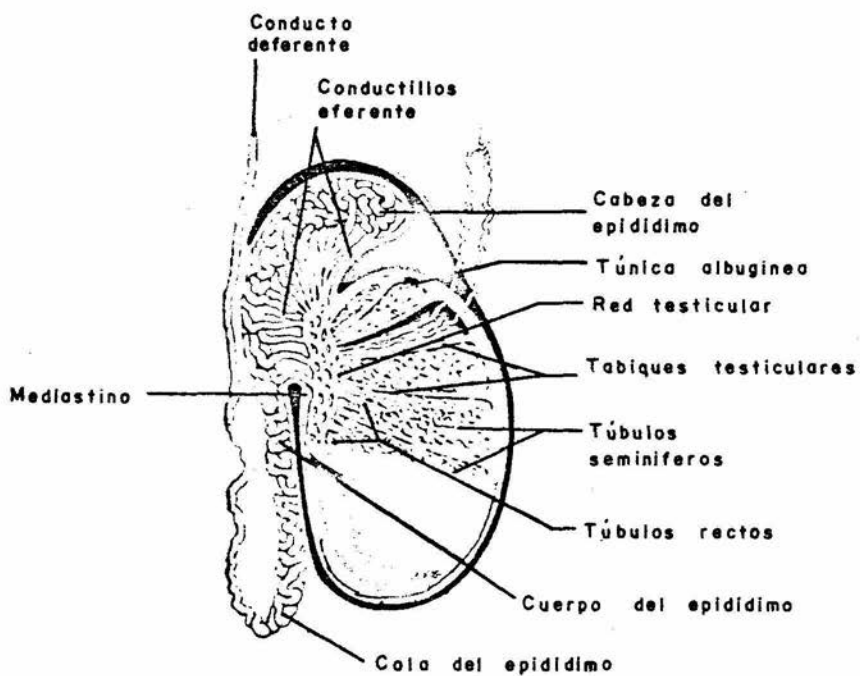


REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

a mantener la temperatura escrotal abajo de la temperatura abdominal. Existen también, adaptaciones vasculares específicas entre la arteria espermática que irriga el testículo y el plexo pampiniforme de venas que provienen del testículo y del epidídimo, que contribuyen a mantener la diferencia de temperaturas. La relación topográfica tan estrecha que se presenta entre la arteria espermática y el plexo de venas que la rodea, permite que exista una transferencia de calor de la sangre arterial aferente a la sangre más fría que regresa por las venas. De esta manera, la sangre arterial que llega al testículo, es previamente enfriada por un mecanismo de intercambio de calor por contracorriente. Aún cuando el gradiente de temperatura a lo largo de la arteria espermática sea solo de unos pocos grados ($2 - 3^{\circ}\text{C}$), no hay duda de que este gradiente contribuye sustancialmente a mantener una temperatura inferior a la corporal, tan importante para el óptimo desarrollo de la fisiología testicular.

El testículo se encuentra incluido en una cápsula gruesa, fibrosa, de color blanquecino, denominada túnica albugínea (Figura 2). La túnica albugínea está constituida, fundamentalmente de tejido conectivo denso y de colágeno, contiene además, fibras musculares lisas y fibroblastos. Se considera que las células musculares lisas son la base de las contracciones que experimenta el

FIGURA 2



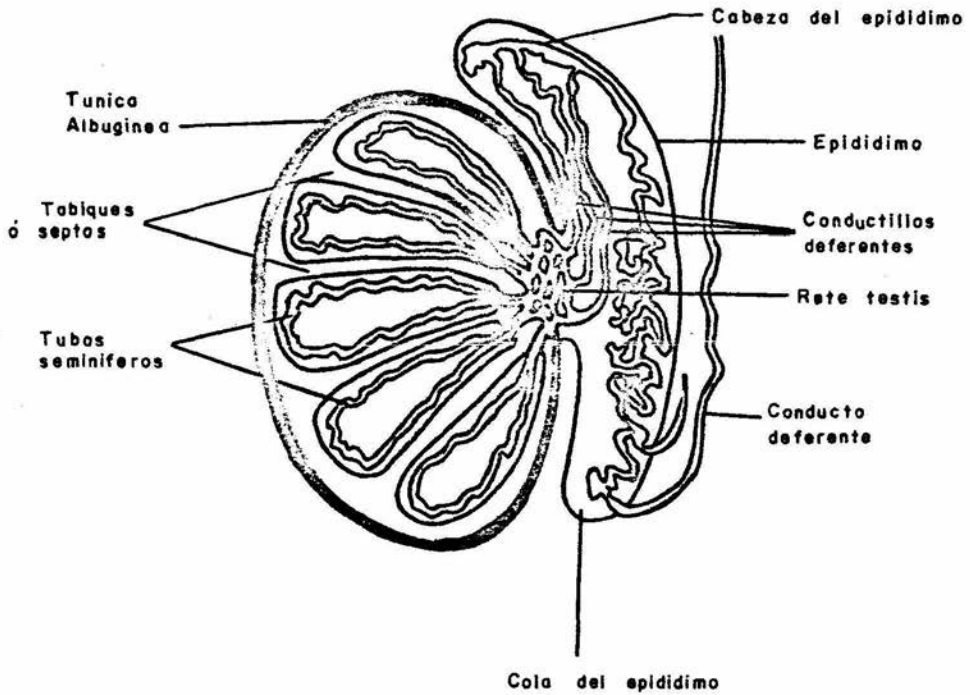
REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL TESTICULO Y SUS PARTES
CONSTITUYENTES

testículo. Sin embargo, no se conoce en que grado contribuyen éstas contracciones a la propagación del plasma testicular y/o al transporte de los espermatozoides del testículo a los conductos postesticulares.

A lo largo de la parte posterior del testículo se encuentra el mediastino testicular, un engrosamiento de la túnica albugínea que se proyecta hacia adentro y envuelve a los vasos sanguíneos que penetran al testículo y a los conductos que salen del mismo. Existen varias divisiones incompletas del tejido conectivo, denominadas septos o tabiques testiculares (Figura 2), que radian del mediastino a la túnica albugínea de la parte anterior y lateral del testículo, dividiendo el parénquima testicular en 200 o más lóbulos, cuyas bases se localizan en la superficie y sus ápices convergen al mediastino (Figura 3). Su parénquima se encuentra formado en su mayor parte por túbulos seminíferos muy sinuosos y por el tejido intersticial.

El testículo es una glándula de secreción interna y externa. Los túbulos seminíferos están involucrados fundamentalmente en la producción de espermatozoides o espermatogénesis, que es la función exócrina del testículo. La función endócrina testicular es efectuada por los grupos de células intersticiales o células

FIGURA 3



ESQUEMA DE LOS COMPONENTES DEL TESTICULO Y DEL EPIDIDIMO

de Leydig, que se localizan en el espacio intertubular, las cuales están principalmente encargadas de la producción de esteroides o esteroidogénesis.

Las células intersticiales o de Leydig, propician el medio ambiente hormonal local esencial, para que se efectúe la espermatogénesis, al sintetizar y secretar la testosterona a los túbulos seminíferos. La disfunción de esta hormona sexual masculina a los vasos sanguíneos y linfáticos, y su distribución a todo el organismo por la circulación general, contribuye a la preservación de la función de las glándulas sexuales secundarias y de otras manifestaciones características del sexo masculino.

Cada lóbulo del testículo contiene de 1 a 4 túbulos seminíferos de aproximadamente 50 cm de largo y de 200 u de diámetro. En el ápice del lóbulo la tortuosidad de los túbulos disminuye y experimentan una repentina transición a a túbulos rectos, que en el mediastino testicular se abren a una red de canales denominados rete testis o red testicular (Figura 3). La red se comunica con el conducto del epidídimo a través de una docena o más de conductos eferentes (Figura 2 y 3).

Los túbulos seminíferos están formados por la pared tubular o membrana basal, a la que también se le denomina membrana limi-

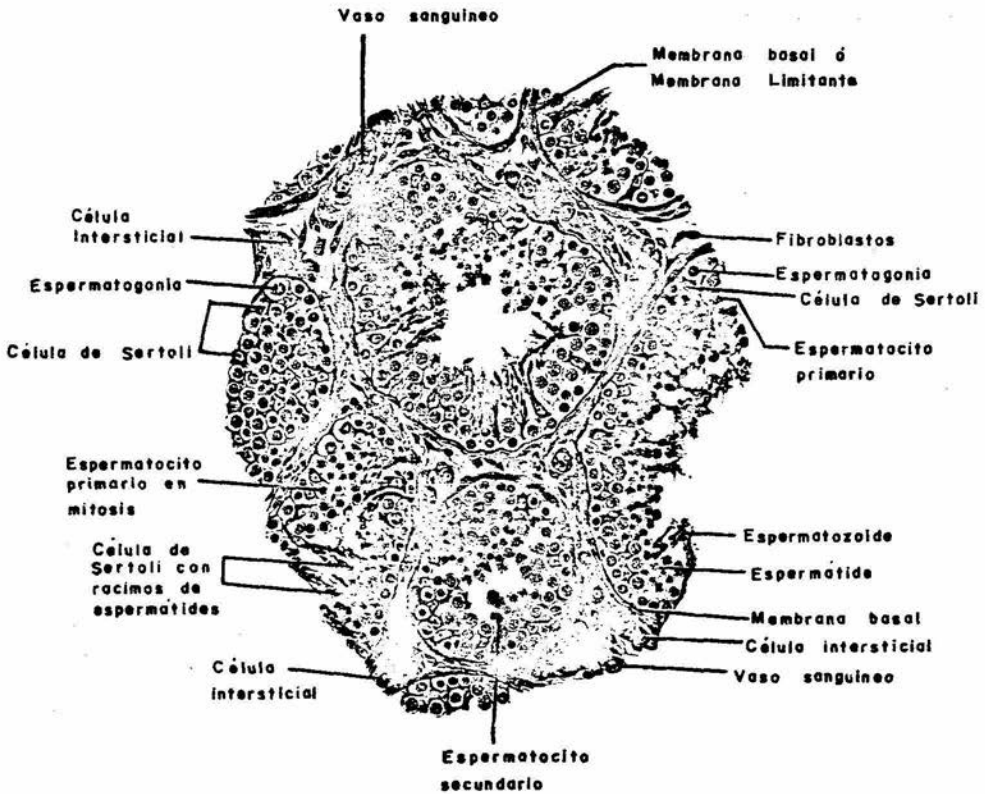
tante (Figura 4). El término de "membrana limitante" fue propuesto para designar a la estructura formada por la membrana o lámina basal y por una red compleja de células y de fibras de colágeno de reticulina y de glicoproteínas.

La composición y organización de la membrana limitante es específica de cada especie. En el hombre la membrana limitante está formada por dos capas. La capa interna llamada membrana basal y la capa externa denominada túnica propia. La membrana basal se encuentra constituida a su vez por dos subcapas, la más interna presenta una estructura lamelar o estratificada al ser observada al microscopio electrónico y la capa externa formada fundamentalmente por fibras de colágeno. La túnica propia está íntimamente relacionada e intermezclada con la capa externa de la membrana basal y contiene células parecidas a los fibroblastos, fibras de reticulina y una sustancia amorfa compuesta de mucopolisacáridos ácidos. Una de las características más sobresalientes de esta membrana limitante, es la presencia de pliegues e invaginaciones en las áreas sobre las que descansan las células de Sertoli (Figura 4) (Johnson-1977; Hafez-1980; Mann-1981).

2.- Células de Sertoli.

Las células de Sertoli, nodrizas o de soporte, no se dividen

FIGURA 4



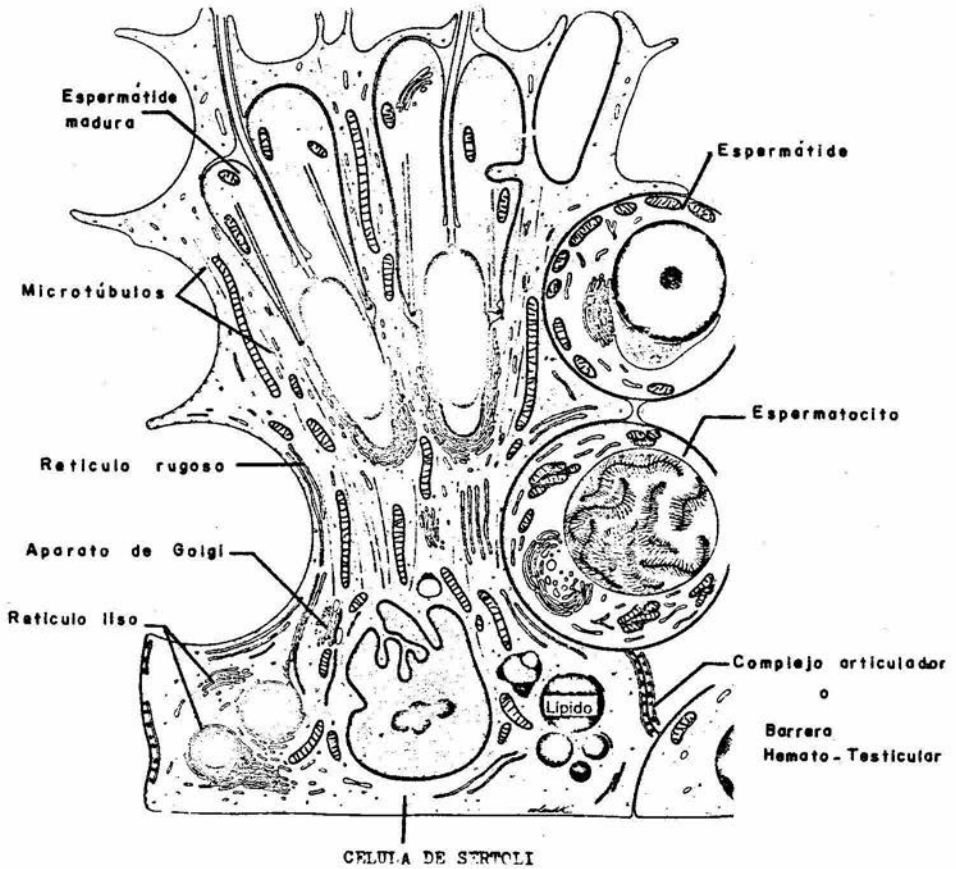
CORTE DE TESTICULO HUMANO

ni se regeneran después de la pubertad, por lo tanto, constituyen una población permanente y cuyas uniones de célula a célula, mantienen la continuidad e integridad estructural del epitelio seminífero. En condiciones patológicas, caracterizada por la ausencia de células germinales (Síndrome Células de Sertoli), las células de Sertoli forman un epitelio columnar simple. En presencia de las células germinales las células de Sertoli se distribuyen uniformemente en la lámina basal (Figura 4 y 9). Las espermátogonias más primitivas se presentan como células aisladas, mientras que las espermátogonias en proliferación y diferenciación están interconectadas y forman cadenas de células que se distribuyen en los interespacios basales que dejan las células de Sertoli (Figura 5 y 9).

La estructura básica de las células de Sertoli es generalmente de forma columnar, pero sus superficies son modificadas para acomodar en un laberinto complejo de espacios intercelulares y de huecos o nichos citoplásmicos a las células germinales más avanzadas conforme se desplazan hacia el lumen (Figura 5).

La morfología única de las células de Sertoli y sobretodo la presencia y naturaleza específica de sus uniones fuertes, permiten suponer, que las células de Sertoli son las directamente responsables del mantenimiento de la barrera hematotesticular y de

FIGURA 5



REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ULTRAESTRUCTURA DE LA CELULA DE SERTOLI Y SU RELACION CON LAS CELULAS GERMINALES

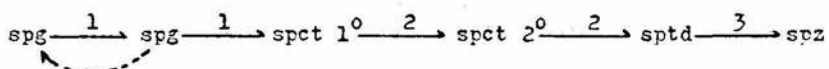
la división del epitelio seminífero, en dos compartimientos principales: uno "basal", ocupado por las espermatogonias y los espermatoцитos primarios preleptoténicos, y otro "adluminal" o "yuxtaluminal" conteniendo las formas celulares más avanzadas de la población móvil de las células germinales (Figura 5 y 11).

Las células de Sertoli también han sido implicadas en la producción del líquido adluminal del túbulo seminífero. La naturaleza química de este plasma parece ser crucial para el mantenimiento de un ambiente óptimo, en el compartimiento adluminal, esencial para el desarrollo y diferenciación de las células germinales. Por ésta razón, se ha postulado que algunas hormonas podrían influir en el desarrollo de las células del epitelio germinal, en virtud de su capacidad para modificar el funcionamiento de las células que controlan la barrera hematotesticular y la producción del líquido al espacio adluminal. (Johnson-1970; Johnson-1977).

3.- Células Germinales.

El término "célula germinal" es utilizado para designar inequívocamente a las células sexuales femeninas o a las masculinas, en cualquier etapa de la gametogénesis. En el macho, la gametogénesis recibe el nombre de espermatogénesis (Figura 8).

A simple vista la espermatogénesis parece un proceso simple y manifiesta muchas características comunes a diversas especies. En términos generales, la secuencia del proceso espermatogénico es la siguiente:

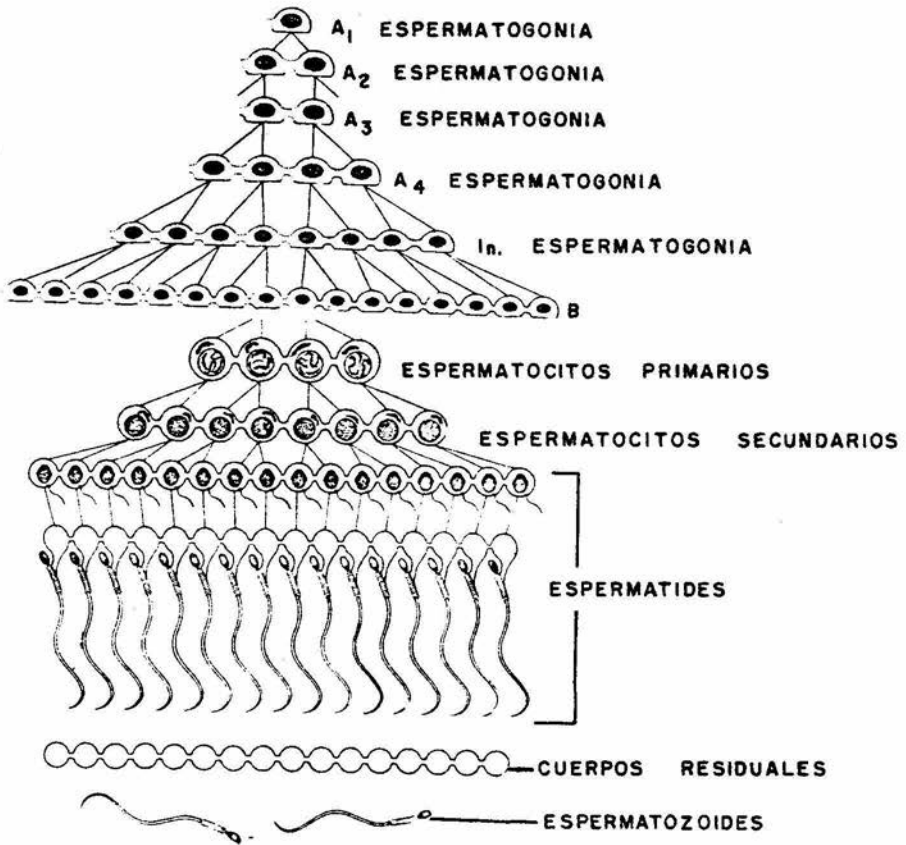


1) Por mitosis, las espermatogonias (spg) generan células hijas; algunas de ellas son retenidas como células progenitoras, preservando la estirpe espermatogonial, y otras evolucionan a espermátocitos primarios (spct 1^o).

2) Por meiosis, los espermátocitos primarios dan origen inicialmente, a los espermátocitos secundarios (spct 2^o) y posteriormente a las espermátides (sptd).

3) Finalmente, por diferenciación celular (espermiogénesis), las espermátides se transforman en espermatozoides (spz) (Figura 6).

FIGURA 6



REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL PROCESO DE ESPERMATOGENESIS

Un análisis más profundo de este proceso, revela que las distintas fases en que se divide, mitosis, meiosis y espermiogénesis, no son tan simples como se había supuesto, sino que son más complejas. Por ésta razón se describe a continuación y en forma breve los hallazgos más sobresalientes de éstas distintas fases.

1.- MITOSIS. Con el fin de que la espermatogénesis continúe indefinidamente, sin agotar las reservas de espermatogonias, uno o más tipos celulares deben actuar como células germinales basales (cgb) y generar nuevas espermatogonias en el epitelio seminífero. Una célula germinal basal puede ser definida, como una célula que retiene la capacidad de producir elementos celulares diferenciados y otras células germinales basales.

Hasta la fecha, las investigaciones acerca de la renovación de las cgb, en una gran variedad de especies de mamíferos, incluyendo al hombre (Clermont, 1972) no han permitido conocer la identidad de las cgb. Sin embargo, la utilización de técnicas autoradiográficas en cortes transversales y en montajes de túbulos seminíferos completos, han revelado la existencia de cuatro generaciones sucesivas de spg. En base a sus características nucleares, su proliferación y su topografía dentro del epitelio seminífero, ésta población de espermatogonias se ha subdividido en spg de tipo

A_1 , A_2 , A_3 y A_4 . En consecuencia, la proliferación mitótica de las spg es como sigue: las spg de tipo A_1 , se dividen sincrónicamente y dan lugar a las spg tipo A_2 ; grupos de spg de tipo A_2 - generan las tipo A_3 , que finalmente producen las de tipo A_4 . Las spg de tipo A_4 se dividen y dan origen a las spg intermedias - (spg I), las que a su vez producen las spg tipo B (spg B). Las spg B y las spg I son elementos diferenciados que ya se encuentran comprometidos en la producción de spct 1^o (Figura 6).

Además de las espermatogonias antes mencionadas, en el epitelio seminífero también se encuentran espermatogonias aisladas o apareadas, que rara vez se dividen o que tienen un ciclo de vida muy largo. Estas espermatogonias han sido referidas como de "reserva" (spg A_0) y se supone que permanecen inactivas durante la espermatogénesis.

2.- MEIOSIS. La meiosis implica dos divisiones mitóticas sucesivas con una sola duplicación de los cromosomas. Por este motivo al final de la meiosis, el número de cromosomas característico de las células somáticas diploides ($2n$), es reducido a la mitad, a un número haploide (n) (Figura 7).

Los espermatocitos primarios resultantes de la división mitótica de las espermatogonias tipo B, son semejantes a las células

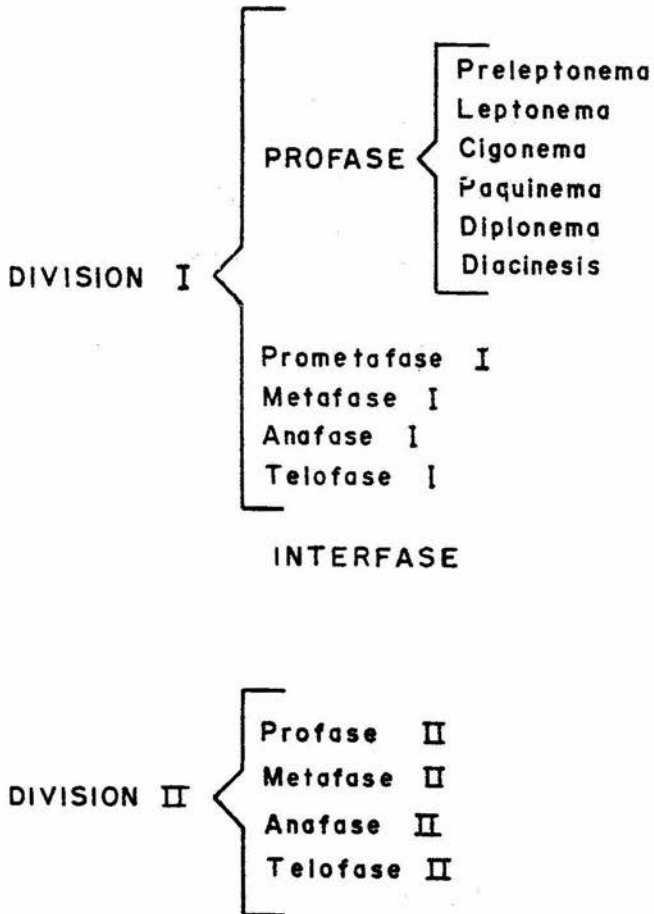
las progenitoras, excepto que su tamaño es un tercio menor que el de éstas. Su localización es basal y frecuentemente se encuentran en contacto con la membrana basal del epitelio seminífero (Figura 4 y 9). Inmediatamente después de su formación, duplican su DNA en preparación para su primera división mitótica de la meiosis.

La profase de esta división es larga (en el hombre es de aproximadamente 20 días), compleja e involucra una reorganización estructural profunda de la cromatina, conforme la célula pasa por las etapas o estadios de LEPTOTENO, ZIGOTENO, PAQUITENO y DIPLOTENO. Al final de la etapa de leptoteno o al inicio de la zigoteno, los espermatoцитos primarios atraviesan la barrera hematotesticular y penetran al espacio adluminal de las células de Sertoli. El estadio final de la profase de la primera división mitótica de la meiosis se conoce con el nombre de DIACINESIS. Después de la profase los cromosomas bivalentes se alinean en el plano ecuatorial en Metafase I. Durante la Anafase las cromátides hijas de los cromosomas homólogos se mueven a los polos unidos por su centrómero.

En contraste con la mitosis normal, los centrómeros de esta primera mitosis meiótica no se separan. La Anafase I y la Telofa se I transcurren rápidamente y dos nuevas células son generadas, los espermatoцитos secundarios. Estas células son más pequeñas y tienen una vida media más corta que los espermatoцитos primarios (aproximadamente 8 hrs).

FIGURA 7

MEIOSIS



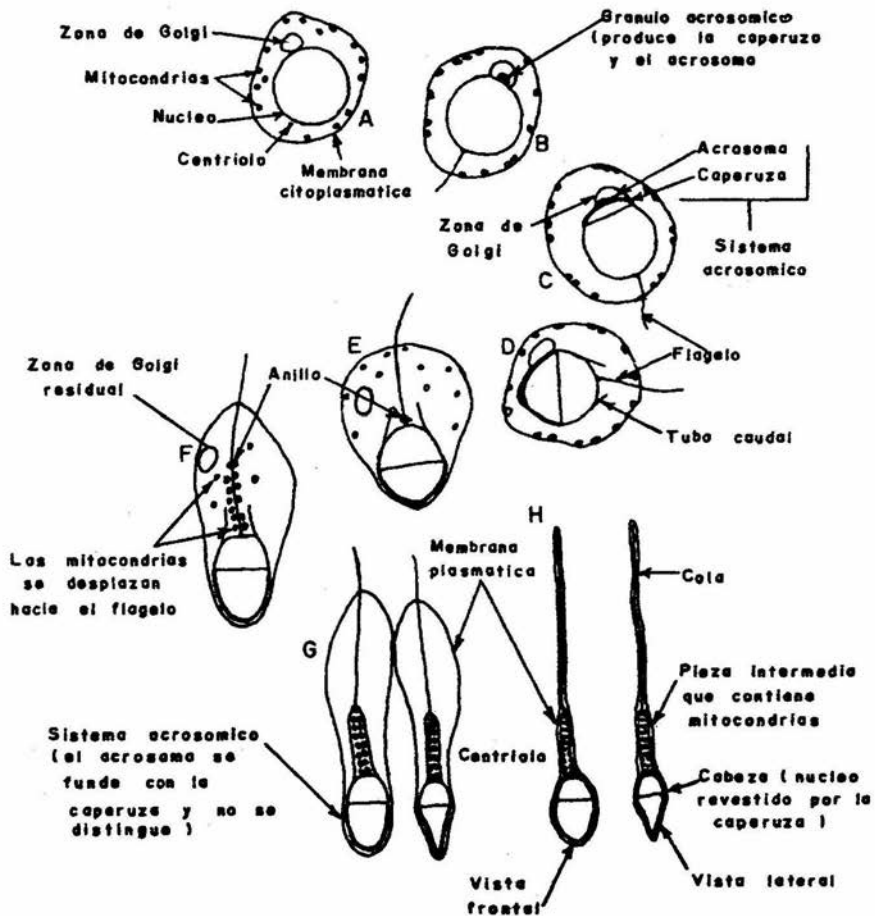
Sin duplicar su DNA, los espermátocitos secundarios inician rápidamente la Profase de la segunda división mitótica de la - meiosis (Profase II). Durante la Metafase II, los cromosomas se alinean ecuatorialmente y en la Anafase II, los centrómeros se dividen y cada cromátide se desplaza hacia polos opuestos. Al - final de la Telofase II, quedan formadas las espermátides cada una conteniendo un número haploide de cromosomas.

3.- ESPERMIOGENESIS. La espermiogénesis puede ser definida como la diferenciación de la espermátide recientemente generada, de una configuración celular convencional a una espermátide alargada, flagelar y dividida en dos piezas principales: la cabeza y la cauda o cola, justo antes de su liberación al lumen del túbulo. Después de su liberación, las espermátides son referidas como espermatozoides.

Los acontecimientos más sobresalientes de este proceso extraordinario y complejo son: 1) La elaboración del acrosoma a par - tir del Aparato de Golgi; 2) La condensación y alargamiento del núcleo; 3) La formación de un flagelo móvil; y 4) La eliminación de la mayor parte del citoplasma. Los factores responsables de estos cambios tan drásticos del citoplasma y del núcleo, aún no se conocen (Figura 8) (Johnson-1970).

- 20 -
FIGURA 8

ESPERMATOGENESIS EN EL HOMBRE



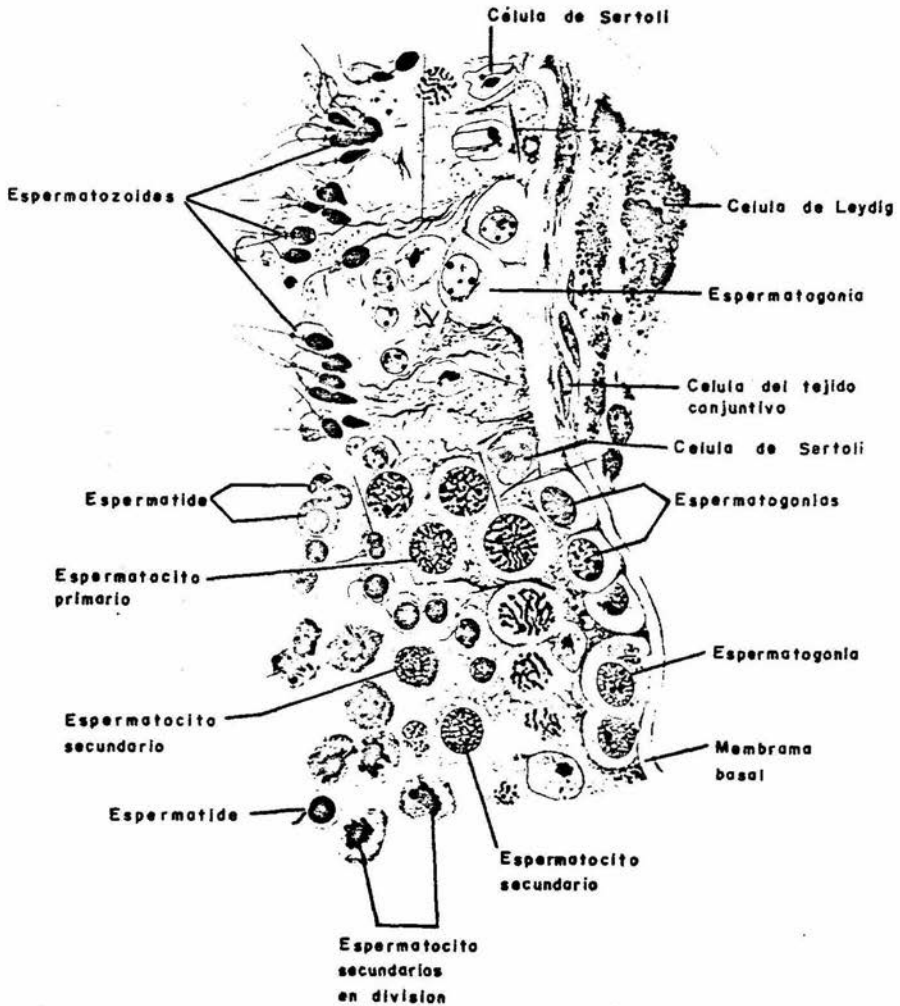
4.- Epitelio Seminifero.

La parte interna de los túbulos seminíferos está recubierta por un tipo único de epitelio híbrido, que es simple y estratificado, constituido por dos categorías de células: las de Sertoli y las germinales (Figura 9).

Las células de Sertoli, son una población de células que ocupan desde la membrana basal hasta el lumen del tubo seminífero y forman un epitelio columnar simple. Las células germinales son una población de células que proliferan cerca de la base del tubo y que al desplazarse hacia el lumen, durante su gradual diferenciación a espermatozoides forman distintos estratos morfológicos que constituyen un epitelio estratificado.

Existe una gran cantidad de diferencias entre el epitelio seminífero y otros epitelios del organismo. En un epitelio columnar, las células se encuentran firmemente unidas a lo largo de sus superficies laterales por desmosomas y por uniones intermitentes, denominadas también "gap junctions". Si las células deben movilizarse por reparación o morfogénesis del epitelio, entonces hileras o capas de células se mueven como un todo, individualmente las células tienen poco o ningún movimiento. En un epitelio estratificado que esté continuamente proliferando en su

FIGURA 9



ESQUEMA MOSTRANDO CORTE DE TUBULO SEMINIFERO Y EL EPITELIO SEMINIFERO

base y exfoliándose en su superficie, las células también están conectadas por uniones duraderas del tipo antes mencionado, que se establecen desde que las células son generadas en la base y se mantienen durante su desplazamiento hacia el lumen hasta que son exfoliadas.

En el epitelio seminífero, la movilidad de las células germinales en desarrollo, con respecto a la población estacionaria de las células de Sertoli, no permiten la formación de especializaciones membranales para la unión permanente de estas dos categorías de células. Por microscopía electrónica se han podido observar regiones limitadas de densidad subplasmalémica (Submembranal), sin embargo, no se han encontrado hasta ahora desmosomas verdaderos en la interfase entre las células de Sertoli y las germinales (Johnson-1970; Clermont-1963; Heller-1964).

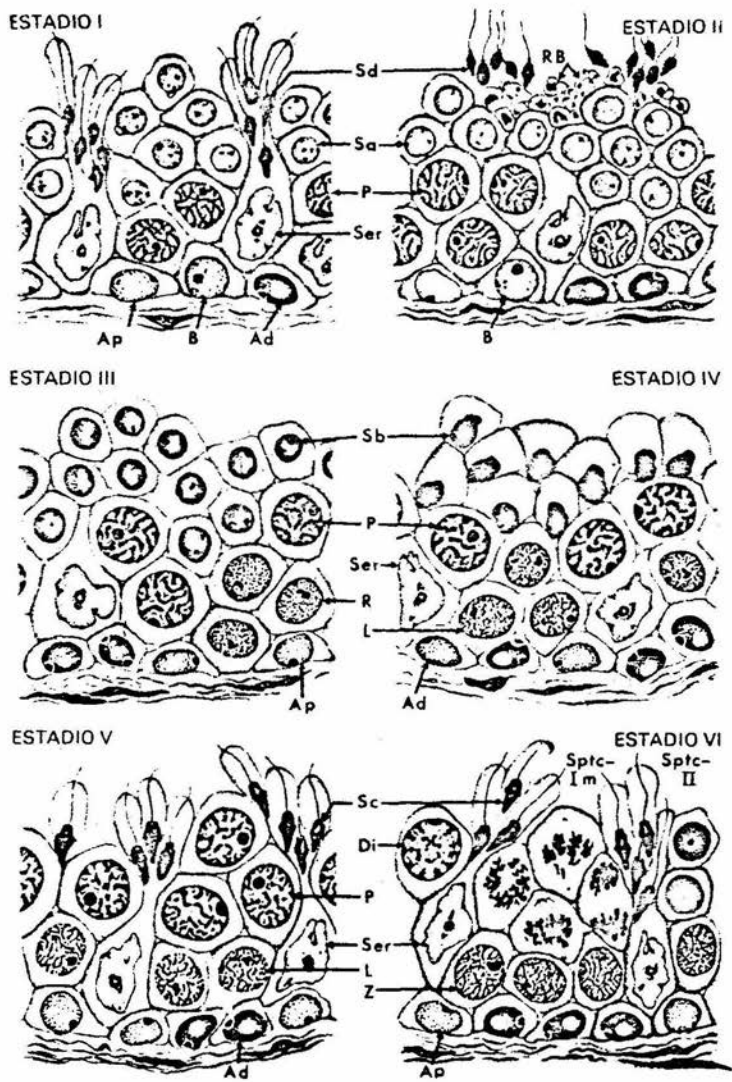
5.- Ciclo y Onda del Epitelio Seminífero.

En base a las características morfológicas que manifiesta el acrosoma, desde el inicio hasta la terminación de su formación, las espermátides se han clasificado en varias clases. Todas estas células junto con las demás de la estirpe germinal, no están distribuidas al azar en el epitelio seminífero, sino que se encuentran formando asociaciones celulares perfectamente bien de-

finidas. Una clase especial de espermátides, solo se puede asociar con otras espermátides, espermatoцитos y espermatoгонias - que se encuentran en una fase específica de su desarrollo.

Al evolucionar a la siguiente etapa de su desarrollo espermatogénico, los elementos de una asociación celular determinada genera una nueva agrupación celular. Así, en un segmento cualquiera del túbulo seminífero, la asociación celular existente producirá una secuencia de asociaciones celulares cíclicas. Las asociaciones o etapas que se presentan entre dos apariciones de una misma asociación celular, en una área determinada del túbulo, es conocida como "Ciclo del Epitelio Seminífero" o "Ciclo Espermatogénico". El número de cada ciclo es constante para cada especie; en la rata son 14; en el cuyo y el mono son 12 y en el hombre son 6. Las etapas son designadas con números romanos (Figura 10 y 10a).

En todos los mamíferos excepto en el hombre, una asociación celular determinada ocupa un segmento relativamente grande a lo largo del túbulo seminífero. Así cada segmento corresponde a una etapa del ciclo del epitelio seminífero y es numerado de acuerdo a ésta. Los segmentos están dispuestos a lo largo del túbulo seminífero, en orden consecutivo para formar lo que se conoce con el nombre de "Onda del Epitelio Seminífero" u "Onda Espermatogénica". Cada onda consta de una serie completa de segmentos repre



CICLO ESPERMATOGENICO HUMANO

FIGURA 10

Representación de las seis fases de la espermatogénesis en el hombre. Estas fases representan en conjunto un ciclo del epitelio germinal:

Ser - Célula de Sertoli

Ao y Ap - Espermatogonias tipo A oscura y pálidas

B- Espermatogonia tipo B

R - Espermatocitos en reposo o preleptotenos

L - Espermatocitos leptotenos

P - Espermatocitos paquitenos

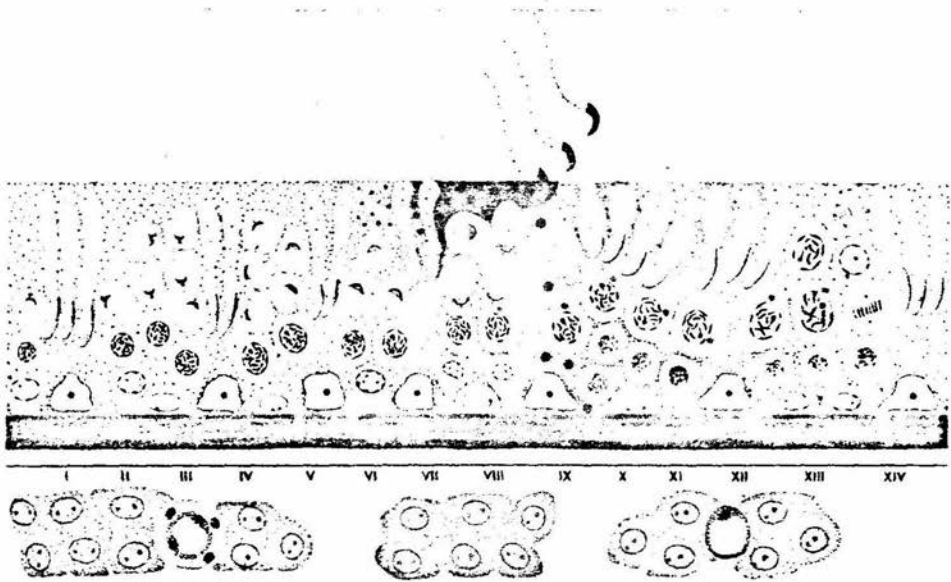
Im - Espermatocitos primarios en división

II - Espermatocitos secundarios

Sa, Sb, Sc, y Sd - Espermátides en diversas fases de la espermiogénesis

CR - Cuerpos Residuales

FIGURA 10a



CICLO REGENERATIVO EN LA RATÁ

sentando las etapas o asociaciones celulares del ciclo espermatogénico específicas de cada especie. Así el ciclo se refiere a los cambios que se llevan a cabo en un período de tiempo en una área determinada del túbulo seminífero, mientras que la onda se refiere simplemente a la distribución de las asociaciones celulares del ciclo espermatogénico a lo largo del túbulo. Es decir que la onda es en espacio, lo que el ciclo es en tiempo.

En primates y otras especies de mamíferos, una asociación celular ocupa una área extensa del túbulo seminífero (10 mm), por esta razón, cualquier sección transversal del túbulo contiene la misma asociación celular alrededor de su circunferencia.

Sin embargo, en los túbulos seminíferos humanos, cada asociación celular ocupa un espacio muy restringido. En realidad cada agrupación celular no se extiende a toda la circunferencia del túbulo, por lo tanto, las secciones transversales de los túbulos siempre revelan de dos a cuatro asociaciones celulares. Por consiguiente, en el hombre no se manifiesta la onda típica o característica del epitelio seminífero, pero el patrón fundamental - del ciclo del epitelio seminífero es tan constante y reproducible como en cualquier otra especie. (Hafez-1980).

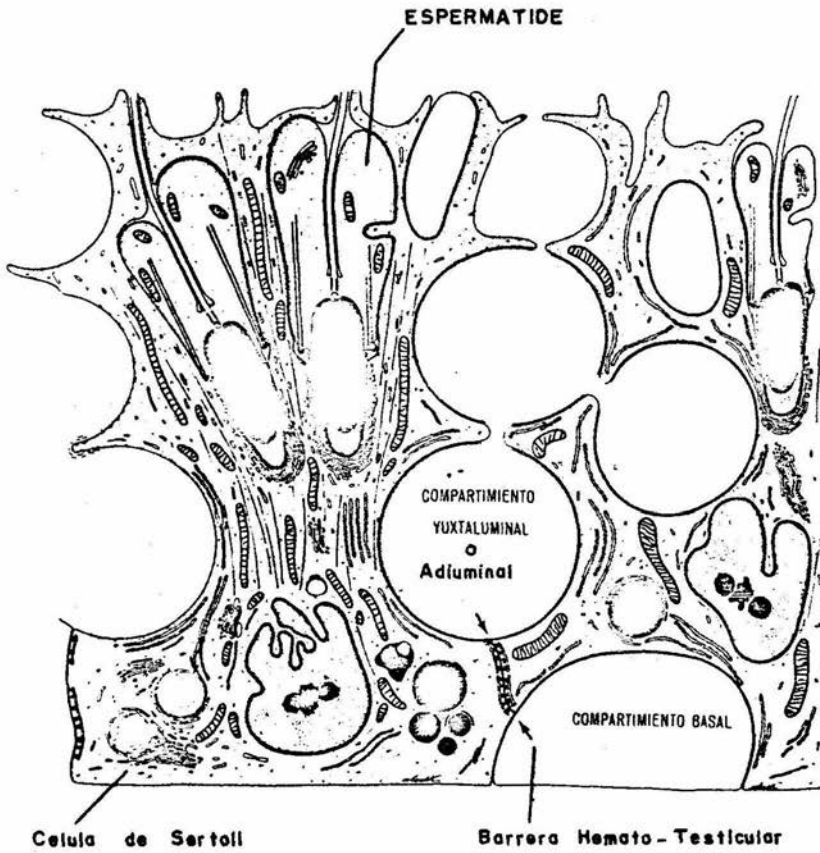
6.- Barrera Hematotesticular.

Las células de la mayor parte de los epitelios columnares poseen en sus membranas laterales además de los desmosomas y de las uniones intermitentes, "zonas ocluyentes circunferenciales" o "uniones fuertes" que "sellan" los espacios intercelulares e impiden la difusión extracelular de cualquier sustancia en todo el epitelio seminífero.

Esta barrera de permeabilidad establece una diferencia entre la composición química del líquido luminal y la del extracelular (Figura 11). En estos epitelios la obstrucción yuxtalúmina, también induce a las células a transportar iones a través de sus membranas laterales, con las que se forma un gradiente osmótico continuo en los espacios intercelulares abajo de la barrera hematotesticular. La presencia de este gradiente provoca la movilización de líquido y electrólitos a través del epitelio seminífero desde el lumen hasta los capilares subepiteliales.

En el epitelio seminífero las uniones fuertes o zonas ocluyentes entre las células de Sertoli no se encuentran situadas cerca del lumen, ya que impedirían el movimiento de la población móvil de las células germinales, sino que se encuentran situadas

FIGURA II



ESQUEMA QUE MUESTRA LAS UNIONES CELULARES ENTRE LAS CELULAS DE SERTOLI Y LOS COMPARTIMIENTOS BASAL Y YUXTALUMINAL

cerca de la base del epitelio seminífero, en las prolongaciones citoplásmicas de las células de Sertoli, que se localizan arriba de las espermatogonias.

La administración de diversas sustancias electrodenudas, ha permitido observar como se difunden estos trazadores, desde el intersticio hasta la base del epitelio seminífero, pero no penetran más allá de las zonas ocluyentes o uniones fuertes de las células de Sertoli. Por esta razón se considera que estas uniones son los substratos morfológicos de la "barrera hematotesticular" postulada por los primeros fisiólogos al observar que muchas de las sustancias que se administraban al torrente circulatorio aparecían rápidamente en el linfa testicular, pero no eran detectadas en el líquido recolectado del rete testis.

Así, las células de Sertoli, con sus uniones fuertes o zonas ocluyentes no solo son las encargadas de mantener la barrera hematotesticular, sino que también dividen al epitelio seminífero en dos compartimientos: Uno basal, ocupado por las espermatogonias y espermatocitos preleptoténicos y otro adluminal o yuxtaluminal, conteniendo las etapas más avanzadas de la población móvil de las células germinales (Figura 5 y 11). Evidencias

más recientes indican que las células de Sertoli también crean y mantienen un microambiente especial en el compartimiento adluminal que es esencial para el mantenimiento, desarrollo y diferenciación de las células germinales (Johnson-1977).

7.- Tejido Intersticial o Intertubular.

En el testículo, el espacio extratubular se encuentra ocupado por un tejido conectivo fibroso, que se distribuye en todos los espacios intersticiales angulares que forman los túbulos seminíferos y al que se le denomina "Tejido Intersticial" o "Tejido Intertubular" (Figura 4).

Este tejido corresponde al estroma de otras glándulas y cómo en otras glándulas constituye el esqueleto del órgano y el soporte sobre el cual descansa el parénquima, en este caso los túbulos seminíferos. Esta red de tejido fibroso laxo también recubre y sostiene a los vasos sanguíneos, a los vasos linfáticos y a los nervios del testículo. Las células libres que se localizan en el tejido intertubular son numerosos macrófagos, algunas células cebadas y ocasionalmente linfocitos.

Los principales componentes extracelulares de tejido intersticial son haces de fibras de colágeno y un líquido abundante -

con alto contenido de glicoproteínas. En el tejido intersticial también existen numerosas asociaciones celulares constituidas por elementos epiteloideas conocidos comúnmente como células de Leydig. En estos grupos o asociaciones las células de Leydig no están en contacto íntimo, sino que se encuentran separadas por espacios intercelulares de 50 a 200 nm y a los que emiten microvellosidades o prolongaciones citoplásmicas cortas. Así, las células de Leydig exponen al fluido extracelular, una mayor porción de su superficie que las células de la mayor parte de los epitelios compactos. Sin embargo, las células de Leydig sí se establecen pero en menor cantidad en uniones intercelulares o entre sus proyecciones citoplásmicas. Estas uniones se cree que facilitan la comunicación de célula a célula y la coordinación de sus actividades fisiológicas dentro de asociaciones celulares.

La localización testicular en donde se efectúa la producción de andrógenos, ha sido investigada exhaustivamente y se ha demostrado que el tejido intersticial es el sitio primario de la biosíntesis y secreción de andrógenos y que las células de Leydig son los componentes celulares endocrinos. La función que realizan los esteroides provenientes de los túbulos seminíferos en la fisiología testicular, permanece por ser dilucidada.

El conjunto de reacciones básicas características de las glándulas que sintetizan esteroides son: 1) La formación de colesterol a partir de acetato; 2) La escisión de la cadena lateral del colesterol para producir Δ^5 -pregnenolona; y 3) la formación de varios esteroides a partir de la Δ^5 -pregnenolona (Figura 12).

Existen dos vías metabólicas para la síntesis de testosterona (T). La primera es la vía Δ^4 en donde la progesterona (P_4) es el principal intermediario; la segunda es la vía Δ^5 que procede de la pregnenolona vía 17α -hidroxi-pregnenolona y otros Δ^5 -en- 3β -hidroxiesteroides hasta la testosterona.

Los estudios realizados in vitro han indicado que la vía Δ^4 y Δ^5 están funcionando en el testículo humano, sin embargo, Yanahaira y Troen en 1972 (a), demostraron que la vía Δ^5 es la vía predominante en la biosíntesis de andrógenos.

En el hombre, la testosterona es el andrógeno secretado en mayor cantidad por el tejido intersticial. Sin embargo, en el plasma sanguíneo, la concentración de testosterona depende de la cantidad de hormona que es incorporada a la sangre por los tejidos que la sintetizan y de la velocidad a la que es retirada de la circulación por los procesos catabólicos. Este último proceso es conocido como "velocidad de depuración metabólica" (metabolic

FIGURA 12

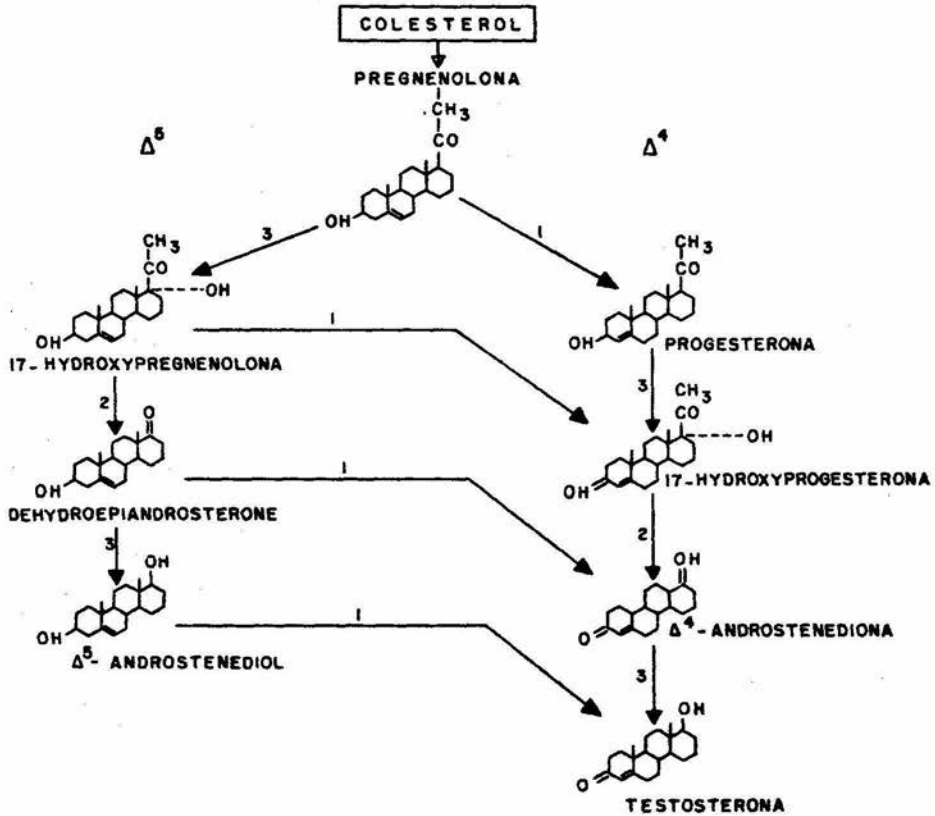


DIAGRAMA QUE MUESTRA LA ESTEROIDOGENESIS TESTICULAR

- 1.- 3β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa
- 2.- 17,20-esteroide liasa
- 3.- 17-esteroide-hidroxilasa

clearance rate, MCR) o simplemente "depuración", que es definida como el volumen de plasma depurado de testosterona (depuración de T) en la unidad de tiempo. En el hombre la concentración sanguínea, la velocidad de secreción y la MCR de la testosterona es de 6.9 ± 0.02 ng/ml; 7.4 ± 2.1 ng/día; 6.6 mg/día y 995 ± 125 l/día (Hudson-1966).

El patrón de secreción de testosterona varía durante la vida del individuo. Durante el período postnatal inmediato, los niveles plasmáticos de testosterona son elevados, después del período postnatal los niveles plasmáticos disminuyen y permanecen bajos (0.44 ± 0.057 ng/ml) hasta la pubertad. En la pubertad hay un incremento rápido en la secreción de testosterona, hasta que alcanza los niveles del adulto (6.7 ± 0.02 ng/ml). Posteriormente, los niveles plasmáticos de testosterona permanecen dentro de estos límites hasta la vejez. (Johnson-1970; Makin-1975; Johnson-1977).

8.- Regulación Hormonal del Testículo.

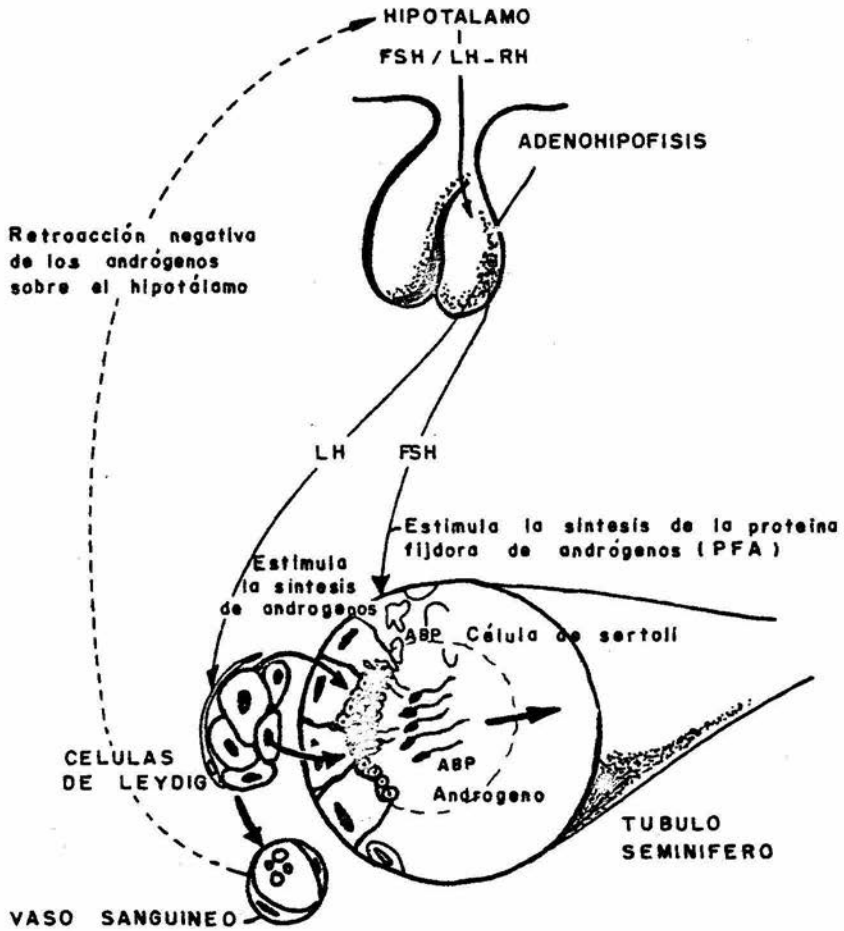
El crecimiento y desarrollo del testículo y el mantenimiento de sus funciones en el organismo adulto, son dependientes de las hormonas hipofisiarias principalmente de la Hormona Foliculo Estimulante (FSH) y de la Hormona Estimulante de las Células Inters

ticiales (ICSH) conocida también como Hormona Luteinizante (LH) (Figura 13).

En los últimos años, un esfuerzo considerable ha sido realizado con el fin de dilucidar la naturaleza precisa de esta dependencia. Como consecuencia, se ha logrado un avance significativo en la identificación del sitio primario de acción de las hormonas hipofisiarias (FSH y LH) y en los mecanismos por los que sus acciones son expresadas en sus células blanco. Hasta la fecha, las evidencias acumuladas indican que la LH actúa sobre las células de Leydig y que las células de Sertoli son el sitio primario de la acción de la FSH. Las células de Sertoli también son sensibles a la testosterona. Aparentemente las células germinales no son sensibles a ninguna de estas hormonas y cada vez es más evidente que los efectos de las gonadotropinas, de la testosterona y de otras hormonas sobre las células germinales son mediados indirectamente, a través de las células de Sertoli y las células de Leydig.

Las células de Sertoli y las de Leydig poseen en sus membranas plasmáticas receptores o sitios de fijación de alta afinidad para FSH y LH, respectivamente (Figura 14). Los receptores representan los sitios de discriminación hormonal y son también los que determinan la especificidad de la respuesta de la célula a

FIGURA 13

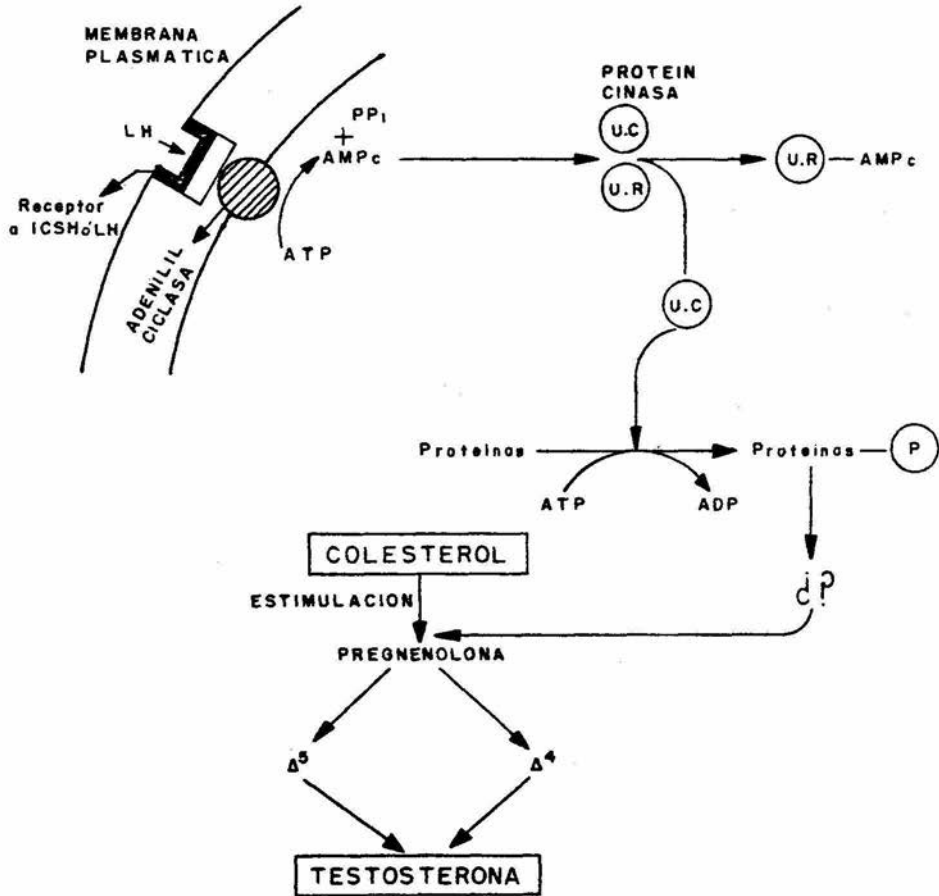


ESQUEMA QUE MUESTRA LA ACCION DE LAS HORMONAS HIPOFISIARIAS EN LAS CELULAS TESTICULARES

la hormona. Los receptores gonadotróficos están acoplados a la subunidad catalítica de la adenilil-ciclase y la función del AMP_c (Adenosina-5'-monofosfato cíclico) como mediador intracelular en el mecanismo de acción de FSH y LH ha sido perfectamente demostrada. Como todas las adenilil-ciclasas sensibles a estas hormonas, las de las células de Sertoli y de Leydig parecen depender también de guanidil nucleótidos y en especial de GTP (Guanosina-5'-Trifosfato), que aparentemente desempeña una función importante en el acoplamiento del complejo "receptor-gonadotropina" a la subunidad catalítica de la adenilil-ciclase. La activación de esta enzima también depende de las concentraciones de Magnesio, ATP (Adenosina-5'-Trifosfato) y Calcio (Abramowitz-1979).

Como consecuencia de la fijación de la LH a las células de Leydig y de la activación de las protein-cinasas por el AMP_c, las proteínas intracelulares fosforiladas por esta última activan la secuencia de reacciones involucradas en la biosíntesis de esteroides. Se considera que el efecto predominante de la LH sobre la esteroidogénesis, es el de estimular la hidroxilación del colesterol para formar 20 α , 22 α -Dihidroxiocolesterol. Estas reacciones constituyen el primer paso en la escisión de la cadena lateral, están mediados por el citocromo P₄₅₀ y se conceptúan como las reacciones paso-limitantes de la esteroidogénesis (Figura 14). Después de su estimulación con la LH las células de Ley-

FIGURA 14
CELULA DE LEY DIG



dig también sintetizan proteínas lábiles que facilitan el transporte de colesterol al interior de la mitocondria, este transporte parece involucrar la presencia de microfilamentos.

La FSH es requerida durante el desarrollo testicular para iniciar y terminar la primera onda espermiogénica, posteriormente la FSH puede ser substituida por la testosterona o no requerirse en absoluto. Es decir, la FSH es indispensable para la inducción de un evento bioquímico esencial para el establecimiento de la primera onda espermiogénica en el testículo en desarrollo. Sin embargo, una vez que se ha iniciado este evento, la espermiogénesis puede persistir en la ausencia de FSH siempre y cuando este presente la testosterona.

En apoyo a este concepto están las observaciones de que la espermatogénesis continúa llevándose a cabo en animales hipofisectomizados a los que se les administra testosterona inmediatamente después de la operación y de que la fijación de FSH a las células de Sertoli induce un aumento considerable en la síntesis de RNA, de proteínas y de fosfolípidos en preparaciones de células de animales prepúberes de una edad específica, pero no en las preparaciones de células de animales adultos. Así la FSH parece desempeñar una función "indispensable" pero "transitoria" en la inicia-

ción o reiniciación de la espermatogénesis (Spilman-1975).

Debido a las complejidades morfológicas y funcionales que plantea el testículo para el estudio de las acciones de la testosterona sobre la fisiología testicular y en vista de que no existe un sistema biológico adecuado para estudiarlas in vitro, el mecanismo de acción de la testosterona sobre la espermatogénesis es uno de los menos explorados.

Se han investigado los mecanismos moleculares involucrados en la acción de la testosterona en otras glándulas y se ha concluido que es la DHT (Dihidroxitestosterona) y no la testosterona la que ejerce los efectos androgénicos. En vista de que se ha demostrado la formación de DHT a partir de testosterona en el tejido testicular, es posible suponer que sea la DHT la hormona activa que participa en la regulación de la fisiología testicular. Sin embargo, el mecanismo de acción de la testosterona sobre la espermatogénesis permanece aún por ser dilucidado. (O'Riordan - 1978).

No obstante, las gonadotropinas hipofisarias y la testosterona no son las únicas hormonas que participan activamente en la regulación y/o modulación de la fisiología del testículo en los mamíferos. Recientemente una gran cantidad de evidencias experi-

mentales indican que el estradiol también podría desempeñar una función importante en la regulación de la producción de andrógenos y por lo tanto, en la fisiología total del testículo.

9.- Efecto del Estradiol en la Fisiología Testicular.

Los efectos que presenta el estradiol en la fisiología testicular en el hombre y diversos animales de laboratorio se conoce desde hace mucho tiempo.

Las primeras observaciones de la influencia que presenta la administración de estradiol sobre el testículo humano, fueron descritas por Huggins en 1941, como efectos secundarios durante el tratamiento con estradiol en pacientes con cáncer prostático, en los que se producía una disminución en la producción de espermatozoides, atrofia testicular y una alteración en la función y morfología de los órganos sexuales secundarios. Subsecuentes investigaciones efectuadas en 1954 por de la Balze aportaron nuevas evidencias del efecto de los estrógenos sobre la fisiología y morfología del testículo humano normal. La administración de estradiol o Diethilestilbestrol (DES) a hombres adultos, en concentraciones más elevadas que las detectadas normalmente, la secreción de las gonadotropinas hipofisarias se inhibe y la función testicular se altera. Un análisis microscópico testicular mostró: 1)

Una disminución en el tamaño de los túbulos seminíferos; 2) Hialinización y fibrosis de las membranas tubulares; 3) Reducción o ausencia de las células germinales, y 4) La desaparición casi completa de las células de Leydig. Además de estos efectos se produce también impotencia, ya que los estrógenos eran incapaces de mantener la libido y la potencia sexual.

Estas observaciones fueron ampliadas por los estudios de Kincl-1963, Kincl-1964, utilizando ratas machos las cuales fueron previamente tratadas con estradiol, les producía alteración testicular, que se reconocía por infertilidad, atrofia del testículo, la próstata y la vesícula seminal. Como consecuencia del severo daño en el epitelio seminífero, este solo consistía de células de Sertoli y espermatogonias aisladas, en tanto que los espermatozoides y las espermátides se hallaban completamente ausentes.

Los cambios observados en el testículo y los órganos sexuales secundarios, en el hombre y la rata con estradiol fueron posteriormente ampliados y confirmados por Verjans (1974), Robaire (1977) y Hunt (1979) en la rata adulta; Meistrich (1977) en ratones y Dickson (1981) en el hombre. Los resultados obtenidos por estos investigadores no solo reportan la alteración de la fisio-

logía y morfología del testículo y de las glándulas sexuales accesorias (próstata y vesícula seminal), sino que también han determinado una disminución en la concentración sanguínea de testosterona y de las gonadotropinas hipofisiarias (FSH y LH).

Los cambios observados en la morfología y fisiología del testículo como consecuencia de la administración de estradiol fueron atribuidos a un mecanismo de acción indirecta del estradiol debido a la supresión de las gonadotropinas (FSH y LH) secretadas por la hipófisis (Kincl-1964). Las gonadotropinas (FSH y LH) estimulan la producción y secreción de andrógenos por el testículo y por lo tanto, la atrofia testicular y de las glándulas sexuales accesorias por el tratamiento por estradiol son atribuidos a la disminución en la producción de testosterona, que está asociada a la disminución de los niveles sanguíneos de LH (Tcholakian-1974). Los resultados obtenidos por Shernis en 1973 durante la administración de estradiol en el hombre también mostraron una disminución en la secreción de FSH y LH por la hipófisis y por lo tanto una disminución en la producción de testosterona. Similares resultados fueron reportados en la rata por Verjans (1974).

Los estudios realizados por Stewart-Bentley en 1974 en el hombre, demuestran que la inhibición en la secreción de FSH y LH dependen de la concentración de estradiol utilizada. A una menor -

concentración de estradiol se obtiene una disminución en los niveles sanguíneos de LH, en tanto que FSH no muestra un cambio significativo. En una concentración elevada de estradiol ambas gonadotropinas son inhibidas. Los niveles sanguíneos de testosterona son inhibidos en ambos casos. de Jong (1975) reporta también éstos resultados en la rata.

No obstante que los estudios de Shernis (1973) y los efectuados por Sawin en 1978 que demuestran que en el hombre el estradiol disminuye la concentración de testosterona sanguínea y de las gonadotropinas FSH y LH. Los resultados reportados por Jones en 1978, muestran una disminución en los niveles sanguíneos de testosterona, pero no detecta cambios en los niveles de FSH y LH durante el tratamiento en el hombre con estradiol.

Estos resultados no eran concluyentes del mecanismo de acción del estradiol en la fisiología testicular a través de la inhibición en la secreción de la FSH y LH por la hipófisis, se realizaron una serie de investigaciones en las cuales se utilizaron ratas adultas hipofisectomizadas las cuales fueron tratadas después de la operación con LH y estradiol simultáneamente. Los resultados de van Beurden (1977) muestran que no se presenta una modificación significativa en la concentración de testosterona. En tanto, que los resultados obtenidos por Hsueb (1978) y de Melner (1978)

muestran que la síntesis de testosterona es disminuida por el efecto del estradiol.

Los resultados de estos estudios sugieren que la inhibición en la producción de testosterona y por lo tanto la inhibición en la fisiología testicular, se debe a un mecanismo de acción directo del estradiol sobre el testículo, principalmente sobre las células de Leydig encargadas de la biosíntesis de testosterona. En apoyo a este mecanismo de acción del estradiol se encuentran los trabajos realizados por Steimberger-1971, Yanahaira-1972 (b) y de Meistrich-1977, que muestran que los efectos inhibitorios del estradiol en el testículo son revertidos cuando la administración de estradiol se realiza simultáneamente con testosterona o andrógenos.

Una gran cantidad de estudios in vitro se han realizado con el fin de establecer la acción directa del estradiol sobre el testículo. Yanahaira (1972)(b) utilizando cultivo de tejido testicular humano, ha demostrado que la adición de estradiol reduce la síntesis de testosterona. Chowdhury (1974), van Beurden (1976), Bartke (1977) y van Beurden (1977)(b) utilizando células de Leydig aisladas de testículo de rata, han demostrado también la inhibición en la síntesis de testosterona como efecto del estradiol. Los estudios realizados por Sairan (1979) confirman y amplían és-

tas observaciones in vitro, demostrando que los estrógenos naturales y sintéticos inhiben la acción de la LH en las células de Leydig, observada por la reducción en la síntesis de testosterona. Sin embargo, aunque se observa una reducción en la fijación de LH a su receptor, esta reducción no afecta la formación de AMP_c, en base a ésta observación sugiere que la inhibición de por el estradiol en la producción de testosterona, se presenta a una etapa distal de la formación de AMP_c y que este efecto inhibitorio del estradiol podría ser de una manera directa sobre las enzimas esteroidogénicas encargadas de la síntesis de testosterona.

Los estudios realizados in vitro por Samuels (1964 y 1969) han mostrado que los estrógenos naturales y sintéticos pueden inhibir la actividad de algunas enzimas esteroidogénicas y por lo tanto, una disminución en la síntesis de andrógenos. La inhibición en la actividad enzimática se presenta en la 17 α hidroxilasa, 17 β -Hidroxiesteroide-dehidrogenasa y de la esteroide C₁₇₋₂₀ liasa. Yanaihara (1972 b) también obtiene de sus estudios in vitro, la inhibición de la actividad enzimática de la 3 β -hydroxy-esteroide-dehidrogenasa. La actividad de esta enzima es necesaria para la conversión de Androstenediol (Δ^5 -Diol) a testosterona desde dehydroepiandrosterona (DHA). Yanaihara no obtiene una inhibición en la actividad de la 17 β -hydroxiesteroide previamente reportado.

Continuando con estos trabajos van Beurden (1978) utilizando células de Leydig de testículo de rata, tratadas con estradiol - obtiene una disminución en la producción de testosterona, con un simultáneo incremento en la producción de pregnenolona. Este aumento en la producción de pregnenolona sugiere un bloqueo en la esteroidogénesis después de la formación de pregnenolona. La determinación de la 17α -hidroxyprogesterona en este mismo estudio, como uno de los esteroides biosintéticos intermediarios en la síntesis de testosterona, presenta un incremento. Este incremento de la 17α -hidroxyprogesterona indica una disminución en la actividad de la esteroide C_{17-20} liasa. Una disminución similar fué obtenida en la actividad de la 17α -hidroxilasa. La conversión microsomal de pregnenolona a testosterona requiere la participación del citocromo P_{450} , para la 17α -hidroxilación y la actividad enzimática de esteroide C_{17-20} liasa. (Purvis-1973).

Los estudios sobre la inhibición de las actividades enzimáticas por efecto del estradiol son ampliadas y confirmadas por Brinkmann (1980). Sus estudios in vitro, utilizando células de Leydig, de testículo de rata tratadas con estradiol, comprueban la disminución en la producción de testosterona, la inhibición de las actividades de las enzimas microsomales 17α -hidroxilasa, la esteroide C_{17-20} liasa y los niveles del citocromo microsomal P_{450} . La disminución del citocromo P_{450} es también reportada por

Kalla (1980) y sugiere que la disminución en la actividad de las enzimas microsomales, puede deberse a una consecuencia en la disminución de los niveles del citocromo P₄₅₀.

Sin embargo, Cigorra (1980), Melner (1980), en base a sus estudios experimentales realizados in vitro con células de Leydig aisladas de testículo de rata sugiere que los efectos inhibitorios que causa el estradiol sobre las actividades enzimáticas de la 17 α hidroxilasa y de la esteroide C₁₇₋₂₀ liasa, de la reducción en la síntesis de andrógenos y el incremento en la 17 α - hidroxiprogesterona y progesterona, se deben a un efecto local del estradiol sobre las células de Leydig, y que este efecto se lleva a cabo a través de los receptores para estradiol presentes en las células de Leydig. En apoyo a esta proposición, sus resultados muestran que la administración de un antiestrógeno (TAMOXIFEN) previene totalmente los efectos inhibitorios causados por el estradiol sobre las enzimas esteroideogénicas.

En 1972 Brinkmann con el fin de establecer el mecanismo de acción del estradiol en el testículo reportó la presencia de un complejo receptor-estradiol en el testículo de rata. Los resultados de este estudio demuestran que el tejido testicular de ratas jóvenes y adultas presenta una macromolécula que fija estr

diol con una gran afinidad, estas macromoléculas presentan un coeficiente de sedimentación de 8S, una constante de afinidad de $3-4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y una concentración de sitios de fijación de 2×10^{-14} moles/mg de proteína citosólica.

Mulder en 1973 confirma la presencia de estas macromoléculas fijadoras de estradiol en el tejido intersticial del testículo de rata. Reporta un coeficiente de sedimentación para éstas macromoléculas y también la presencia de una macromolécula fijadora de estradiol en la fracción nuclear de este tejido con un coeficiente de sedimentación de 5.5 S. Mulder sugiere que la presencia de estas macromoléculas receptoras de estradiol en el núcleo del tejido intersticial, es debido a un mecanismo similar al que se presenta en otros tejidos sensibles a las hormonas esteroides, los que después de que la molécula esteroide es fijada a las moléculas receptoras citoplásmicas son posteriormente transferidas al núcleo, con la subsecuente modificación de su coeficiente de sedimentación del complejo receptor-estrógeno. (Jensen-1967, Jensen-1973, Dickson-1981). Reporta también que no fueron detectadas estas macromoléculas en los núcleos de los túbulos seminíferos. Van Beurden-Lamerks (1974) reporta también la presencia de una macromolécula receptora de estradiol en el citosol del tejido intersticial de testículo de rata. La macromolécula presenta un coeficiente

ficiente de sedimentación de 8S, la concentración de sitios de fijación de estas proteínas por el estradiol fué de 0.12 pmol/mg de proteína citosólica. La macromolécula fijadora de estradiol mostró ser de naturaleza proteica, durante el tratamiento con enzimas proteicas y por su sensibilidad a la temperatura. Sus resultados demuestran además, que esta proteína receptora de estradiol presenta una muy baja afinidad de fijación por la estrona, estril testosterona y 5α -dihidrotestosterona, y una afinidad moderada por diethilestilbestrol, durante los estudios de competición. Confirma los resultados de Mulder (1973), al no detectar las proteínas fijadoras de estradiol en los túbulos seminíferos.

Kato en 1974 y Abney en 1976 confirman y amplían las características de la proteína receptora de estradiol en el citosol del tejido intersticial de testículo de rata. Reportan un coeficiente de sedimentación de la proteína receptora de 9.9 S, una constante de disociación de fijación de $4.3 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ y un número de sitios de fijación de 1.5×10^{-14} moles/mg de proteína citosólica.

Los resultados obtenidos por Van Beurden (1974), Kato (1974) y Abney (1976) de las propiedades de la proteína receptora para estradiol en el testículo de rata son semejantes a las características reportadas para el receptor para estradiol en endometrio,

útero humano y en otros tejidos y órganos sensibles a estradiol (Slyamola-1972, Katzenellenborg-1973, Sica-1973 y van Beurden-1974).

Posteriormente se desarrollaron varios estudios para establecer las variaciones que presenta la proteína receptora para estradiol en ratas hipofisectomizadas y de las fluctuaciones que presenta el receptor a diferentes edades del desarrollo de la rata (de Boer-1976; de Boer-1977 a, b; Abney-1979) y en algunas alteraciones testiculares (Dube-1979; Alva-1980).

La presencia de esta proteína receptora para estradiol en el testículo humano, fué descrita por Tamaya en 1978, en el testículo de un niño con el síndrome de feminización testicular (TFS) y en el testículo senil de tres pacientes con cáncer prostático. El análisis en un gradiente de sacarosa reveló una proteína con un coeficiente de sedimentación de 7S. La constante de disociación determinada fué de aproximadamente 1.3×10^{-9} M en todos los casos estudiados.

Los estudios de Murphy en 1980, confirman la presencia de la proteína receptora de estradiol en pacientes con carcinoma prostático. Los receptores presentan un número de sitios de fijación de 83 ± 20 fmol/g de tejido testicular (un rango de 58 - 118 fmol/g

de tejido testicular) y una constante de disociación media de 0.2 ± 0.04 nM (un rango de 0.1 - 0.2 nM).

Sin embargo, los conocimientos respecto a la función que desempeña el estradiol a través de su interacción con el receptor en la regulación de la fisiología testicular humana es muy limitada y no conocida totalmente.

El testículo humano para su preciso funcionamiento requiere de la testosterona sintetizada por las células de Leydig. En la regulación de la síntesis de testosterona, interviene el estradiol testicular a través de su interacción con su receptor citoplásmico. Sin embargo, actualmente no se han realizado estudios a fin de demostrar la presencia y/o variaciones que manifiestan las moléculas receptoras durante el desarrollo testicular humano y en las diferentes disfunciones testiculares, por lo que consideramos importante la realización de este estudio para conocer la presencia y/o variaciones de la concentración del estradiol citoplásmico a diferentes edades del desarrollo testicular humano y en el testículo de pacientes infértiles.

II.- OBJETIVOS

- 1.- Determinar la concentración del receptor citoplásmico para estradiol en testículo humano de diferentes edades.
- 2.- Determinar la concentración del receptor citoplásmico para estradiol en el testículo de pacientes infértiles.
- 3.- Correlación del diagnóstico histológico de las biopsias testiculares de pacientes infértiles con la presencia del receptor para estradiol.

III.- MATERIAL Y METODOS

1.- Obtención de Muestras Biológicas.

a) Muestras de Tejido Testicular de Hombres de Diferentes Edades.

Las muestras de tejido testicular de hombres de diferentes edades fueron obtenidas durante la realización de autopsias, por el Servicio de Patología de los diferentes Hospitales del Centro Médico Nacional, IMSS, a diferentes individuos que fallecieron por diversas causas, pero que no presentaban antecedente alguno de patología testicular. Las muestras testiculares fueron tomadas a un tiempo máximo de 4 hr después de la muerte del individuo y fueron utilizadas inmediatamente para la determinación de receptores para estradiol.

b) Biopsias Testiculares de Pacientes Infértiles.

Las biopsias testiculares de pacientes infértiles fueron realizadas en el Servicio de Andrología del Hospital General del Centro Médico Nacional, IMSS. Las biopsias fueron utilizadas inmediatamente para realizar un diagnóstico histológico y la determinación de receptores para estradiol.

2.- Clasificación de las Muestras Testiculares.

a) Durante el crecimiento.

Las muestras testiculares obtenidas por autopsia se clasificaron en cinco grupos de acuerdo a la edad que presentaban los individuos:

Grupo I.- El primer grupo de individuos presentó un rango de 0 - 0,5 años de edad. Se ubicaron tres bebés: uno recién nacido (0,0 años); uno de cuatro meses (0,3 años) y uno de seis meses de edad (0,5 años).

Grupo II.- El rango de edad del segundo grupo fué entre 1 - 5 años de edad. Este grupo consistió de tres niños: dos de un año de edad y uno de cinco años de edad.

Grupo III.- El tercer grupo presenta un rango de edad de 35 - 40 años. Se ubicaron en este grupo tres hombres de 34,35 y 40 años de edad.

Grupo IV.- El rango de edad del cuarto grupo fué entre 55-65 años de edad. Se incluyeron cuatro hombres de 54, 64, 64 y 65 años de edad.

Grupo V.- El quinto grupo fué de un rango de edad de 70 - 85 años. Se ubicaron en el cinco hombres de 70, 74, 74, 75 y 85 años de edad.

b) En Pacientes Infértiles.

Las muestras testiculares de pacientes infértiles se ordenaron de acuerdo a la disfunción testicular.

1.- Un paciente presentaba Orquitis por el tratamiento de un seminoma testicular por radioterapia.

2.- Dos pacientes presentaban el Síndrome Células de Sertoli.

3.- Un paciente presentaba Orquitis Post-viral.

4.- Un paciente presentaba Criptorquidia Bilateral.

5.- Un paciente presentaba el Síndrome de Klinefelter.

3.- Procesamiento de las Muestras Testiculares.

Las muestras testiculares obtenidas por autopsia fueron utilizadas para determinar la concentración de receptores para estradiol. Las muestras testiculares obtenidas por biopsia fueron separadas en dos partes, una de las cuales fué utilizada nara el estudio histológico, y la otra fué utilizada para la de -terminación de receptores para estradiol.

a) Diagnóstico Histológico.

La muestra de la biopsia testicular fué fijada con Solu -ción Bouin. Después de la fijación, fué embebida en parafina y posteriormente se cortaron secciones de 5 μ . La tinción se reali -zó mediante el método de hematoxilina-eosina. Los cortes histológicos teñidos fueron analizados por microscopia. (Veáse anexo).

b) Determinación de Receptores.

Las muestras testiculares obtenidas por autopsia o por -biopsia, se les separa completamente la túnica albugínea y los vasos sanguíneos, para obtener el parénquima testicular, éste es procesado como se describe a continuación. Para la determina g

ción de la fijación del estradiol a su receptor se utilizó el método de Erdos-1970, modificado por Alva-1980.

Obtención del Citosol.

El parénquima testicular fué pesado y diluido 1:3 peso/volumen en amortiguador frío TRIS-EDTA, TRIS(TRIS(HYDROXYMETHYL) AMINO METHANE) 0.01 M y EDTA (ETHYLENEDIAMINETETRA-ACETIC ACID) 0.001 M, a un pH de 7.4, ajustado con HCl 0.1 N (Potenciómetro - Expansión Scale pH-Meter Model 38, COLEMAN). La muestra es homogeneizada en vidrio-teflón, con un homogenizador Sarraceno-Warnton (Tipo RZPI-64), a una velocidad de 600 rpm. La homogeneización se realiza durante 1 minuto, cada 20 segundos con intervalos de 1 minuto en un baño de hielo.

El homogenizado resultante fué centrifugado a 105,000 g (veces la gravedad), durante 60 minutos a 4° C, en una ultracentrífuga Beckman (L265-B) con un rotor de ángulo fijo (No. de serie 65).

Al término de la centrifugación se obtiene el citosol o sobrenadante con un pipeta Pasteur, teniendo cuidado de no contaminar el citosol con la capa de lípidos formada encima del so-

brenadante, evitando de esta manera la interferencia de los lípidos en la determinación de los receptores para estradiol.

El citosol obtenido es utilizado inmediatamente para la cuantificación del receptor para estradiol (Alva-1980) y para la determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry-1951.

Formación de las Mezclas de Fijación Específica Receptor-Estradiol y de la Fijación Inespecífica Proteína Inespecífica-Estradiol.

El manejo de las muestras y su procesamiento fué efectuado a 4° C.

Para formar la mezcla de incubación de fijación específica receptor-estradiol, a una serie de tubos de ensayo previamente siliconizados se les adiciona Estradiol Tritiado (³H-Estradiol) en una concentración de 2×10^{-7} M disuelto en etanol destilado, posteriormente se les agrega 200 ul de citosol (0.2 ml), más amortiguador frío TRIS-EDTA para completar un volumen total de 250 ul (0.250 ml) en el tubo de ensayo.

Para la formación de la mezcla de fijación inespecífica se utilizan una serie de tubos siliconizados, a los cuales se les a adiciona una mezcla de ^3H -Estradiol (2×10^{-7} M) y de estradiol no marcado cien veces más que la concentración de ^3H - Estradiol (2×10^{-6} M) disueltos en etanol destilado, posteriormente 200 μl de citosol, más amortiguador frío TRIS-EDTA, para obtener un volumen total en el tubo de ensayo de 250 μl .

Incubación de las Mezclas de Fijación de Estradiol Específicas e Inespecíficas.

Las series de tubos de ensayo con las mezclas específicas e inespecíficas son agitadas durante 10 segundos suavemente, y son incubadas posteriormente a 4°C durante 18 a 20 horas.

Absorción del Complejo Receptor-Estradiol.

Después de la incubación el complejo receptor hormona es absorbido cuando se le adiciona a las mezclas de incubación específica e inespecífica, 0.5 ml de la suspensión de Hidroxilapatita (HAP) al 60% en amortiguador TRIS-HCl (0.05 M de TRIS) a un pH de 7.3 ajustado con HCl 1N (Véase anexo). Los tubos fueron mezclados uniformemente agitándolos suavemente durante 10

segundos con intervalos de 5 minutos durante un período total de 20 minutos a 4°C, para permitir la absorción del complejo receptor-hormona por la HAP. Posteriormente, los tubos son centrifugados a 800 g durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga Internacional (International Centrifuge Universal Model UV); los sobrenadantes son descartados.

Eliminación del Estradiol no fijado.

Los tubos conteniendo el precipitado de la HAP con el complejo receptor-hormona fué lavado por centrifugación, a los cuales se les adiciona 4 ml de amortiguador frío TRIS-EDTA, se resuspende el precipitado de la HAP por agitación suave durante 10 segundos y posteriormente se centrifuga a 800 g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes son eliminados. Los lavados fueron realizados por tres veces más, para eliminar en su mayor proporción la hormona no fijada.

Liberación del Complejo Receptor-Estradiol de la HAP.

Los precipitados de HAP obtenidos durante los lavados con amortiguador, se les adiciona 3.5 ml de etanol destilado y son agitados vigorosamente durante 10 segundos cada 3 minutos, por un tiempo total de 15 minutos a temperatura ambiente. Las mez-

clás formadas fueron posteriormente centrifugadas durante 10 minutos a 800 g, permitiendo el empaquetamiento de la HAP, el sobrenadante utilizado para la cuantificación de radioactividad del estradiol tritiado disuelto en el etanol.

Cuantificación del Estradiol Tritoado filtrado.

El estradiol tritiado disuelto en el sobrenadante etanólico, es decantado directamente en los viales a los cuales se les adiciona 10 ml de líquido de centelleo (PPO - 1.8×10^{-2} M y - POPOP - 3.4×10^{-4} M disueltos en tolueno). La radioactividad es determinada en un contador de Centelleo líquido (Marca Nuclear Chicago, Model II) a 4°C. Las cuentas por minuto obtenidas en el contador por la radioactividad presente, son utilizadas para los cálculos de la concentración de receptores para estradiol.

4.- Determinación de Hormonas Esteroides en los Pacientes Infértiles.

A los pacientes infértiles se les determinó la concentración sanguínea de Estradiol, Testosterona y Progesterona (Véase anexo) en la Unidad Metabólica del Hospital General del Centro Médico Nacional, IMSS.

IV.- RESULTADOS

1.- Concentración del Receptor para Estradiol durante el Desarrollo Testicular.

Las muestras testiculares de hombres de diferentes edades obtenidas por autopsia realizadas en el Servicio de Patología de los diferentes Hospitales del Centro Médico Nacional, IMSS, fueron utilizadas para la determinación de receptores para Estradiol. Los resultados obtenidos de la determinación de receptores en los diferentes grupos de edad se muestran en la Gráfica 1.

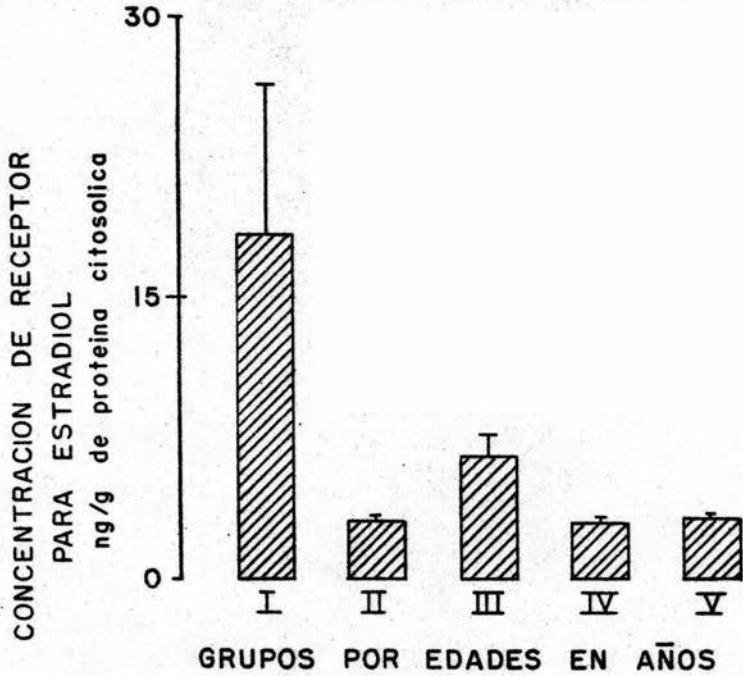
Los resultados de la concentración del receptor que se presentó en cada grupo es la siguiente:

El grupo I con un rango de 0 - 0.5 años de edad, se determinó una concentración de receptores de 18.2 ± 8.06 ng/g de proteína citosólica. El valor resultante es el promedio y la desviación estandar de tres muestras testiculares determinadas por duplicado.

El grupo II, con un rango de 1 - 5 años de edad, se determinó una concentración de receptores de 3.1 ± 0.09 ng/g de proteína citosólica. El valor resultante es el promedio y la des -

GRAFICA I

CONCENTRACION DEL RECEPTOR PARA ESTRADIOL DURANTE EL DESARROLLO TESTICULAR



CADA BARRA REPRESENTA EL PROMEDIO LA DESVIACION ESTANDAR DE N DETERMINACIONES REALIZADAS POR DUPLICADO.

viación estandar de tres muestras testiculares determinadas por duplicado.

El grupo III con un rango de 35 - 40 años de edad se determinó una concentración de receptores de 6.6 ± 1.03 ng/g de proteína citosólica. El valor resultante es el promedio y la desviación estandar de tres muestras testiculares determinadas por duplicado.

El grupo IV con un rango de 55 - 65 años de edad, presentó una concentración de receptores de 2.9 ± 0.57 ng/g de proteína citosólica. La concentración obtenida es el promedio y la desviación estandar de cuatro muestras testiculares determinadas por duplicado.

El grupo V con un rango de 70 - 85 años de edad, se obtuvo una concentración de receptores de 3.1 ± 0.52 ng/g de proteína citosólica. El resultado es el promedio y la desviación estandar de cinco muestras testiculares determinadas por duplicado.

En todos los grupos estudiados se obtuvo la presencia de receptores testiculares para estradiol. No obstante que el número de muestras testiculares por grupo de edad fué reducido, los resultados obtenidos muestran una elevada concentración de recep-

tores después del nacimiento (0 - 0.5 años) y esta concentración disminuye drásticamente del primero al quinto año de edad, y al parecer se mantiene más o menos constante la concentración durante el desarrollo testicular.

2.- Concentración del Receptor para Estradiol en el Testículo de Pacientes Infértiles.

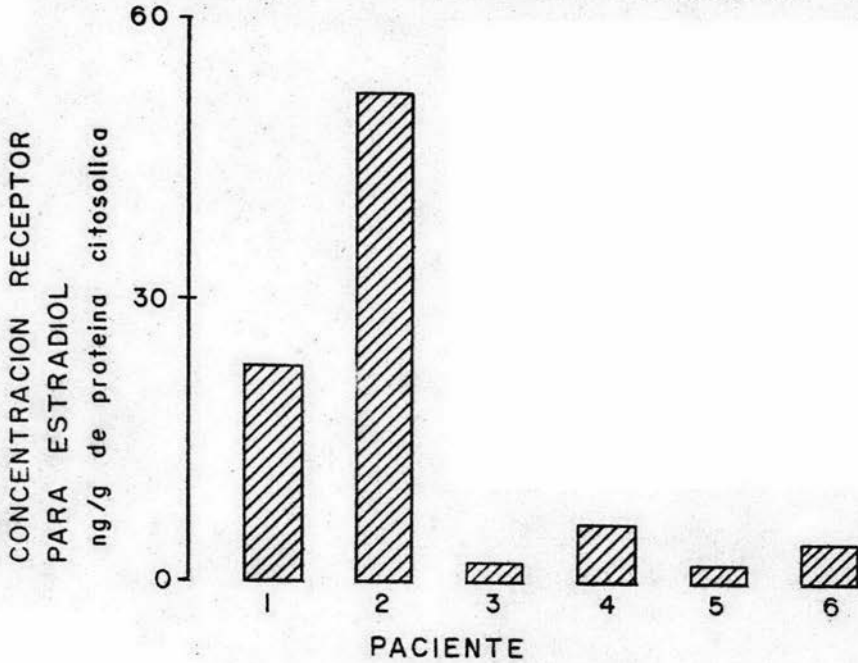
Las muestras testiculares obtenidas por biopsia de los pacientes infértiles, en el Servicio de Andrología del Hospital General del Centro Médico Nacional, IMSS, utilizadas para la determinación de receptores presentaron el receptor para estradiol. Los resultados obtenidos de la concentración de receptores para estradiol de cada paciente se muestran en la Gráfica 2.

Los resultados de la concentración del receptor que presentó cada paciente es la siguiente:

El paciente No. 1 de una edad de 23 años y que presentaba Orquitis por el tratamiento de un seminoma por radioterapia se determinó una concentración de receptores de 23.0 ng/g de proteína citosólica.

GRAFICA 2

CONCENTRACION DEL RECEPTOR PARA ESTRADIOL EN EL TESTICULO DE PACIENTES INFERTILES



CADA BARRA REPRESENTA EL VALOR DE UNA MUESTRA TESTICULAR DETERMINADA POR TRIPLICADO.

El paciente No. 2 de una edad de 24 años y que presentaba el Síndrome Células de Sertoli, se obtuvo una concentración del receptor de 52.1 ng/g de proteína citosólica.

El paciente No. 3 de 24 años de edad y que presentaba Orquitis post-viral, se obtuvo una concentración de receptor de 1.3 ng/g de proteína citosólica.

El paciente No. 4 con una edad de 23 años y que presentaba Criptorquidia bilateral, se determinó una concentración de receptores de 5.9 ng/g de proteína citosólica.

El paciente No. 5 de 31 años de edad y que presentaba el Síndrome de Klinefelter se determinó una concentración de 1.5 ng/g de proteína citosólica.

El paciente No. 6 de 29 años de edad y que presentaba el Síndrome Células de Sertoli, se determinó una concentración de 3.9 ng/g de proteína citosólica.

Los valores obtenidos es el resultado de la determinación por triplicado de la única muestra testicular analizada, donde se puede observar una gran fluctuación en la concentración de receptores para estradiol de un paciente a otro.

3.- Diagnóstico Histológico.

Las biopsias testiculares obtenidas de los pacientes infértiles que asistieron al Servicio de Andrología del Hospital General del Centro Médico Nacional, IMSS fueron divididas para su diagnóstico histológico y para el estudio de receptores para estradiol.

Las principales características histológicas observadas de los pacientes infértiles, que nos permiten la correlación con la presencia de receptores para estradiol son descritas a continuación:

Paciente No. 1- Orquitis por el tratamiento de un seminoma testicular por radioterapia. El tejido testicular mostró los túbulos seminíferos grandes y de tamaño irregular, con una membrana basal de apariencia normal. Aproximadamente el 40% de los túbulos seminíferos no presentaron epitelio germinal, pero sí la presencia de células de Sertoli. En los túbulos en los que la espermátogénesis persistió, se encontró avanzada hasta el estado de espermatide tardía. En el espacio intersticial se presentó hiperplasia de las células de Leydig. (Foto No. 1).

Paciente No. 2 y 6 - Síndrome Células de Sertoli.

El estudio histológico mostró que el tamaño de los túbulos seminíferos era de tamaño normal, con su membrana basal engrosada moderadamente. Los túbulos seminíferos mostraban la ausencia de epitelio seminífero, únicamente presentaban células de Sertoli, que eran de tamaño normal. No se observó fibrosis o hialinización peritubular. El espacio intersticial mostraba las células de Leydig de apariencia normal. No se observó fibrosis ni cambios en la población de las células intersticiales. (FOTO No. 2).

Paciente No. 3 - Orquitis Post-viral.

El estudio histológico mostró que la túnica albugínea se presentó más gruesa que lo normal. Se observó hialinización de los túbulos seminíferos, además de la ausencia de células germinales y células de Sertoli. El espacio intersticial es ocupado por las células de Leydig que se encuentran rodeadas de tejido conectivo edematoso. En el espacio intersticial los vasos sanguíneos muestran un engrosamiento de su pared y prominencia de las células endoteliales. (FOTO No. 3).

Paciente No. 4 - Criptorquidia Bilateral.

El estudio histológico mostró un pequeño engrosamiento de la túnica albugínea. Los túbulos seminíferos se observan de ta-

maño irregular, presentando fibrosis de la membrana basal. En los túbulos seminíferos aunque se observa el epitelio germinal, la mayor parte de ellos mostraban ausencia de las células germinales con una gran proliferación de células de Sertoli. En los túbulos en los que la espermatogénesis se desarrolló se observa hasta el estado de espermátide tardía. En el epitelio intersticial se observan las células de Leydig normales. (FOTO No. 4).

Paciente No. 5 - Síndrome de Klinefelter.

El estudio histológico mostró los túbulos seminíferos de tamaño irregular, con una membrana basal gruesa y hialinizada, no se presentaban células germinales, solamente contenían células de Sertoli. En el espacio intersticial se observa fibrosis e hiperplasia de las células de Leydig, de forma variable y en una mayor proporción formando agrupaciones o racimos de células. (FOTO No. 5).

Las características histológicas observadas en la realización de este trabajo, coinciden con las que han sido previamente descritas por diversos autores para estos padecimientos testiculares. (Sniffen-1952, Anderson-1955, Mancini-1965, Paulsen-1967, Williams-1977).

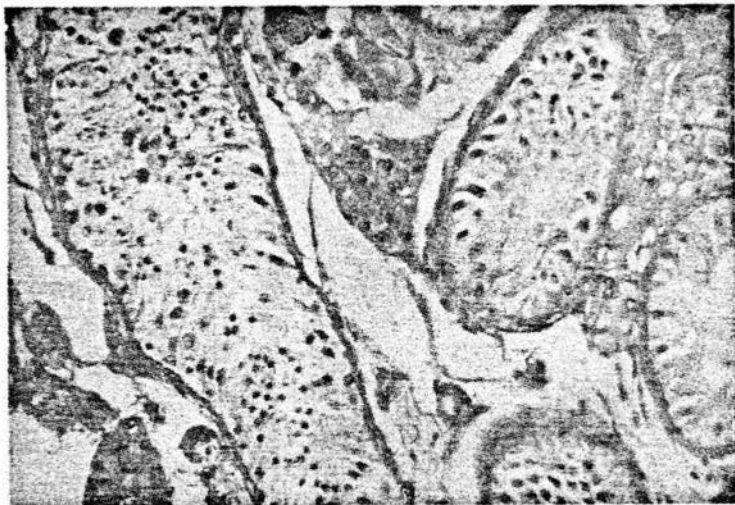


FOTO No. 1.- Paciente 1. Orquitis por el tratamiento
de un seminoma testicular por radioterapia.

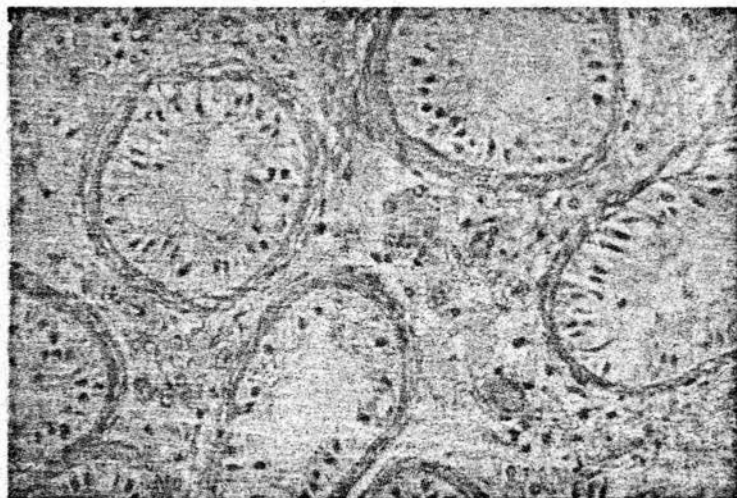


FOTO No. 2.- Paciente 2 y 6. Síndrome Células de Ser-
toli.

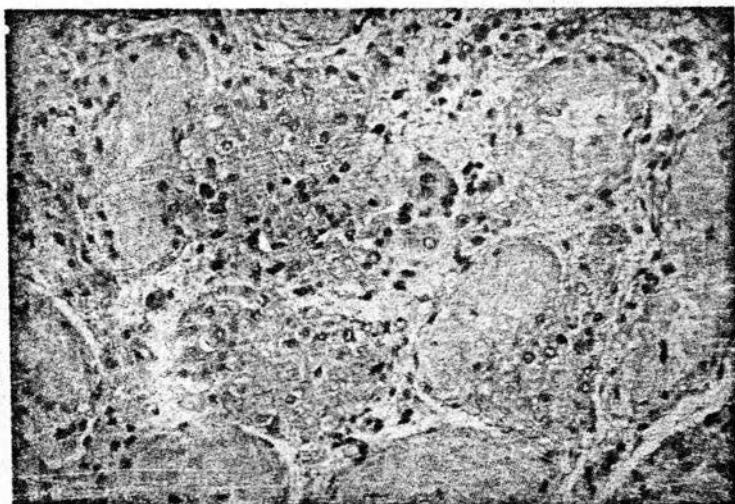


FOTO No. 3.- Paciente 3. Orquitis Post-viral.



FOTO No. 4.- Paciente 4. Criptorquidia Bilateral.

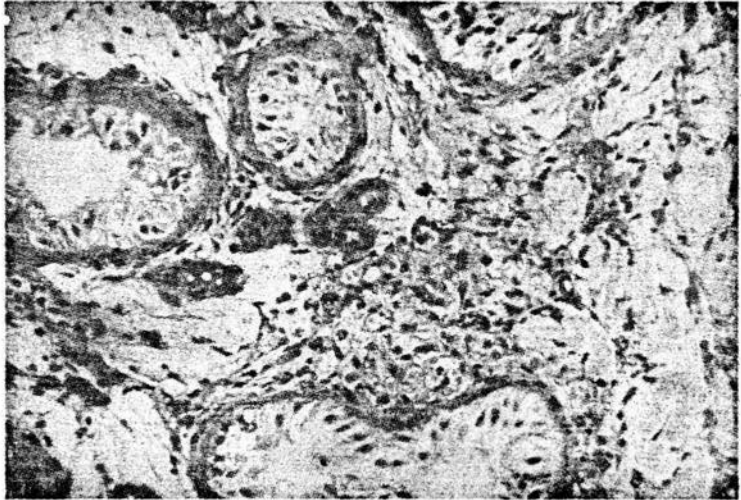


FOTO No. 5.- Paciente 5. Síndrome de Klinefelter.

4.- Concentración Sanguínea de Estradiol, Testosterona y Progesterona en los Pacientes Infértiles.

Los resultados obtenidos en la determinación de las hormonas esteroides en los pacientes infértiles, efectuadas en la Unidad Metabólica del Hospital General del Centro Médico Nacional, IMSS, se muestran en las Gráficas 3, 4 y 5 que corresponden respectivamente a la concentración sanguínea de estradiol, testosterona y progesterona. Cada gráfica incluye el rango de la concentración sanguínea normal de cada hormona analizada.

En el caso del paciente No. 1, que presentaba Orquitis por el tratamiento de un seminoma por radioterapia no se determinaron los niveles sanguíneos de las hormonas esteroides.

En el hombre normal la concentración sanguínea de estradiol es de 10 - 40 pg/ml de sangre; la testosterona de 4 - 7 ng/ml de sangre y de progesterona de 0.25 - 0.80 ng/ml de sangre. Los niveles sanguíneos de estas hormonas esteroides detectadas en los pacientes infértiles es la siguiente:

El paciente No. 2 con el Síndrome Células de Sertoli se determinó una concentración de estradiol de 155.75 ± 19.90 pg/ml; de testosterona de 5.74 ± 0.76 ng/ml y de progesterona de 0.95 ± 0.08 ng/ml de sangre.

El paciente No. 3 con Orquitis post-viral, los valores determinados fueron para estradiol 266.40 ± 33.03 pg/ml; de testosterona de 6.48 ± 1.08 ng/ml y de progesterona 0.90 ± 0.28 ng/ml de sangre.

El paciente No. 4 con Criptorquidia Bilateral, las concentraciones sanguíneas determinadas fueron para el estradiol 69.53 ± 12.24 pg/ml; de testosterona 5.0 ± 0.89 ng/ml y de progesterona de 1.44 ± 0.46 ng/ml de sangre.

El paciente No. 5 con Síndrome de Klinefelter, los valores de las concentraciones sanguíneas determinadas fué para el estradiol 82.09 ± 17.85 pg/ml; de testosterona 0.8 ± 0.16 ng/ml y de progesterona de 1.38 ± 0.42 ng/ml de sangre.

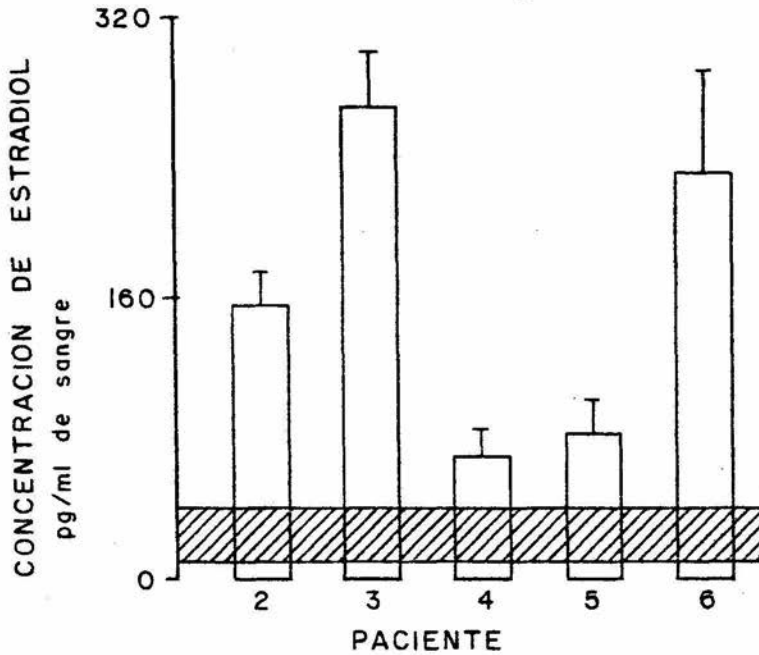
El paciente No. 6 con el Síndrome de Células de Sertoli, las concentraciones sanguíneas determinadas fueron 232.22 ± 56.49 pg/ml de estradiol; 6.64 ± 0.82 ng/ml de testosterona y de 0.71 ± 0.24 ng/ml de sangre de progesterona.

Los valores obtenidos de los niveles sanguíneos de las hormonas esteroides en los pacientes infértiles mostró en todos ellos una elevación en la concentración de estradiol. La testosterona se

mantuvo dentro del rango normal en todos los pacientes a excepción del paciente número 5, en que la concentración de testosterona disminuyó hasta valores muy bajos. La progesterona solo en los pacientes número 4 y 5, mostraron un incremento significativo en la concentración con respecto al valor normal.

GRAFICA 3

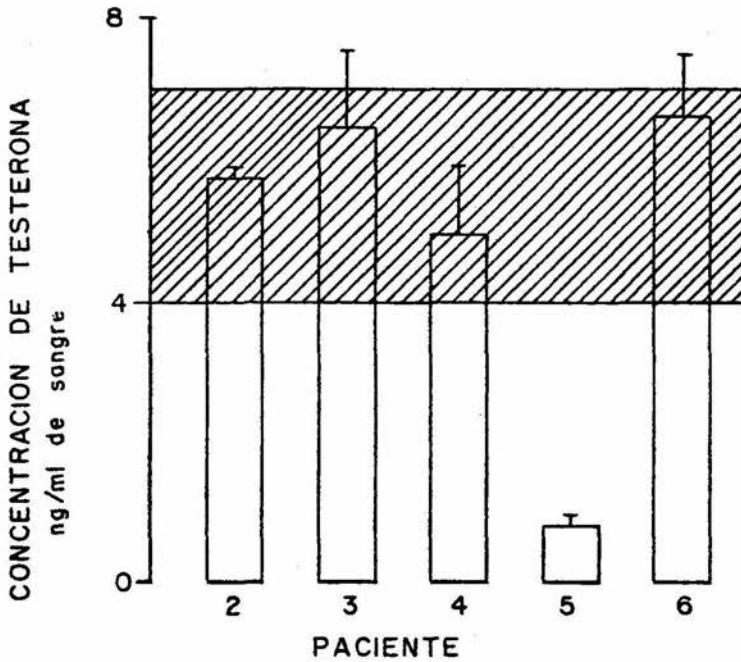
CONCENTRACION SANGUINEA DE ESTRADIOL EN LOS PACIENTES INFERTILES



CADA BARRA REPRESENTA EL PROMEDIO Y LA DESVIACION DE 10 DETERMINACIONES REALIZADAS EN CADA PACIENTE. LA ZONA SOMBRADA INDICA EL RANGO DE CONCENTRACION NORMAL DE ESTRADIOL SANGUINEO.

GRAFICA 4

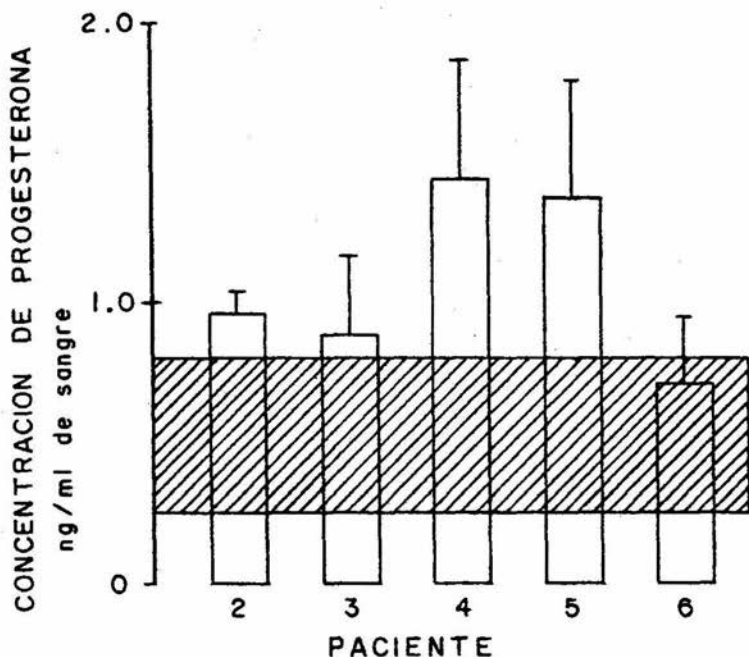
CONCENTRACION SANGUINEA DE TESTOSTERONA EN LOS PACIENTES INFERTILES



CADA BARRA REPRESENTA EL PROMEDIO Y LA DESVIACION ESTANDAR DE 10 DETERMINACIONES REALIZADAS EN CADA UNO DE LOS PACIENTES. LA ZONA SOMBRADA INDICA EL RANGO DE CONCENTRACION NORMAL DE TESTOSTERONA SANGUINEA.

GRAFICA 5

CONCENTRACION SANGUINEA DE PROGESTERONA EN LOS PACIENTES INFERTILES



CADA BARRA REPRESENTA EL PROMEDIO Y LA DESVIACION ESTANDAR DE 10 DETERMINACIONES REALIZADAS EN CADA UNO DE LOS PACIENTES. LA ZONA SOMBREADA INDICA EL RANGO DE CONCENTRACION NORMAL DE PROGESTERONA SANGUINEA.

V.- DISCUSION

El testículo realiza dos funciones importantes en la vida del hombre, una función reproductora y una función hormonal. La función reproductora la lleva a cabo en los túbulos seminíferos mediante la producción de espermatozoides, proceso conocido como espermatogénesis. Sin esta función espermatogénica el hombre es incapaz de reproducirse. La función hormonal comprende la síntesis y secreción de andrógenos, que efectúan la células intersticiales o células de Leydig. La testosterona es uno de los andrógenos más importantes y esenciales para el establecimiento, desarrollo y mantenimiento de la espermatogénesis.

La regulación de las funciones del testículo se hallan bajo el control de la FSH y LH, hormonas gonadotróficas secretadas por la hipófisis. La FSH ejerce su efecto en el interior de los túbulos seminíferos, específicamente en las células de Sertoli, las cuales contienen receptores membranales específicos para esta hormona. La LH actúa a través de receptores específicos sobre las células de Leydig, esta interacción entre la hormona y el receptor desencadena el mecanismo esteroidogénico para la producción de testosterona.

Sin embargo, la producción de testosterona no solo depende de la estimulación de la LH, sino que también ha sido propuesto que el estradiol interviene en la regulación de la síntesis de testosterona. Stumpf en 1969, demostró que el testículo es un órgano sensible a estradiol, cuando a ratas machos les administró estradiol radioactivo y utilizando autoradiografía, observó que la radioactividad se localizaba en el tejido intersticial, notando que la mayor concentración de estradiol radioactivo se localizaba en el núcleo de las células intersticiales. También se ha comprobado que el testículo sintetiza y secreta estradiol (Kelch-1972; Longscope-1972; Baird-1973; Payne-1976 y van der Molen-1981) .

La administración de estradiol en el hombre y diversos animales de laboratorio, trae como consecuencias una inhibición de la función testicular que se reconoce por una disminución en la función espermatogénica y esteroidogénica, la alteración en la morfología y fisiología de las glándulas sexuales secundarias y una disminución de los niveles sanguíneos de LH.

Los efectos observados en la inhibición testicular como consecuencia de la administración de estradiol, han sido atribuidos a un mecanismo de acción indirecta del estradiol sobre la secreción

de gonadotrofinas (FSH y LH). Sin embargo, aun cuando se han realizado diversos estudios con el fin de esclarecer el mecanismo de acción del estradiol sobre la fisiología testicular, no se ha llegado a una conclusión satisfactoria (Chowdhury-1981). En base a estas observaciones, es importante conocer el mecanismo exacto de la regulación de la síntesis de testosterona y de la manera en que el estradiol interviene en esta regulación.

A la concentración normal fisiológica del estradiol o incrementada hasta por diez veces, después de inyecciones prolongadas, no afectan los niveles de gonadotrofinas (de Jong-1975). La demostración de que a niveles fisiológicos el estradiol no presenta un efecto sobre la concentración de las gonadotrofinas, pero sí un efecto inhibitorio en la síntesis de testosterona nos induce a estudiar otro mecanismo por el cual podría actuar el estradiol a nivel testicular. Este mecanismo es el que ha sido previamente propuesto para la acción de las hormonas esteroides en otros tejidos sensibles a estradiol, en el cual el estradiol ejerce su acción regulando la síntesis de testosterona a través de la fijación con su receptor citoplásmico presente en las células de Leydig.

En apoyo a este mecanismo de acción, se encuentran los estudios que han demostrado que los efectos inhibitorios observados

por el estradiol en la esteroidogénesis testicular, son totalmente prevenidos cuando se administra un antagonista de los estrógenos (TAMOXIFEN), impidiendo la reducción de la síntesis de testosterona (Cigorra-1979; Melner-1980).

Debido a su hidrofobicidad y su bajo peso molecular las hormonas esteroides pueden difundirse rápidamente al interior de todas las células del organismo, pero solo inducen reacciones específicas en aquellas células de tejidos sensibles a los esteroides. El uso de las hormonas esteroides radioactivas en estudios de: 1) autoradiografía; 2) cromatografía de afinidad; 3) fraccionamiento celular y 4) centrifugación en gradiente de densidad han permitido demostrar que la afinidad tan grande que manifiestan algunos tejidos por un esteroide determinado, proviene de la capacidad de las células para biosintetizar proteínas citoplásmicas "especiales" que interceptan e interaccionan rápidamente y específicamente con los esteroides que penetran en la células. La aceptación que le dan estas proteínas a las hormonas esteroides, sirvió de base para denominarlas por el nombre de "receptores" (Gorski-1976; Chan-1976 y Cidlowski-1978).

En términos generales, los receptores llevan a cabo dos funciones importantes, la primera es de reconocer y seleccionar entre todos los esteroides que se encuentran en contacto con la célula

el más apropiado para funcionar como mensajero químico; la segunda es la de traslocar el esteroide al núcleo donde interacciona con los sitios aceptores específicos y modificar la función genómica. Por esta razón se considera que los receptores son los principales componentes del mecanismo por el cual los esteroides modifican la expresión genética de la célula e intervienen en la regulación de algunas funciones celulares.

La facilidad con la que se desnaturalizan las proteínas receptoras, ha impedido hasta ahora su obtención como especies moleculares homogéneas, en su lugar se han obtenido una gran variedad de especies cuyas formas dependen de las técnicas que se utilizan para su aislamiento y purificación. La cantidad de receptores citoplásmicos por célula se ha calculado en 10,000 moléculas, sin embargo, esta cantidad puede fluctuar dependiendo de : 1) la intensidad y duración de la estimulación hormonal previa; 2) factores tales como la fase del ciclo de la célula, edad, metabolismo, estado genético, nutrición, pretratamiento farmacológico y estado patológico de la misma, así como del efecto de otras hormonas. En relación a este último factor es conveniente recordar que un esteroide determinado puede estimular o inactivar su propio sistema de receptores o el de otros esteroides. La progesterona por ejemplo disminuye la concentración de sus propios recep -

tores y los del estradiol, en cambio el estradiol aumenta la cantidad de receptores para progesterona y prolactina e induce un estado refractario en sus células sensibles, solo cuando es administrado por períodos prolongados y a grandes dosis (de Boer-1976; Horwitz-1978; Cidlowski-1978 y Moger-1980). En conformidad con esto, resultados de los estudios mas recientes indican que cuando un esteroide falla en estimular sus órganos sensibles, es debido a que las células carecen de receptores para esta hormona.

Los resultados obtenidos en la realización de este trabajo de investigación ha demostrado la presencia de proteínas receptoras para estradiol en todas las muestras testiculares estudiadas, confirmando y ampliando los estudios realizados en testículo humano por Tamaya (1978) y Murphy (1980), comprobando la sensibilidad del testículo humano a estradiol.

Las concentraciones del receptor para estradiol determinadas en el testículo humano de diferentes edades, muestra que se presenta una concentración que varía dependiendo de la edad del grupo estudiado (Grafica 1). La concentración de receptores se presentó en una mayor concentración para el grupo de menor rango de edad (0-0.5 años) con una concentración de 18.2 ± 0.6 ng/g de proteína citosólica y disminuye drásticamente en el grupo de 1-5 años de edad, a una concentración de 3.1 ± 0.09 ng/g de proteína

citósica, manteniéndose mas o menos constante en los otros grupos de edad estudiados (35-40 años de 6.6 1.03 ng/g; 55-65 años de 2.9 0.57 ng/g y de 70-85 años de 3.1 0.52 ng/g de proteína citósica).

Las variaciones de la concentración de receptores para estradiol, manifiestan un comportamiento similar al que ha sido determinado durante el desarrollo testicular en la rata (de Boer-1976; Abney-1976; Abney-1979 y Alva-1980). Una elevada concentración ha sido determinada después del nacimiento y disminuye conforme avanza la edad, hasta mantenerse mas o menos constante una vez que ha alcanzado la madurez. El comportamiento que se observa de la concentración de los receptores para estradiol durante el desarrollo testicular, manifiesta un proceso inverso al patrón de desarrollo espermatogénico y esteroideogénico (Rivarola-1972). Mientras que la espermatogénesis y la esteroideogénesis se desarrollan paulatinamente hacia la producción de espermatozoides y la síntesis de testosterona, la concentración del receptor para estradiol disminuye notablemente.

La obtención de una elevada concentración de receptores para estradiol a temprana edad del desarrollo, puede ser el resultado de la presencia de una proteína plásmatica denominada globulina,

fijadora de estradiol y testosterona (Corvel-1971; Horst-1977; Nisula-1979) o de la AFP (Alphafetoprotein) que presenta una gran afinidad de fijación por el estradiol y la cual ha sido descrita en la rata en los primeros días de nacida (Abney-1979). Esta posibilidad es considerada debido a que no hayase sido removido totalmente la sangre del tejido testicular y en consecuencia las fracciones citosólicas pudiesen estar contaminadas con estas proteínas plasmáticas. Ambos componentes plasmáticos y el receptor para estradiol se han sugerido importantes en la regulación eficaz del desarrollo de los órganos sensibles a estradiol (Burke-1972).

La posibilidad de la disminución en la concentración de receptores para estradiol es acorde con la maduración testicular es considerada en este estudio. La producción de testosterona es elevada al momento del nacimiento (Makin-1975; Ketelslegers-1978) esta producción va disminuyendo después del nacimiento y durante las dos primeras semanas de vida (Resko-1968; Warren-1973). Después del período postnatal la producción de testosterona disminuye y permanece baja hasta la pubertad (niveles plasmáticos 0.441 0.057 ng/ml). En la pubertad se presenta un incremento rápido en la producción hasta alcanzar los niveles del adulto (6.7 ± 0.02 ng/ml de sangre), estos niveles permanecen dentro de estos límites hasta la vejez.

La elevada concentración de receptores para estradiol, permitiría que la testosterona permaneciese baja hasta la pubertad, este efecto no solo es el resultado del efecto del estradiol sobre la síntesis de testosterona, sino también a la acción que presenta en la inhibición de la concentración de receptores a LH (Hsueh-1978). Esta proposición es apoyada porque la concentración de receptores a LH es muy baja antes de la pubertad (Ketelslegers-1978).

Posteriormente, el incremento en la producción de testosterona en la pubertad y alcanzar los niveles adecuados para el desarrollo de la función testicular, se presenta un incremento en la actividad de receptores a LH, incrementando la actividad esteroideogénica testicular (Ketelslegers-1978). La disminución de receptores estrogénicos y por lo tanto el efecto del estradiol no tendría un efecto visible al incrementarse la concentración de receptores a LH, de acuerdo a la cantidad de receptores a LH necesaria para desencadenar la respuesta esteroideogénica en la célula de Leydig (Purvis-1981 a).

Así de esta manera, proponemos que la disminución de receptores para estradiol durante la maduración testicular, permite regular y no inhibir la síntesis de testosterona testicular. La regulación o modulación del estradiol en la síntesis de testos-

terona estaría influenciada por la concentración de receptores para estradiol y por la producción de estradiol testicular el cual ejerce un efecto de regulación y depleción de su propio receptor.

La variación tan marcada que se observa en la concentración del receptor para estradiol, ha sido postulado que sería el resultado de: a) una reducción en su biosíntesis o bien un aumento en su degradación; b) un incremento en su utilización, sin modificar su biosíntesis; c) un aumento en la concentración del complejo receptor-estradiol a expensas del receptor libre, cuya concentración disminuye como consecuencia de una constante o creciente producción de estradiol por el testículo; d) una dilución de la proteína receptora, al incrementarse la cantidad de proteínas durante el desarrollo testicular; y e) una combinación de cualquiera de los factores antes expuestos. (Cidlowski-1974, Alva-1977, Cidlowski-1978).

Los resultados obtenidos en este trabajo, en la determinación de los receptores para estradiol, durante el desarrollo testicular y en la de los pacientes infértiles, y de la determinación de hormonas esteroideas sanguíneas (Gráfica 3, 4 y 5) y del diagnóstico histológico en los pacientes infértiles han permitido a-

pozar que las variaciones del receptor puede ser debido a los factores antes expuestos y de otros factores que no han sido establecidos totalmente.

El diagnóstico histológico realizado de las biopsias testiculares, nos ha permitido establecer las características celulares del tejido intersticial (Células de Leydig) y de los túbulos seminíferos (Células de Sertoli y del epitelio seminífero). La presencia de las células de Leydig presentes en todas las biopsias testiculares, nos ha permitido correlacionar que son las estructuras responsables de la presencia de los receptores para estradiol en el testículo humano, ampliando y confirmando los estudios que se han realizado en el testículo de rata, comprobando que el receptor para estradiol se localiza únicamente en el tejido intersticial (Brinkman-1972, Mulder-1974, Kato-1974, de Boer-1976), específicamente en las células de Leydig (Dube-1979, Lin-1981, Purvis-1981 b).

Durante la maduración testicular, el testículo aumenta su peso conforme avanza la edad del organismo, hasta alcanzar la madurez sexual. El aumento en el peso testicular es debido principalmente al tejido conectivo y a la aparición del epitelio germinal, la contribución del tejido intersticial a este aumento es mínima y la de las células de Leydig y por lo tanto de sus componentes

específicos es prácticamente descartable. En base a esto, la disminución en la concentración de receptores para estradiol durante la maduración testicular, puede deberse a una dilución. Sin embargo, en los pacientes infértiles se muestra que la concentración de receptores para estradiol, no depende de la presencia o ausencia del epitelio germinal o de las células de Sertoli. Para el paciente No. 3 (Orquitis Post-viral) presenta ausencia del epitelio germinal y de las células de Sertoli, la concentración de receptores a estradiol es de 1.3 ng/g de proteína citosólica, nos permite deducir que no es un dilución del receptor lo que provocaría la disminución de los sitios de fijación. Si bien, los niveles de testosterona sanguínea se encontraron dentro del rango de concentración normal (6.48 ± 1.08 ng/ml vs 4-7 ng/ml de sangre), la concentración de estradiol sanguíneo se encontró elevada --- (266.40 ± 33.04 pg/ml vs 10-40 pg/ml de sangre) lo que permite apoyar que la disminución de receptores es debido a la formación del complejo receptor-estradiol. La progesterona sanguínea se encontraba sin una variación significativa (0.90 ± 0.2 ng/ml vs $0.25 - 0.80$ ng/ml de sangre).

No obstante que en el caso del paciente No. 5 (Síndrome de Klinefelter) las células de Sertoli y el epitelio germinal estaban presentes, la concentración de receptores fué también muy ba

ja (1.5 ng/g de proteína citosólica). Esta disminución de los sitios de fijación, podría ser el resultado de la elevada concentración de estradiol sanguíneo (82.09 pg/ml vs 10-40 pg/ml de sangre) y de una elevada concentración de progesterona (1.38 ± 0.42 ng/ml vs 0.25-0.80 ng/ml de sangre) que ha sido reportada que disminuye la concentración de receptores de estradiol (Cidlows ki-1978). Este caso es de particular interés, ya que la concentración de testosterona sanguínea se encuentra a niveles apenas detectables (0.8 ± 0.16 ng/ml vs 4-7 ng/ml de sangre).

La variación en la concentración de receptores para estradiol en los pacientes 2 y 6 (Síndrome Células de Sertoli) también es de particular interés. La concentración de receptores del paciente No. 2 es de una muy elevada concentración (52.1 ng/g de proteína citosólica). Aunque ambos pacientes presentan la concentración de testosterona y de progesterona dentro del rango normal (Paciente No. 2: 5.74 ± 0.76 ng/ml y de 0.95 ± 0.08 ng/ml; Paciente No. 6: 6.64 ± 0.82 ng/ml y de 0.71 ± 0.24 ng/ml vs 4-7 ng/ml y de 0.25 - 0.80 ng/ml de sangre de testosterona y de progesterona respectivamente en cada paciente). El estradiol se encontró elevado en ambos pacientes (Paciente No. 2: 155.75 ± 19.90 pg/ml; Paciente No. 6: 232.22 ± 56.49 pg/ml vs 10-40 pg/ml de sangre). Esta elevada concentración de estradiol podría sugerir la variación de receptores en el paciente No. 6, sin embargo, no hay una explica

ción satisfactoria con respecto al paciente No. 2, de su elevada concentración de receptores.

El paciente No. 3 (Criptorquidia Bilateral) resulta ser uno de los casos que más variaciones presenta con respecto a los pa rámetros que hemos considerado. La función testicular se encuen tra alterada, la espermatogénesis no se ha desarrollado total - mente, la concentración de receptores se puede considerar dentro del rango determinado en el testículo humano normal obtenido en este trabajo (5.9 ng/g vs $2.9 \pm 0.57 - 6.6 \pm 1.03 \text{ ng/g}$ de proteí na cit os ó l i c a). Los niveles de estradiol sanguíneo no presentan una elevación que pueda considerarse importante para que influ - ya en la concentración de receptores ($69.5 \pm 12.24 \text{ pg/ml}$ vs $10-40 \text{ pg/ml}$ de sangre). La testosterona se encuentra dentro del rango normal ($5.0 \pm 0.39 \text{ ng/ml}$ de sangre) y la progesterona no presen - ta una variación significativa con respecto a la concentración normal ($1.44 \pm 0.46 \text{ ng/ml}$ vs $0.25-0.30 \text{ ng/ml}$ de sangre).

En vista de los resultados obtenidos con respecto a las va - riaciones de receptores para estradiol en los pacientes infértil - es, proponemos que el mecanismo de acción del estradiol a tra - vés de su receptor puede ser debido a los factores descritos an - teriormente (Cidlowski-1974, de Boer-1976, Horwitz-1978, Cidlow - skí-1978, Moger-1978, Alva-1977) y de otros factores intracelula -

res específicos que merecen ser estudiados entre los que debemos considerar de gran importancia que la concentración de receptores depende del resultado dinámico entre la síntesis, degradación y activación del receptor hormonal.

Los trabajos de investigación que se han realizado a fin de conocer la presencia de receptores para estradiol en el testículo humano han sido muy limitados, y por lo tanto no se ha establecido claramente el mecanismo de acción del estradiol en la regulación y/o modulación de la testosterona, y por lo tanto en la fisiología testicular. El desarrollo de este trabajo de investigación ha permitido contribuir al conocimiento del mecanismo por el cual actúa el estradiol a través de su receptor en la fisiología testicular, apoyado en las determinaciones obtenidas de la presencia y las variaciones del receptor para estradiol durante el desarrollo testicular y de las variaciones del receptor que se presentó en los pacientes infértiles, no obstante el limitado número de muestras testiculares utilizadas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde se demostraron cambios en el número de sitios de fijación para estradiol durante la maduración testicular y en las biopsias de pacientes infértiles, y considerando que el receptor libre para estradiol puede ser el resultado de un equilibrio dinámico entre la

síntesis, degradación, utilización y reactivación del receptor hormonal, y de la cantidad de testosterona sintetizada y de sus metabolitos (progesterona y estradiol), podríamos considerarlos como puntos de apoyo en las fluctuaciones de los receptores para estradiol. Por lo que consideramos importante el desarrollo de nuevas investigaciones encaminadas a establecer cuales son los factores encargados de la regulación del receptor para estradiol en las células de Leydig, y su relación que se establece con otras hormonas testiculares hipofisiarias.

Consideramos también que en base a los resultados y observaciones realizadas en las diferentes disfunciones testiculares, que no es posible dar una respuesta satisfactoria a las variaciones que presenta el receptor para estradiol, por lo que es importante el desarrollo de nuevas investigaciones con el objetivo de dilucidar la relación existente entre las hormonas gonadotróficas sobre las diferentes líneas celulares testiculares y de la acción que presentan estas hormonas gonadotróficas para la síntesis y se creación de las hormonas testiculares, y de la función que lleva a cabo en la fisiología del testículo humano normal y en las diferentes disfunciones testiculares.

VI.- CONCLUSIONES

1.- La presencia del receptor citoplásmico para estradiol estuvo presente en todas las muestras testiculares estudiadas.

2.- La concentración de receptores para estradiol en el testículo humano normal de diferentes edades, presenta una elevada concentración después del nacimiento, la cual disminuye drásticamente del primer al quinto año de edad, y posteriormente se mantiene dentro de una concentración más o menos constante.

3.- La presencia de receptores para estradiol determinada en las biopsias testiculares de los pacientes infértiles, muestran una gran variación en la concentración de paciente a paciente y de la concentración determinada en el testículo normal.

4.- El diagnóstico histológico de las biopsias testiculares de los pacientes infértiles, ha permitido confirmar que las células de Leydig son un prerrequisito indispensable para la presencia de receptores para estradiol testiculares.

VII.- ANEXO

1.- Material

El estradiol tritiado ($^3\text{H}-\text{E}_2$) fue obtenido de Nuclear Chicago, Chicago Illinois; la actividad especifica de $^3\text{H} - \text{E}_2$ fue de 49.3 Curies/milimola.

El estradiol no marcado (E_2^0) fue obtenido de Cal. Biochem, La Jolla California, USA.

El PPO (2.5-Difeniloxazol, $\text{C}_{15} \text{H}_{11} \text{NO}$), el POPCP (2.2'-p-fenilen - cis (5-feniloxazo) $\text{C}_{24} \text{H}_{18} \text{N}_2 \text{O}_2$) y la hidroxilapatita ($3 \text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2 : \text{Ca} (\text{OH})_2$) fueron obtenidos de Sigma de St. Louis Missouri.

El etanol y el tolueno fueron obtenidos de Sigma de México, estos solventes fueron purificados por destilación antes de su utilización.

2.- Lavado y Preparación de la hidroxilapatita (HAP).

La suspensión de la hidroxilapatita se encuentra disuelta en amortiguador a un pH de 6.2 . Antes de su utilización la hidroxilapatita es lavada por centrifugación varias veces con

amortiguador TRIS-HCl (TRIS (Hydroxymethyl) Aminomethano. Sigma de St. Louis Missouri) el cual es ajustado a un pH de 7.3, utilizando HCl 0.1 N. El amortiguador sobrenadante del frasco de la hidroxilapatita se descarta, y la hidroxilapatita es resuspendida con amortiguador TRIS-HCl, la suspensión es agitada con magneto durante una hora a temperatura de 4° C. Después de la agitación es centrifugada (International Centrifuge) a 4° C, la velocidad de centrifugación se va aumentando gradualmente, para permitir un empaquetamiento uniforme, hasta que la velocidad se estabiliza a 2000 rpm, a ésta velocidad se centrifuga durante 10 minutos. El sobrenadante es descartado. La hidroxilapatita precipitada es resuspendida en amortiguador TRIS-HCl, agitando y centrifugando nuevamente, se descarta. Se realizan los lavados que sean necesarios, hasta ajustar el pH de la suspensión de la hidroxilapatita se mantenga constante en un valor de 7.3. El pH de la solución se toma en la suspensión agitada y posteriormente en el sobrenadante. Cuando el pH de la suspensión de la hidroxilapatita es resuspendido en amortiguador TRIS-HCl, se agita durante 20 minutos, es decantada en una probeta graduada descartando el amortiguador sobrenadante. Para su utilización se prepara una solución al 60 %.

3.- Determinación de Proteínas por el Método de Lowry.

Todas las proteínas reaccionan con la solución alcalina de Tartrato de Cobre, formando un complejo cúprico-aminoacídico. La adición a éstos complejos, del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico tungstico), produce una coloración azul intensa como consecuencia de la reducción del molibdato a óxido de molibdeno por acción de los radicales de tiro sina y de los complejos cúprico-aminoacídico. La intensidad de la coloración producida, cumple la Ley de Lambert y Beer.

Reactivos

A.- Solución Alcalina de Tartrato.

- Carbonato de Sodio Anhidro (Na_2CO_3) -----2%
- Tartrato de Sodio y Potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) -----0.05%
- Disueltos en Hidróxido de Sodio (NaOH) -----0.1 N

B.- Solución Cúprica.

- Sulfato Cúprico (CuSO_4) -----0.1%
- Disuelto en Agua (H_2O) ----- cbp

C.- Reactivo Cupricoalcalino de trabajo.

- 45 ml del Reactivo A + 5 ml de reactivo B.

D.- Reactivo de Folin-Ciocalteu.

Este reactivo es de laboriosa preparación ya que requiere 10 hrs de reflujo, una posterior valoración y neutralización por lo que se prefiere adquirirlo en casa comerciales, no siendo elevado su precio y de magnífica calidad y estabilidad.

E.- Solución Patrón de Proteínas.

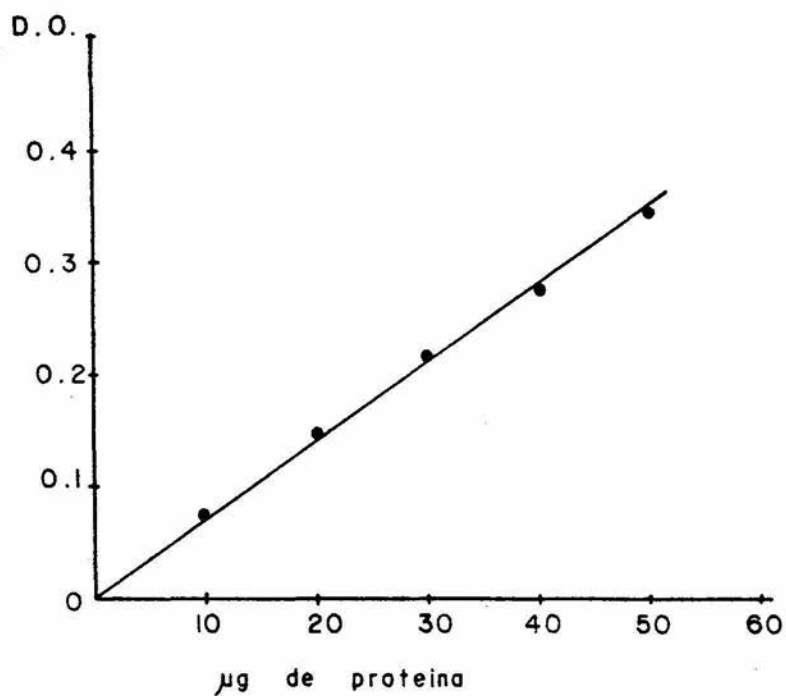
- Albúmina bovina sérica (ABS) 1 mg/ml ----- 0.1 %
- Disuelta en Agua (H₂O) ----- cbp

Procedimiento

- 1.- Se prepara una solución standard de proteína de albúmina bovina sérica (ABS) 1 mg/ml, de la cual se tomarán alicuotas adecuadas para obtener 10, 20, 30, 40 y 50 ug de proteína por cada sistema.
- 2.- Se agregó el volumen de agua destilada necesaria para obtener un volumen de 200 ul.

- 3.- Se les añade 1 ml de la solución C a cada uno de los tubos.
- 4.- Se les adiciona 0.1 ml de la solución D.
- 5.- Se agitan vigorosamente todos los tubos.
- 6.- La preparación del tubo testigo, contiene los reactivos C y D, se sustituye la alicuota de la solución de proteínas por agua destilada.
- 7.- Todos los tubos se dejan reposar 30 minutos.
- 8.- Se preparan los tubos con las soluciones problemas, a las que se les adiciona 50 y 100 μ l de citosol y 1 ml del reactivo y 0.1 ml del reactivo D. Se les adiciona agua destilada hasta igualar el volumen de los tubos de la curva estandar. Se agitan vigorosamente (Vortex Gene Mixer. Scientific Products) y se dejan reposar 30 minutos.
- 9.- Se toman las lecturas de todos los tubos en un espectrofotómetro (UNICAM. SP 800 B ULTRAVIOLET SPECTROPHOTOMETER. HARRY MAZAL, USA) a una longitud de onda de 550 nm en una celdilla de 5 mm de diámetro interno.
- 10.- Las lecturas de la curva estandar se grafican (como se observa en la gráfica No. A) y las lecturas de las soluciones problemas se interpolan, obteniendo así las concentraciones de proteínas.

GRAFICA A



CURVA ESTANDAR DE PROTEINAS. METODO DE LOWRY.

4.- Determinación de Estradiol.

Después de la adición de [2, 4, 6, 7 - ^3H]Oestradiol - 17β (1×10^4 dpm, actividad específica 100 Ci/mmol), a las muestras de plasma. El plasma fue extraído tres veces con dos volúmenes de éter. Los extractos combinados fueron elevados a sequedad con nitrógeno a 45°C y aplicado a columnas de microcromatografía con Sephadex LH-20, las cuales fueron empaquetadas en una pipeta Pasteur. Las columnas fueron prelavadas con 5 ml de Tolueno:Methanol (50:50 v/v). Seguida por el lavado de 7 ml de Tolueno:Methanol (90:10 v/v).

Después de la aplicación de el extracto del plasma a la columna, la fracción conteniendo oestrone fue eluida con 2.6 ml de Tolueno:Methanol (9:1 v/v). La fracción de 17β -estradiol fue eluida subsecuentemente con 3 ml de la misma mezcla del solvente y llevada a sequedad. El antisuero (200 ul de una dilución 1:21000) fue adicionada a los residuos secos. Después de mezclar en vortex la solución fue mantenida durante toda la noche a 4°C y 50 ul fueron tomados para la estimación de reconocimiento. Una alícuota de 100 ul fue transferida a otro tubo

y 500 ul de la suspensión de carbón cubierto con Dextrán fue adicionado. Después de mezclar y colocarlo a 4° C durante 10 minutos, los tubos fueron centrifugados a 4° C (1200 g X 15 minutos). Una alícuota de 500 u de el sobrenadante fue contada para estimar la cantidad de radioactividad unida al anticuerpo.

La masa del estradiol 17 β fue calculada de el porcentaje de radioactividad unida por la comparación con la curva estándar preparada igualmente. La cantidad de Oestradiol 17 - β en las muestras originales, fueron calculadas después de la corrección, por la recuperación y de la masa del oestradiol radioactivo adicionado.

5.- Determinación de Testosterona.

Aproximadamente 500 cpm (0.05 μg) de ^3H - Testosterone en 0.2 ml de ethanol es adicionado a la muestra y contada en un vial, el cual es utilizado como un indicador estandard. La testosterona del plasma es extraída dos veces con 3 volúmenes de Cloruro de metileno.

El Cloruro de metileno es lavado una vez con 2 ml de 1 N NaOH, dos veces con 5 ml de H_2O , y llevada a sequedad. Los extractos secos son tomados cuantitativamente y transferidos con múltiples lavados en cromatografía con methanol. La testosterona estandard (10 μg) es colocada en una cromatografía paralela. Las muestras y la testosterona estandard son corridas por tres horas después de adicionar la fase móvil. Las muestras corridas, son eluidas con 10 ml de etanol y llevadas a sequedad. Las muestras son redisueltas en 5 ml de methanol. Una alícuota de aproximadamente el 20 % es tomada para ser contada y calcular la pérdida durante la extracción y la cromatografía en papel.

La muestra restante (4/5), es llevada a sequedad, resuspendida e incubada a temperatura ambiente con 1 ml de la dilu -

ción de plasma de mujer fecundada libre de albúmina, conteniéndolo ^3H -testosterona por 15 minutos. Una columna de Sephadex de 6 cm es preparada y 1 ml de la muestra es transferida a la columna cuando el amortiguador alcanza la capa de Sephadex, 0.5 ml de amortiguador es adicionado a la muestra y subsecuentemente a la columna. Esto es seguido por adición de 1 ml y 2 ml de amortiguador o solución salina. La elusión de 1.5 - 4.5 ml, representando la fracción unida de muestras o estandar, es extraída dos veces con 3 volúmenes de Cloruro de metileno. Los extractos son transferidos a 20 ml de estandar contados en viales y llevados a sequedad en vacío y la ^3H radioactividad es contada por un espectómetro de centelleo. La curva estandar es realizada por la incubación de 0 - 8 μg de estandar con el plasma - amortiguador- ^3H - testosterona mezclada y corridos los estandar a través del Sephadex colocadas al mismo tiempo que las muestras problema.

La cantidad de testosterona con el plasma se obtiene después de los cálculos y las correcciones de la curva estandar.

6.- Determinación de Progesterona.

La progesterona fue estimada por radioinmuno-ensayo utilizando un anticuerpo contra un complejo 11α -hydroxyprogesterona-hemisuccinato-BSA (Albúmina Bovina Serica). El método consiste de las siguientes etapas: Después de la adición de $[1,2,6,7-^3H]$ Progesterona (10,000 DPM, actividad específica 107 Ci/mMol) a el plasma, fue extraído dos veces con 1 ml de n - Hexano.

Los extractos combinados fueron a sequedad a $45^{\circ} C$ con nitrógeno y 200 ul de anticuerpo en PBS-Buffer (1:15000) fue adicionado. Después de la incubación por 2 ó 17 hrs a $4^{\circ} C$, 50 ul fueron tomados para la estimación de reconocimiento. A los 150 ul restantes, se les adicionó 500 ul de carbón cubierto con dextrán en PBS-Buffer. Los tubos fueron mezclados e incubados a $4^{\circ} C$ por 15 minutos. El porcentaje de radioactividad unida al anticuerpo fue calculada después de contados los 500 ul del sobrenadante, después de la centrifugación (1200 g X 10 min). La concentración de progesterona fue leída de la curva estándar y correlacionada para recuperar, la cantidad de progesterona radioactiva adedida y el volumen extraído.

7.- Técnica Histológica.

La Histología y por lo tanto el diagnóstico histopatológico, deben su existencia y progresos a técnicas que permiten el estudio de los tejidos al microscopio.

La técnica histológica permite el estudio de una cara muy delgada de tejido, que al ser observada al microscopio, conserva la forma más exacta posible de la estructura de las células y los tejidos, es decir, su agrupación y disposición recíprocas.

Es importante para hacer un buen estudio histológico la obtención de la muestra de tejido, la cual debe ser tratada con máximo cuidado, obtener los bloques de tejido rápidamente y con gran precaución, ya que éstos empiezan a sufrir cambios degenerativos después de haber sido obtenidos, éstos cambios post mortem se interrumpen cuando el bloque de tejido se introduce en un fijador, el bloque no ha de tener más de unos pocos milímetros de espesor para que el fijador pueda penetrar rápida y completamente en él. La fijación está destinada a inmovilizar las estructuras celulares y tisulares en un estado lo más cercano al estado vivo, de la fijación depende una mejor obtención en las coloraciones celulares, para la interpretación histológica y citológica. Un buen fijador debe tener una penetración rápida y homogénea.

genea, no producir retracción del tejido, revelar las organizaciones intracelulares y las estructuras ocultas, evitar la desaparición de las formaciones solubles, tales como el glucógeno, cuidar la actividad de ciertas enzimas y permitir, los elementos visibles con los colorantes. Aunque la fijación de un tejido permite su endurecimiento, no lo permite lo suficiente para realizar cortes en rebanadas muy finas, para un examen es necesario infiltrar el tejido, después de la fijación con una solución de gelatina, parafina, celoidina u otro material plástico, que luego se solidifica de manera que posteriormente pueda cortarse conjuntamente el tejido y la matriz de inclusión. Si se utiliza parafina o celoidina debe deshidratarse el tejido previamente con solventes orgánicos, la deshidratación se realiza suprimiendo el agua del bloque del tejido, sumergiéndola en alcohol en grado creciente hasta que ya no contenga agua, solamente alcohol absoluto. De este proceso, se efectúa la aclaración, que se realiza por ejemplo con xilol, que es soluble en cera y alcohol, por lo tanto, después de salir del alcohol absoluto, se sumerge en xilol, hasta que el alcohol haya sido substituido por el xilol. Posteriormente se realiza la inclusión, colocando el bloque de tejido en parafina fundida caliente y se deja hasta que todo el xilol sea substituido por la parafina disuelta. La parafina se deja endurecer y se suprime el exceso cortándolo.

El bloque infiltrado de parafina se monta en un microtomo, con el cual pueden obtenerse cortes con un espesor de 3 ó 4 μ m.

Los cortes obtenidos de ésta manera pueden teñirse, mediante alguna de las múltiples y variadas combinaciones de colorantes que tiñen los diversos constituyentes histológicos. Aunque para teñir cortes obtenidos con la técnica de parafina, se debe de suprimir la parafina, ya que la mayoría de los colorantes actúan sólo en medio acuoso. Para esto, se coloca cada corte plano sobre un portaobjetos, al cual se adhiere haciendo que dicho portaobjetos sea pegajoso mojándolo con un material que no interfiera con la tinción. El portaobjetos, con el corte de tejido adherido, se introduce en xilol para suprimir la parafina, luego en alcohol absoluto para suprimir el xilol, después en alcoholes cada vez menos concentrados y finalmente, en agua. Hecho esto puede secarse, y el corte de tejido quedará sobre el portaobjetos y podrá teñirse con colorantes en solución acuosa. Una vez teñido el corte se pasa a través de alcoholes de concentración creciente hasta el alcohol absoluto, luego en xilol. Posteriormente se realiza el montaje en un medio soluble de xilol y que tenga un índice de refracción adecuada. Finalmente se coloca un cubreobjetos encima del corte, se comprime firmemente, y así se obtiene un tipo bastante permanente del preparado.

El método de tinción más comúnmente utilizado, es el de hematoxilina-eosina. La hematoxilina es un producto natural para que actúe como colorante debe oxidarse hasta constituir una sustancia denominada hemateína. La hematoxilina proporciona un color azul o púrpura oscuro a las estructuras nucleares. La eosina es un colorante sintético que da color rosa o rojo a los constituyentes tisulares con los cuales se combina.

Reactivos : Soluciones

Hematoxilina Harris

Cristales de hematoxilina -----	5 g
Alcohol 95 % -----	50 cc
Alumbre de Amonio ó Potasio -----	100 g
Agua destilada -----	1000 cc
Oxido de mercurio -----	2.5 g

Preparación

Disolver la hematoxilina en el alcohol, el alumbre en el agua con ayuda de calor. Mezclar las dos soluciones. Llevar la mezcla a hervir rápidamente como sea posible y entonces remover del calentado el óxido de mercurio. Recalentar la solución hasta presentar un color púrpura oscuro, aproximadamente un minuto y

rápida^{mente} remover el contenido de la flama y sumergirlo en una vasija con agua fría. La solución esta lista para utilizarse cuando se enfría. Añadir 2 - 4 cc de ácido acético glacial a 100 cc de la solución si se desea.

Alcohol Acido

Alcohol 70% ----- 1000 cc
Acido hidroclórico concentrado ----- 10 cc

Agua de Amonio

Agua ----- 1000 cc
Agua de amonio concentrada ----- 2 a 3 cc

Carbonato de Litio Saturado

Carbonato de Litio ----- 1 g
Agua destilada ----- 100 cc

Solución de Eosina Alcohólica

Eosina Y, soluble en agua ----- 2 g
Agua destilada ----- 150 cc
Alcohol 95 % ----- 640 cc

Solución de Lugol

Yoduro de Potasio ----- 2 g
Cristales de Yodo ----- 1 g
Agua destilada ----- 100 cc

Solución de Alcohol Yodado

Cristales de Yodo ----- 1 g
Alcohol 95 % ----- 100 cc

Solución de Tiosulfato de Sodio

Tiosulfato de Sodio ----- 5 g
Agua destilada ----- 100 cc

Procedimiento de Tinción

- 1.- Xilol, alcohol absoluto, alcohol 95 %.
- 2.- Tratar las secciones fijadas con solución de lugol o solución alcohólica yodada al 1% de 10 - 15 minutos. Lavar con agua. Tratar con tiosulfato de sodio al 5% durante 5 minutos. Lavar muy bien con agua.
- 3.- Durante 15 minutos teñir con hematoxilina.
- 4.- Lavar con agua.

- 5.- Diferenciarla con alcohol ácido, con 3 a 10 inmersiones rápidas. Checar la diferenciación con el microscopio, los núcleos pueden verse distintos y el fondo con mucha luz o poco color.
- 6.- Lavar con agua muy breve.
- 7.- Sumergirlo en agua de amonio o carbonato de litio saturado hasta que las secciones presenten azul claro.
- 8.- Lavar con agua circulante por 10 a 20 minutos.
- 9.- Colorear con eosina de 15 segundos a 2 minutos.
- 10.- Pasarle a través de alcohol al 95 %.
- 11.- Alcohol absoluto. Hacer dos cambios.
- 12.- Xilol, dos cambios.
- 13.- Montar.

Xilol 2 min	→	Xilol 2 min	→	Alcohol 100 % 1 min	→	Alcohol 100 % 1 min	→	Alcohol 95 % 1 min	→
Yodo 1 min	→	Agua 4 Inmersio nes	→	Solución de Tiosulfato de Sódio 3 min	→	Agua 4 Inmersio nes	→	Hematoxilina 15 min	→
Agua 4 Inmersio nes	→	Alcohol Acido 1% 3-10 Imer siones	→	Agua 4 Inmersio nes	→	Solución de Agua de Amonio 6 Inmersiones	→	Agua Destilada 15 min	→
Eosina 15 seg a 2 min	→	Alcohol 95 % 1 min	→	Alcohol 95 % 1 min	→	Alcohol 100 % 1 min	→	Alcohol 100 % 1 min	→
Xilol 2 min	→	Xilol 2 min	→	Xilol 2 min					

LAVADOS Y FIJACION DE LAS MUESTRAS HISTOLOGICAS

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abney, O.T. (1976): A cytoplasmic estradiol receptor in rat testicular tissue. Endocrinology. 99: 555-556.
- 2.- Abney, O.T. and Melner, M. H. (1979): Characterization of estrogen binding in the developing rat testis, ontogeny of the testicular cytoplasmic estrogen receptor. Steroids. 34:413-427.
- 3.- Abramowitz, J.; Iyengar, R. and Birbaumer, L. (1979): Guanyl nucleotide regulation of hormonally-responsive adenylyl cyclase. Mol. Cell. Endocrinol. 16:129-146.
- 4.- Alva, S. E. (1977): Regulación de la espermatocitogénesis por el estradiol. Tesis. Licenciatura IPN. Mexico.
- 5.- Alva, E.; Samayoa, M. S.; Canchola, E. M. y Sosa, A. (1980): Regulación de la función testicular por el estradiol. Patrón de desarrollo y variaciones postcriptorquia del receptor para estradiol. Acta Cient. Venezolana. 31:287-290.
- 6.- Anderson, H. ; Andreassen, M. and Quaado, F. (1955): Testicular biopsies in cryptorchidism. Acta Endocrinol. 18: 567

- 7.- de la Balze, F.; Mancini, R.; Burg, G. and Irazn, J. (1954): Morphological and histochemical changes produced by estrogens on adult human testes. Fertil Steril. 5: 421
- 8.- Bair, D.; Galbrith, A.; Fraser, I. and Newsam, J. (1973): The concentration of estrone and estradiol-17 β in spermatic venous blood in man. J. Endocrinol. 57: 285-288.
- 9.- Bortake, A.; Williams, I. and Dalterio, S. (1977): Effect of estrogen on testosterone production in vitro. Biol. Reprod. 17: 645-649.
- 10.- de Boer, W.; Mulder, E. and van der Molen, H. (1976): Effect of oestradiol-17 β , hypophysectomy and age on cytoplasmic oestradiol-17 β receptor sites in rat testis interstitial tissue. J. Endocrinol. 70: 397-407.
- 11.- de Boer, W.; de Vries, J.; Mulder, E. and van der Molen, J. (1977)a : Kinetics of in vitro binding of estradiol in subcellular fractions of testicular and uterine tissue. Characterization of testicular binding in testicular nuclei. J. Steroid Biochemistry. 9: 859-865.

12.- de Boer, W.; de Vries, J.; Mulder, E. and van de Molen, J. (1977)^b : Comparative study of nuclear binding sites for oestradiol in rat testicular and uterine tissue. Biochem. Journal. 162: 511-522.

13.- Brinkmann, A.; Mulder, E.; Lanens-Stahlhofen, G.; Mechulsen, M. and van der Molen, H. (1972): An oestradiol receptor in rat testis interstitial tissue. End. Letters. 26: 301-305.

14.- Brinkmann, A.; Leeborg, F.; Rosdahl, E.; de Jong, F. and van der Molen, J. (1970): A specific action of oestradiol on enzymes involved in testicular steroidogenesis. Phys. Reprod. 25: 301-319.

15.- Burke, C. and Anderson, D. (1972): Sex-hormone-binding is an oestrogen amplifier. Nature. 232: 38-39.

16.- Cidlowski, J. and Muldown, T. (1974): Estrogenic regulation of cytoplasmic receptor concentrations in estrogen responsive tissues of the rat. Endocrinology. 95: 162-169.

17.- Cidlowski, J. and Muldown, T. (1972): The dynamics of intracellular estrogen receptors regulation as influenced by 17 β -Estradiol. Phys. Reprod. 19: 234-246.

- 18.- Cigorra, S.; Sorrell, S.; Patar, J.; Catt, K. and Dufau, M. (1980): Estrogen dependence of a gonadotropin-induced steroidogenic lesion in rat testicular Leydig cells. *J. Clin. Invest.* **65**: 699-705.
- 19.- Clermont, Y. (1963): The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Ann. J. Anat.* **112**: 55-.
- 20.- Clermont, Y. (1972): Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatoconial year. *Physiol. Rev.* **52**: 109-236.
- 21.- Corvel, P. Christlock, A. Richard, D. and Barlin, G. (1971): Physical properties and binding capacity of testosterone-estradiol binding in human plasma determined by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **246**: 3415-3417.
- 22.- Chan, L. and O'Malley, B. (1976): Mechanism of action of the sex steroids hormones. *N. England J. Med.* **294**: 1322-1329.
- 23.- Cardbury, M.; Tcholakian, R. and Steinberger, E. (1974): An unsuspected effect of norestradiol-17B on luteinizing hormone and testosterone. *J. Endocrinol.* **60**: 575-

- 24.- Dhury, M.; Tcholakian, R. and Steinberger, E. (1980):
Reevaluation of estradiol benzoate on the production of testos-
terone and luteinizing hormone in the rat. Endocrinology. 105(4)
:1711-1716
- 25.- Dickson, P. and Clark, C. (1981): Estrogen receptor in the
male. Archives of Andrology. 2: 205-217.
- 26.- Dole, J.; Tremblay, R.; Francoise, G.; Lesage, E. and Trem-
blay, M. (1977): Estrogenic receptor levels in spontaneous Leydig
cells tumors of Fischer rats. J. Steroid Biochem. 13: 573-576.
- 27.- Eskin, T.; Best-Felgine, M. and Descaze, R. (1973): A
rapid assay for binding estradiol to vitrine progesterone. Anal.
Biochem. 57: 284-287.
- 28.- Gendel, J. and Gannon, F. (1976): Current models of ste-
roid hormone action: A critique. En Ann. Rev. of Physiology. E.
Schubert, R. R. ; Sorensonstein and I. S. Edelman. Ed. V. 38
Palo Alto Califor. USA. pp 425-473
- 29.- Hales, T. S. (1960): Water Reabsorption. P. H. Gardner
I. New Publishers. pp 15-22

30.- Heller, C. (1950): Improvement in spermatogenesis following depression of the human testis with testosterone. Fertil Steril. 1: 415-

31.- Horwitz, B. and Mc Guirre, W. (1978): Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. J. Biol. Chem. 253: 2221-2228.

32.- Hertz, H.; Bartsch,; Dirks-Thedens, I. (1977): Plasma testosterone, sex hormone binding, globulin binding of testosterone and 5 α -dehydrotestosterone in prepuberal pubertal and adult males. J. Clin. Endocrinol. Metab. 43: 502-

33.- Hudson, B.; Dulmanis, A.; Coghlan, J. and Wintour, M. (1966): The measurement of androgen production in normal subjects. Australian Ann. Med. 15: 236-

34.- Huggins, C.; Scott, R.; Hodges, C. (1941): Studies on prostatic cancer, effects on fever of desoxycorticosterone and of estrogen on clinical patients with metastatic carcinoma of prostate. J. Urol. 46: 997-

- 35.- Hunt, M.; Sakena, S. and Chang, M. (1979): Effect of estradiol-17 β on reproduction in adult male rats. Archives of Andrology. 2: 129-133 .
- 36.- Hausb, A.; Dufau, M. and Catt, K. (1978): Direct inhibitory effect of estrogen on Leydig cell function of hypophysectomized rats. Endocrinology. 101: 1096-1102.
- 37.- Jensen, E.; Suzuki, T.; Kawashima, T.; Stumpf, W.; Jungblut, P. and DeSombre, E. (1982): A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. Biochemistry. 59: 612-618.
- 38.- Jensen, E. and DeSombre, E. (1973): Estrogens- receptor interactions. Science. 182: 219-222.
- 39.- Johnson, A.; Gomez, W. and Vander-Mark, N. (1970): The Testis. Academic Press. New York and London. Vol. I. Development, anatomy and physiology. 339-574 pp.
- 40.- Johnson, A. and Gomez, W. (1977): The Testis. Academic Press. New York. Vol. IV. Advances in Physiology, Biochemistry and Function. 1-394 pp.

- 41.- Jones, M.; Fang, S.; Sondav, L. and Rosenfield, R. (1978):
: Direct inhibition of Leydig cell function by estradiol . J.
Clin. Endocrinol. Metab. 47: 1368-1373.
- 42.- de Jong, F.; Vilenbroex, J. and van der Molen, H. (1975):
Oestradiol-17 β , testosterone and gonadotrophins in oestradiol-
17 β treated intact adult male rats . J. Endocrinol. 65: 281-282.
- 43.- Kalla, M.; Nisula, B.; Menard, R. and Loriaux, D. (1970):
The effect of estradiol on testicular testosterone biosynthesis.
Endocrinology. 106: 35-39.
- 44.- Kato, J.; Chuchi, T.; Okinaga, S. and Itoy, Y. (1974) :
Estradiol receptor in rat testis. Endocrinology. 94: 902-907.
- 45.- Katzenellenberg, J.; Jansson, H. and Carlou, K. (1973):
Studies on the uterine cytoplasmic estrogen binding protein.
Thermal stability and ligand dissociation rate assay of empty
and filled sites by exchange. Biochemistry. 12: 4092-4099.
- 46.- Kelch, R.; Jenner, M.; Weinstein, R.; Kaplan, S. and Grum
bach, M. (1972): Estradiol and testosterone secretion by human,
simian and canine testis in males with hypogonadism and in male
pseudohermaphrodites with feminizing testes syndrome. J. Clin.
Endocrinol. 52: 824-

- 47.- Ketelslegers, J.; Hetzel, W.; Shernis, R. and Catt, K. (1978): Developmental changes in testicular gonadotropin receptors: Plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat. Endocrinology. 103: 212-
- 48.- Kincl, A.; Folch, A. and Herrera, L. (1963): Effect of estradiol benzoate treatment in newborn male rats. Endocrinology. 72: 966-968
- 49.- Kincl, A.; Mizuol, M. and Folch, A. (1964): Recovery of gonadal function in male rats treated neonatally with 17 β -Estradiol benzoate. Acta Endocrinol. 47: 200-204.
- 50.- Lin, T.; Chen, G.; Murose, E.; Osterman, J. and Mankin, H. (1961): The organ Leydig cell VII. Cytoplasmic estradiol receptors. Steroids. 12: 407-417.
- 51.- Longcope, C.; Widrick, W. and Sawin, C. (1972): The secretion of estrone and estradiol-17 β by human testis. Steroids. 20: 432-
- 52.- Lowry, O.; Rosenbrough, N.; Farr, A. and Randall, R. (1951): Protein measurement with Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

- 53.- Makin, H. L. (1975): Biochemistry of steroid hormones. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London. Edinburgh. Melbourne. pp 77-104.
- 54.- Mancini, R. E. (1965): Cryptorchid and scrotal human testis. I. Cytological, cytochemical and quantitative studies. J. Clin. Endocrinol. 25: 927
- 55.- Mann, Thaddeus and Lutwak-Mann, C. (1981): Male reproductive function and semen. Springer-Verlag eds. Berlin Heidelberg. New York. pp 4-170
- 56.- Meistrich, M.; Hughes, T.; Anibus, E. and Bruce, W. (1977) : Spermatogenesis in hybrid mice treated with oestrogen and testosterone. J. Reprod. Fertil. 50: 75-81.
- 57.- Melner, H. and Abney, T. (1978): The direct effect of 17 β -Estradiol on LH-stimulated testosterone production in hypohysextonized rats. J. Steroid. Biochemistry. 13: 203-210.
- 58.- Melner, H. and Abney, T. (1980): Interactions of antiestrogens receptor: Effects on cell function. Program of the U.S. Endocrine Society 62nd Annual Meeting. Abst. p^o 234.

59.- Moger, W. (1980): Temporal changes in testicular estradiol and testosterone concentrations, cytoplasmic estradiol binding and desensitization after human chorionic gonadotropin administration to the immature rats. Endocrinology. 106: 496-503.

60.- Mulder, E.; Brinkman, A.; Lemens-Stahlhofen, G. and van der Molen, H. (1973): Binding of estradiol by the nuclear fractions of rat testis interstitial tissue. Febs Letters. 31: 131-136.

61.- Murphy, B.; Cameron, E.; Hight, I. and Walsh, C. (1980): Estrogen receptors in the human prostate, seminal vesicle, epididymis, testis and genital skin: A marker for estrogen responsive tissue. J. Endocrinol. Metab. 10: 878-883.

62.- Mizule, E.; Durr, J. (1979): Measurement of testosterone-estradiol binding globulin and albumin in individual serum samples. Standsch. 24: 771-791.

63.- O'Riordan, J. L. (1979): Recent advances in endocrinology and metabolism. Eds. Churchill Livingstone. Edinburgh, London and New York. number one. pp 111-135.

64.- Paulsen, C. A. (1967): The study of irradiation effects on the human testis; Including histologic, chromosomal and hormonal aspects. Nuclear Science. 21: 402-

65.- Payne, A.; Kelch, R.; Musech, S. and Halpern, M. (1971): Intratesticular site of aromatization in the human. J. Clin. Endocrinol. Metab. 42: 1081-

66.- Purvis, J.; Sanick, J.; Lotif, S.; Rosenbaum, J.; Holmgren, J. and Menad, R. (1973): Life time of microsomal cytochrome P₄₅₀ and steroidogenic enzymes in rat testis as influenced by human chorionic gonadotropin. Arch. Biochem. Biophys. 130: 39-49.

67.- Purvis, K.; Hansson, V. (1981)a : Hormonal regulation of spermatogenesis: Regulation of target cell response. Int. J. Androl. Suppl. 3: 81-143.

68.- Purvis, K.; Cusan, L. and Hansson, V. (1981)b : Regulation of steroidogenesis and steroid action in Leydig cells. J. Steroid. Biochem. 15: 77-86.

- 69.- Ramaley, J. A. (1979): Development of gonadotropin regulation in the prepuberal mammal. Biol. of Reproduction. 20: 1-31
- 70.- Raske, J.; Feder, H. and Coy, P. (1968): Androgen concentration in plasma and testis of developing rats. J. Endocrinol. 40: 485-491.
- 71.- Rivarola, M.; Podesta, E. and Chemes, N. (1972): In vitro testosterone metabolism by rat seminiferous tubules at different stages of development: Formation of Δ^4 -androstenediol at meiosis. Endocrinologia. 21: 537-
- 72.- Roberts, S.; Ewing, L.; Irby, D. and Desferdins, C. (1977): Interaction of testosterone and estradiol-17 β on the reproductive tract of the male rat. Biol. of Reproduction. 21: 455-463.
- 73.- Sairon, H. and Berman, M. (1979): Direct inhibitory effects of estrogens on rat Leydig cell in vitro. Steroids. 33: 233-242.
- 74.- Samuels, L.; Short, J. and Husbey, R. (1974): The effect of diethylstilbestrol on testicular 17 β -hydroxylase and 17-ketolase activities in bold mice. Acta Endocrinol.(Kbh) 45: 477-

- 75.- Samuels, L.; Uchikawa, T.; Zain-UI-Abedin, M. and Huseby, R. (1969): Effects of diethylstilbestrol on enzymes of cricetid mouse testis of balbc mice. Endocrinology. 85: 9-
- 76.- Sawin, T.; Ryan, J.; Loggans, C. and Fisher, E. (1961): Effects of chorionic administration of oestrogen, androgen or both serum levels of gonadotropin in adult men. J. Clin. Endocrinol. Metab. 21: 911-915.
- 77.- Sharnis, J. and Loriaux, D. (1973): Studies on the role of steroids in the feedback control of FSH concentrations in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 37: 896-897.
- 78.- Sica, V.; Nola, E. and Patrick, K. (1973): Purification of oestradiol receptors by affinity chromatography. Nature (New Biol). 244: 76-79.
- 79.- Siniffen, R. C. (1952): Histology of the normal and abnormal testis at puberty. Ann. N. Y. Acad. Sci. 55: 609-
- 80.- Slymsla, C. and Mandy, S. (1972): Interactions of 6,7,17-³H-¹⁹²B-Estradiol with the mouse lactating mammary tissue in vivo and in vitro. Endocrinology. 91: 861-867.

- 81.- Spilman, Ch.; Lobl, T. and Kirton, K. (1975): Regulatory mechanism of male reproductive physiology. Ed. Excerpta Medica/American Elsevier. Excerpta Medica- Amsterdam. pp 13-96.
- 82.- Steinberger, E. (1971): Hormonal control of mammalian spermatogenesis. Physiol Rev. 51: 1-
- 83.- Stewart-Bentley, M.; Odell, W. and Horton, R. (1974): The feedback control hormone in normal adult men. J. Clin. Endocrinol. Metab. 38: 545-557.
- 84.- Stumpf, W. E. (1969): Nuclear concentration of ³H-Estradiol in target tissues of vagina, oviduct, ovary, testis, mammary tumor, liver and adrenal. Endocrinology. 85: 31-37.
- 85.- Tanaya, B.; Micks, B.; Furuta, N.; Fuku, S.; Motoyama, T. Okano, T. and Okada, H. (1979): Preliminary studies on steroid-binding proteins in human testis of testicular feminization syndrome. Fertil Sterility. 30: 170-174.
- 86.- Tcholakian, R.; Choudhury, M. and Steinberger, E. (1974): Time of action of oestradiol-17 β on luteinizing hormone and testosterone. J. Endocrinol. 41: 411-419.

87.- van Beurden-Lamerks, W.M.; Brinkmann, A.; Mulder, E. and vander Molen, H. (1974): High-affinity binding of oestradiol-17B by cytosols from testis interstitial tissue pituitary, adrenal, liver and accessory sex glands of the male rat. Biochem. J. 140: 495-502.

88.- van Beurden, W.; Roodnat, B.; de Jong, F.; Mulder, E. and van der Molen, H. (1976): Hormonal regulation of LH stimulation of testosterone production in isolated Leydig cell of immature rats: The effect of hypophysectomy, FSH and estradiol-17B. Steroids. 29: 847-866.

89.- van Beurden, W.; Mulder, E.; deJong, F. and van der Molen, H. (1977)a : The effects of estrogens on luteinizing hormone plasma levels and testosterone production in intact and hypophysectomized rats. Endocrinology. 101:742-749.

90.- van Beurden, W.; Roodnat, B.; Mulder, E. and van der Molen, H. (1977)b : Further characterization of the effects of hypophysectomy, FSH and estrogen on LH stimulation of testosterone production in Leydig cell isolated from immature rats. Steroids. 31: 67-98.

- 91.- van Beurden, W.; Roodnat, B.; Mulder, E. and van der Molen, H. (1978): Effects of oestrogens and FSH on LH stimulation of steroid production by the testis Leydig cell from immature rats. Int. J. Andrology. Suppl. 2: 374-383.
- 92.- van der Molen, H.; Brinkmann, A.; de Jong, F. and Rommerts F. (1981) : Testicular oestrogens. J. Endocrinol. 89: 33-46.
- 93.- Verjans, W.; de Jong, F.; Cocke, B.; van der Molen, H. and Eik-Nes, K. (1974): Effects of oestradiol benzoate on pituitary and testis male rat. Acta Endocrinol. 77: 636-642.
- 94.- Warren, D.; Haltmeyer, G. and Eik-Nes, P. (1973): Testosterone in the fetal rat testis. Biol. Reprod. 9: 560-
- 95.- Williams, R. W. (1973): Tratado de endocrinología. 3^a Ed. Salvat Editores. Mexico. pp 407-463.