

*Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Medicina
Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela*

**Interacción de receptores gonadales de testículo de rata
con gonadotropina coriónica humana:
Implicaciones experimentales del efecto de dilución**

FRANCISCO J. ROJAS, INES MORETTI-ROJAS, GABRIELA DE BELLABARBA
y WALTER BISHOP

Con 2 figuras y 2 tablas

Recibido: April 29, 1981

Introducción

La unión de las hormonas gonadotróficas a sus receptores particulados se ha demostrado que ocurre con alta especificidad y afinidad (1, 5, 19). Sin embargo, muy poco se sabe todavía acerca de los detalles moleculares de esta interacción. Se asume generalmente que la unión de las gonadotropinas a los receptores particulados ocurre vía una simple reacción bimolecular: Hormona + Receptor \rightleftharpoons (Complejo Hormona — Receptor). De acuerdo a este esquema, la hormona ocupa reversiblemente su sitio receptor en la membrana de la célula blanco e inicia una cadena de reacciones que culminan en una respuesta biológica adecuada; la afinidad de la hormona por el receptor se considera que es un valor constante (para revisión, ver ref. 17).

El presente estudio confirma ciertas características de la reacción que no pueden ser resueltas adecuadamente, por un simple modelo de interacción bimolecular de equilibrio rápido. Así, se encontró que los parámetros de unión (constante de disociación, K_d y el número de sitios de unión, B_{max}) son altamente dependientes del volumen de la mezcla de incubación. Además, se demuestra que la consideración de este efecto de dilución es indispensable para la correcta interpretación de algunos estudios de unión que se discuten.

Materiales y Métodos

Los animales usados fueron ratas machos adultas de 200 a 300 gramos de peso. Fueron alimentadas *ad libitum* y mantenidas en un ambiente de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación inmediatamente antes de su uso.

$Na^{125}I$ fue obtenido de New England Nuclear y la hormona gonodotropina coriónica humana (hCG) altamente purificada (CR 121; 13450 I.U./mg.) fue un obsequio del Dr.

V. K. BHALLA del Medical College of Georgia. Otros reactivos fueron de grado analítico o para análisis.

La iodización de la hCG fue llevada a cabo por el método de la cloramina T (9), modificado para permitir la retención de la actividad biológica de la hormona (2). La separación de la hCG de los otros compuestos químicos fue obtenida por filtración en gel a través de Sephadex G-100. La actividad específica y la recuperación de la hormona marcada, calculada usando el método descrito por GREENWOOD y col. (9), fue de 15–18 $\mu\text{ci./}\mu\text{g.}$ La hCG marcada fue diluida hasta una concentración final de 7.5×10^{-14} moles (2.5 ng.) de hCG por 50 $\mu\text{l.}$ de buffer fosfato 0.01 M pH 7.5 que contiene 5 mM MgCl_2 , 0.1 M sucrosa y 0.1 % (p/v) de albúmina de huevo (denominando de aquí en adelante como buffer albúmina-fosfato).

El homogenizado testicular como fuente de receptores particulados fue preparado de la forma descrita en otros trabajos (18). Brevemente, los testículos fueron decapsulados y homogenizados en un triturador de tejidos (Arthur L. THOMAS Co. Philadelphia, PA) usando un pistón de teflón, a razón de 2 ml. de buffer albúmina-fosfato por gramo de tejido y filtrado a través de una capa de gasa. El filtrado fue centrifugado a 1.500 g. por 10 min a 4 °C el sobrenadante se descartó. El precipitado fue centrifugado nuevamente a 20.000 g. por 10 min a 4 °C para remover el exceso de buffer, se pesó y resuspendió en buffer albúmina-fosfato hasta una concentración final de 1 g. de precipitado por 10 ml. de buffer.

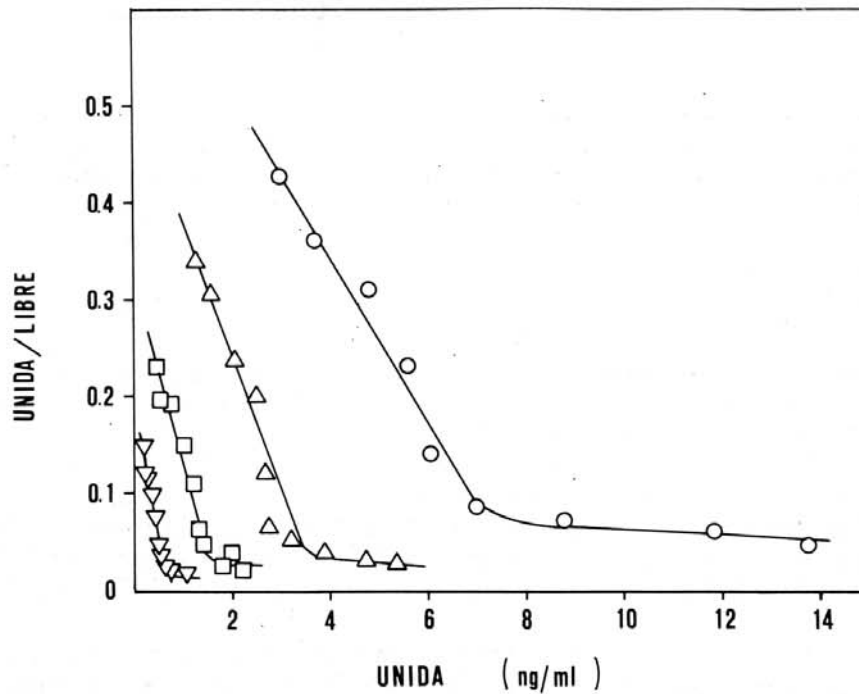
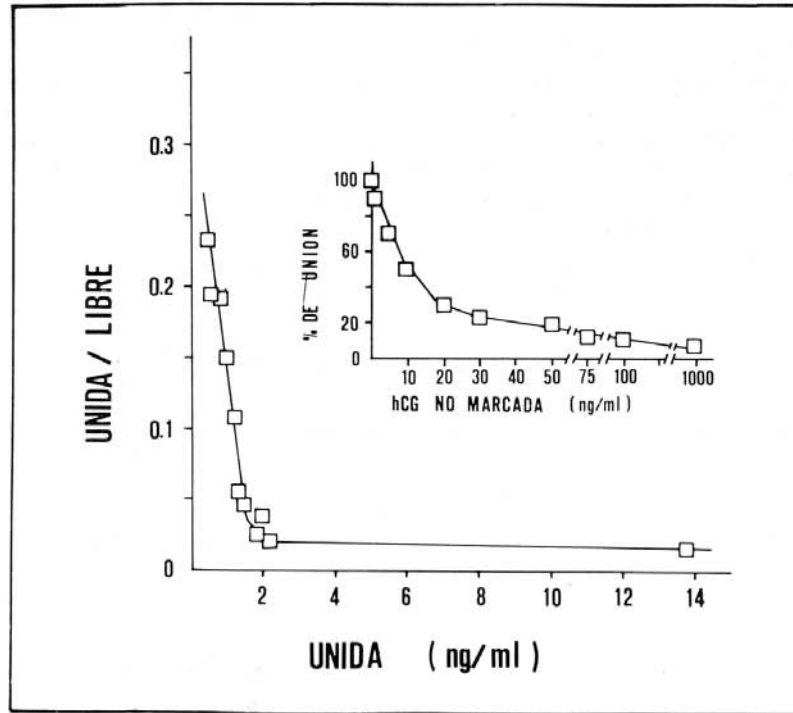
Los estudios de unión se llevaron a cabo usando 2.5 ng. de ^{125}I -hCG y 10 mg. de peso neto de homogenizado testicular en presencia y ausencia de 0, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 50, 75 y 100 ng. de hCG no marcada (3, 18). Los diferentes volúmenes de reacción se alcanzaron agregando buffer albúmina-fosfato. La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C por 2 h en un baño metabólico con oscilación. Al final del período de incubación, los tubos se centrifugaron a 1.500 g. por 10 min a 4 °C y el sobrenadante fue decantado. Los tubos conteniendo los precipitados provenientes del tejido fueron invertidos sobre papel adsorbente en una gradilla y mantenidos a 4 °C durante 30 min; luego se les determinó la radioactividad en un contador gamma In-V-Tron 2000 (Nuclear Medical Laboratories Dallas, Texas).

Los resultados fueron analizados substrayendo la unión no específica de acuerdo al método descrito en trabajos previos (6, 18). Para el análisis se asumió una reacción bimolecular: $(\text{H}) + (\text{R}) \rightleftharpoons (\text{H.R})$ en la cual (H) es la concentración de la hormona libre, (R) es la concentración de receptores no ocupados, y (H.R) es la concentración del complejo hormona-receptor (17). Para la estimación del número de receptores (B_{max}) y de la constante de disociación (K_d) los resultados de unión se analizaron por el método de SCATCHARD (20) y de LINEWEAVER-BURK (14), de acuerdo con procedimientos descritos en la literatura (11, 18, 21). La unión inespecífica fue menos del 5 % de la unión total.

El factor inhibidor presente en el extracto testicular fue obtenido por el método de REICHERT y ABOU-ISSA (15). Los testículos fueron decapsulados y homogenizados a razón de 1 g. de tejido por 1 ml. de buffer albúmina-fosfato. El homogenizado fue filtrado a través de una capa de gasa y centrifugado a 12.000 g. por 60 min a 4 °C. El sobrenadante fue entonces centrifugado a 105.000 g. por 60 min. Finalmente, el sobrenadante resultante de esta última centrifugación se usó para experimentos de inhibición de la unión de hCG.

Resultados

Una típica curva de unión de hCG a tejido testicular se ilustra en la Fig. 1. La reacción se llevó a cabo incubando 10 mg. de homogenizado testicular con 2,5 ng. de hCG marcada radioactivamente y con concentraciones crecientes de hormona homóloga no marcada en un volumen de 1 ml. por 2 h a 37 °C. La curva de inhibición obtenida (recuadro, Fig. 1) fue luego transformada en una curva de saturación y posteriormente analizada por la ecuación de Scatchard de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos (Fig. 1). Se obtuvo un valor de K_d igual a $1,62 \times 10^{-10}$ M y un valor de B_{max} de 0,173 ng./mg. peso húmedo, los cuales fueron comparables a los parámetros de unión de las gonadotrofinas a sus receptores reportados por otros investigadores (8, 10, 13). El análisis por la ecuación de LINEWEAVER-BURK (14) dió valores de K_d y de B_{max} similares a los obtenidos por el método de SCATCHARD (20) (resultados no mostrados). La relatividad de estos valores, sin



embargo, quedó claramente en evidencia cuando los ensayos se hicieron bajo las mismas condiciones experimentales descritas en la Fig. 1, pero con la excepción de que en lugar de 1 ml. de volumen de incubación, se ajustó la cantidad de buffer de manera que se obtuvieran distintos volúmenes finales de reacción (250—2000 μ l.). La Fig. 2 muestra los resultados de los análisis de SCATCHARD obtenidos después de normalizar los valores a ng. por ml. en

estos experimentos. Contrario a lo esperado según lo establecido por un modelo de unión bimolecular, se observó que la pendiente de las curvas (constante de afinidad, K_d ; o su valor recíproco, K_d) cambió en función de la dilución de la reacción. De esta manera, a mayor volumen de buffer agregado a la mezcla de reacción, mayor fue la afinidad demostrada por el sistema hormona-receptor (Fig. 2). Cuando los resultados se expresaron como ng. de hormona unida por mg. de tejido testicular (convirtiendo los valores de la abscisa de la Fig. 2 a mg. de tejido) con el objeto de obtener los correspondientes valores de B_{max} para cada curva, se observó que este parámetro disminuía a medida que aumentaba el volumen de incubación. Así, a un volumen de 250 μ l. se obtuvo un valor de B_{max} de 0,200 ng./mg., y a un volumen de 2.000 μ l., un valor de 0,143 ng./mg. de tejido. Estos experimentos indican que la dilución de la reacción induce la pérdida de sitios receptores a hCG presentes en el tejido testicular. La Tabla 1 resume estas observaciones considerando ambos parámetros de unión.

Tabla 1

Efectos del volumen de reacción sobre la constante de disociación (K_d) y el número de receptores (B_{max})*

Volumen de reacción (ml)	K_d (10^{-10} M)	B_{max} (ng / mg tejido)
0.25	3.48	0.200
0.50	2.24	0.189
1.00	1.62	0.173
2.00	1.19	0.143

* Los resultados representan la media de experimentos duplicados.

La demostración de los efectos de dilución en la interacción de 125 I-hCG con sus receptores, nos llevaron a reevaluar algunas de nuestras observaciones preliminares, así como el estudio reciente de otros investigadores (15) en relación a la inhibición de la unión de gonadotrofinas a receptores gonadales mediante un factor extraído del testículo de rata. En este contexto, nuestro interés era obtener información acerca de su mecanismo de inhibición. Con este propósito se diseñaron tres tipos de experimentos. El primero consistió en la incubación de 10 mg. de homogenizado testicular (100 μ l.) con 1,25 ng. de 125 I-hCG (25 μ l.) en la ausencia (experimento control) y presencia de 200 μ l. del extracto testicular que contiene el factor inhibidor, preparado según se describe en Materiales y Métodos (Experimentos 1 y 2, Tabla 2). El volumen final fue de 1 ml. y la mezcla de reacción se incubó por 2 h a 37 °C, después de lo cual los tubos se centrifugaron y se procesaron para determinar la radioactividad en los precipitados resultantes. Se encontró que la cantidad de extracto testicular ensayada, tuvo la capacidad de inhibir la unión de 125 I-hCG en un 40 % ($P < 0,0005$) respecto a su control (comparar Experimentos 1 y 2, Tabla 2).

El otro tipo de experimento consistió en incubar, en una primera etapa, 10 mg. de homogenizado con 1,25 ng. de 125 I-hCG para permitir la formación del complejo. Enseguida los tubos se centrifugaron y los precipitados resultantes se lavaron con 1 ml. de buffer albúmina-fofato para eliminar el exceso de hormona marcada. Los precipitados se resuspendieron y se incubaron nuevamente, esta vez en la ausencia (experimento control) o presencia de 200 μ l. de extracto testicular con el objeto de evaluar el efecto del inhibidor sobre el complejo hormona-receptor preformado (Experimentos 3 y 4, Tabla 2). Tanto la primera como la segunda incubación se hicieron a 37 °C por 2 h

Tabla 2

Efectos del inhibidor extraído de testículo de rata sobre la interacción ^{125}I -hCG con receptores testiculares

Experimento	Mezcla de la primera incubación	Lavado	Adiciones a la mezcla de la segunda incubación	CPM unidas ^a	% de disminución en CPM vs. control
1.-	Homogenizado + ^{125}I -hCG	No	Ninguna	4604 ± 80	40 % (P < 0.0005) ^b
2.-	Homogenizado + ^{125}I -hCG + Inhibidor	No	Ninguna	2766 ± 15	
3.-	Homogenizado + ^{125}I -hCG	Si	Solo Buffer	3750 ± 107	12 % (P > 0.02) ^b
4.-	Homogenizado + ^{125}I -hCG	Si	Inhibidor	3298 ± 180	
5.-	Homogenizado + Buffer	Si	^{125}I -hCG	5004 ± 48	35 % (P < 0.0005) ^b
6.-	Homogenizado + Inhibidor	Si	^{125}I -hCG	3260 ± 81	
7.-	Homogenizado + ^{125}I -hCG	Si	Ninguna	3637 ± 110	

^a Los resultados representan la media ± S. E. de tres experimentos. ^b Los valores de P se obtuvieron utilizando el análisis t de Student para datos no apareados.

en un volumen final de 1 ml. con buffer albúmina-fosfato. Los tubos fueron luego centrifugados y los precipitados procesados para la determinación de radioactividad. Los resultados indicaron que el factor inhibidor afectaba la disociación del complejo sólo en 12 % con respecto a su control incubado con buffer en lugar del inhibidor durante la segunda incubación (comparar Experimentos 3 y 4, Tabla 2). Los análisis estadísticos demostraron que esta diferencia no fue significativa (P > 0,02).

El tercer tipo de experimento fue diseñado para investigar el efecto del inhibidor sobre la formación del complejo hormona-receptor. En este caso, los receptores se incubaron primero con el inhibidor; luego éste se eliminó por lavado y se hizo una segunda incubación en presencia de la hormona marcada (Experimento 6). En el control (Experimento 5), los receptores fueron incubados con buffer en lugar de inhibidor durante la segunda incubación. Se observó que el factor inhibidor podía impedir la unión de hCG a los receptores, aún después de removerlo del sistema de incubación (35 %; P < 0,0005), sugiriendo que la inhibición se ejercía esencialmente a nivel de la formación del complejo hormona-receptor. Esta observación descartaba además, la posibilidad de que el extracto testicular pudiera afectar directamente a la hormona.

Considerando los resultados de la Tabla 2 en su conjunto, se observó también que el experimento control de los estudios de disociación (Experimento 3) presentaba un valor de radioactividad apreciablemente menor que los otros experimentos controles (Experimentos 1 y 5), con un porcentaje de disminución de aproximadamente 20 % (P < 0,001; comparar Experimentos 1 y 3). Esta diferencia pudo deberse a los efectos de dilución sobre la interacción hormonareceptor como se describiera anteriormente ya que la disminución de radioactividad en el Experimento 3 parece ser consecuencia de las incubaciones y del lavado de la reacción, los cuales no se hicieron en el Experimento 1. Además se encontró que estos efectos eran intrínsecos a la

reacción hormona-receptor porque en el caso de incubar los receptores en ausencia de hCG, y luego de lavarlos, no se apreciaba ningún cambio significativo en la capacidad de unión de los receptores por la hormona (comparar Experimentos 1 y 5). Esta interpretación fue apoyada también por la evidencia adicional de que una vez que el tejido interaccionaba con la hormona, el lavado por sí sólo era capaz de reducir la capacidad de unión (Experimento 7).

Discusión

Este estudio demuestra que la determinación del número de sitios receptores a LH/hCG y de su constante de afinidad son afectados por la dilución de la reacción. Se encontró que los valores de K_d y de B_{max} disminuyen con el aumento en el volumen de reacción, una condición que no estaría de acuerdo con los principios de un modelo bimolecular de equilibrio tipo asociación-disociación para la reacción entre hCG receptores testiculares, que asume un valor constante para cada uno de estos parámetros de unión (17). Estos resultados, por lo tanto, confirman las observaciones del efecto del volumen de reacción sobre la unión de las gonadotrofinas a sus receptores (3) y se suman a las evidencias de otras irregularidades del modelo clásico de reacción de equilibrio rápido que se han descrito en el caso de unión de gonadotrofinas y de otros sistemas ligando-receptor; entre esas irregularidades destacan las evidencias de una aparente irreversibilidad de la reacción y el efecto de la concentración de receptor sobre la afinidad por la hormona (4, 6, 7, 12, 22). Parece ser, por lo tanto, que se requieren más antecedentes experimentales antes de establecer definitivamente el mecanismo de la interacción hormona receptor. Mientras tanto, el uso del modelo de equilibrio rápido debería hacerse con precaución.

Las implicaciones derivadas de estos resultados fueron aplicadas al análisis de nuestros estudios preliminares sobre un factor inhibidor de la unión de LH/hCG a receptores testiculares, extraído de testículo de rata. Observaciones previas (submitidas para publicación al *Biology of Reproduction*) indicaban que este factor era termoestable (baño a 100 °C por 30 min), no era de naturaleza proteica o esteroidea, no tenía reactividad inmunológica cruzada con rLH y presentaba un peso molecular menor de 12.000 daltones, lo cual sugería que sus propiedades físicoquímicas eran parecidas a un inhibidor de la unión de FSH extraído de testículo de rata, descrito por REICHERT y sus colaboradores (15). También habíamos observado que el factor inhibía la unión de LH/hCG a receptores particulados de una manera dosis-dependiente. En este trabajo demostramos que el extracto testicular afecta la formación del complejo hCG-receptor y no la disociación del complejo hCG-receptor. REICHERT y col. (15) han reportado que el inhibidor de la unión de FSH extraído de testículo de rata, y un inhibidor similar obtenido de suero humano (16) tendrían un efecto mayor sobre la formación del complejo hormona-receptor que a nivel de su disociación. Sería interesante establecer si el inhibidor estudiado por nosotros es diferente del inhibidor testicular descrito por REICHERT y col. (15); en cualquier caso, el presente estudio demuestra que su efecto sobre la disociación no sólo es menor, sino que no es estadísticamente diferente del experimento control correspondiente (Tabla 2). Nuestros resultados, por lo tanto, sugieren que el factor inhibidor de la unión de LH/hCG ejerce su acción principalmente, si es que no completamente, a nivel de la formación del complejo hormona-receptor.

Lo más relevante en este aspecto es que la no consideración del efecto de dilución hubiera conducido a una interpretación diferente de los resultados. En efecto, de haberse tomado como referencia las condiciones en las cuales

se obtiene la máxima formación del complejo hCG-receptor (Experimento 1, Tabla 2), se habría encontrado que el factor inhibidor tendría un efecto significativo sobre la disociación del complejo (28 %, $P < 0,001$; comparar Experimentos 1 y 4, Tabla 2).

El análisis detallado de experimentos similares realizados por REICHERT y col. (16) usando un inhibidor extraído de suero humano, también indicó una reducción de aproximadamente 20 % en la cantidad de hormona unida a los receptores, después de someter los homogenizados a la incubación con hormona y al lavado (Tabla 2, Referencia 16). Llama la atención, sin embargo, que esta observación no es mencionada por esos autores. Nuestros resultados, por el contrario, sugieren la importancia de considerar los efectos de dilución de la reacción que ocurren cuando se usan volúmenes de reacción grandes (Fig. 2), o cuando se lava la preparación de receptores después de completada la reacción de unión con la hormona (Tabla 2). La validez de estas observaciones utilizando otros sistemas ligandoreceptor se está investigando actualmente en nuestro laboratorio.

Resumen

Este trabajo demuestra que la estimación del número de sitios receptores testiculares (B_{max}) a LH/hCG y de su constante de disociación (K_d) son afectados por la dilución de la reacción. Las implicaciones de estos resultados fueron consideradas en relación a los estudios de un factor inhibidor de la unión de LH/hCG a receptores gonadales, obtenido de un extracto acuoso de testículo de rata. Se demostró que después de corregir el efecto de dilución producido por la incubación y el lavado de la reacción, 200 μ l. del extracto testicular era capaz de inhibir la formación del complejo de hCG-receptor en un 35 % ($P < 0,0005$). La no consideración del efecto de dilución hubiera conducido a la interpretación, que el factor inhibidor ejercía también un efecto significativo sobre la disociación de dicho complejo (28 %, $P < 0,001$). Estas observaciones fueron inherentes a la reacción hormona-receptor ya que en la ausencia de hCG, no se detectó ningún efecto por la incubación o por el lavado sobre la preparación de receptores. Se enfatiza, por lo tanto, la importancia de considerar los efectos de dilución de la reacción que ocurren cuando se usan volúmenes de reacción grandes, o cuando se lava la preparación de receptores una vez completada la reacción de unión con la hormona.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el C. D. C. H. (Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico) de la Universidad de Los Andes, Proyecto M-164-79 (a F. J. R.). Agradecemos a la Srta. IRLANDA MÁRQUEZ la transcripción del manuscrito.

Zusammenfassung

Wechselwirkungen zwischen testikulären Gonadotropin-Rezeptoren bei der Ratte und menschlichem Choriongonadotropin: Einfluß der experimentellen Verdünnung

Die Schätzung der Anzahl testikulärer Rezeptoren für die Bindung von LH/HCG bei der Ratte (B_{max}) und die Dissoziationskonstante (K_d) sind abhängig vom Reaktionsvolumen des Testansatzes. Ursache für dieses Phänomen ist ein Faktor, der aus dem Überstand (105,000 g) eines Ratten-Hodenextraktes gewonnen werden kann und der bei der Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes zu interferieren vermag. Werden keine Korrekturen bezüglich der Verdünnung gemacht, so resultiert durch diesen Faktor auch ein signifikan-

ter Einfluß auf die Dissoziation des Komplexes ($p < 0,001$). Aufgrund dieser Beobachtungen ergibt sich die Notwendigkeit, bei Gonadotropin-Bindungs-Assays durch adäquate Kontrollen den Verdünnungseffekt zu korrigieren.

Summary

Interaction of rat testicular receptors with human chorionic gonadotrophin: Experimental implications of the effects of dilution

The effects of reaction volume and washing upon the binding of human chorionic gonadotrophin (hCG) to rat testicular receptors were studied. It was demonstrated that the number of detectable hormone-binding sites (B_{max}) and the apparent equilibrium dissociation constant (K_d) were highly dependent upon the reaction volume in which the binding assays were carried out. Thus, the results suggest that caution be exercised in the application of the rapid equilibrium model as a true representation of the actual binding interaction between gonadotrophins and particulate receptors. These findings prompted us to re-examine the studies with respect to a factor obtained from a 105,000 g. supernatant of rat testis which inhibits hCG binding to gonadal receptors. It was revealed that after correction for dilution of the binding reaction, the binding inhibitor prevented hCG binding principally, if not entirely, by interfering with the formation of the hormone-receptor complex. However, if no such corrections were made, then the binding inhibitor also appeared to exert a significant effect upon dissociation of the complex (28 p⁰/₀; $P < 0.001$). Our results, therefore, emphasize the need to introduce the appropriate controls to correct for the dilution effects occurring during gonadotrophin-binding assay studies.

Résumé

Interactions des récepteurs testiculaires du rat avec la gonadotropine chorionique humaine: Implications expérimentales des effets de dilution

L'évaluation du nombre des récepteurs testiculaires pour la liaison de LH/HCG chez des rats (B_{max}) et la constante de dissociation (K_d) dépendent du volume de réaction de la disposition du test. L'origine de ce phénomène est un facteur qui peut être obtenu à partir du surnageant (105 000 g) d'un extrait testiculaire de rat et qui pourrait interférer lors de la formation du complexe hormone-récepteur. Si des corrections concernant la dilution ne sont pas faites, il en résulte par ce facteur une influence significative sur la dissociation du complexe ($p < 0,001$). Il est nécessaire sur la base de ces observations lors d'essais de liaison de la gonadotropine de corriger l'effet de dilution par des contrôles adéquats.

Referencias

1. BHALLA, V. K., and L. E. REICHERT, 1974: Properties of follicle-stimulating hormone-receptor interactions. *J. Biol. Chem.* 249, 43—51.
2. BHALLA, V. K., and L. E. REICHERT, 1974: Interaction of an ethanol soluble testicular factor with human FSH and LH. *J. Biol. Chem.* 249, 7996—8004.
3. BHALLA, V. K., C. C. TROWBRIDGE, C. J. H. CHEN, J. G. LINDEMAN, and F. J. ROJAS, 1979: Gonadal receptors. II. Effect of time and reaction volume upon the binding of human chorionic gonadotropin and human luteinizing hormone to particulate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 584, 436—453.
4. BROWN, G. P., J. G. DOUGLAS, and J. KRONTIRIS-LITOWITZ, 1980: Properties of angiotensin II receptors of isolated rat glomeruli: Factors influencing binding affinity and comparative binding of angiotensin analogs. *Endocrinology* 106, 1923—1929.

5. CATT, K. J., and M. L. DUBAU, 1973: Interactions of LH and hCG with testicular gonadotropin receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 36, 379—418.
6. CHEN, C. J. H., J. G. LINDEMAN, C. G. TROWBRIDGE and V. K. BHALLA, 1979: Gonadal receptors. I. Evidence for irreversibility in the binding of human chorionic gonadotropin and human luteinizing hormone. *Biochim. Biophys. Acta.* 584, 407—435.
7. FIELDS, J. R., W. R. ROESKE, E. MORRIN, and H. I. TAMURA, 1978: Cardiac muscarinic cholinergic receptors. Biochemical identification and characterization. *J. Biol. Chem.* 253, 3251—3258.
8. FROWEIN, J., W. ENGEL, and H. C. WEISE, 1973: hCG-receptor present in the gonadotropin insensitive Leydig cell of the immature rat. *Nature (London) New Biol.* 246, 148—150.
9. GREENWOOD, F. C., W. M. HUNTER, and J. S. GLOVER, 1963: The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89, 114—123.
10. HAOUR, F., and B. B. SAXENA, 1973: Characterization and solubilization of gonadotropin receptor of bovine corpus luteum. *J. Biol. Chem.* 249, 2195—2205.
11. HSUEH, A. J. W., M. L. DUBAU, and K. J. CATT, 1977: Gonadotropin-induced regulation of luteinizing hormone receptors and desensitization of testicular 3':5' cyclic AMP and testosterone responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 592—595.
12. KATIKINENI, M., T. F. DAVIES, I. T. HUHTANIEMI, and K. J. CATT, 1980: Luteinizing hormone-receptor interaction in the testis: Progressive decrease in reversibility of the hormone-receptor complex. *Endocrinology* 107, 1980—1988.
13. KETELSLEGERS, J.-M., and K. J. CATT, 1978: Follitropin receptors in rat testis. Characterization with enzymatically ¹²⁵I-labelled human follitropin. *Biochim. Biophys. Acta* 541, 360—371.
14. LINEWEAVER, H., and D. BURK, 1934: The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 658—666.
15. REICHERT L. E., Jr., and H. ABOU-ISSA, 1977: Studies on a low molecular weight testicular factor which inhibits binding of FSH to receptor. *Biol. Reprod.*, 17, 614—621.
16. REICHERT, L. E., Jr., M. A. SANZO, and N. S. DARGA, 1979: Studies on a low molecular weight follicle-stimulating hormone binding inhibitor from human serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49, 866—872.
17. ROBBARD, D., 1973: Mathematics of hormone-receptor interactions. In: *Receptors for Reproductive Hormones*, Plenum Press, N. Y., pp. 289—364.
18. ROJAS, F. J., and V. K. BHALLA, 1979: A modified radio-immunoassay for cAMP and the relationship between gonadotropin binding and cAMP production in rat testis. *Biol. Reprod.* 20, 1085—1092.
19. RYAN, R. J., and C. Y. LEE, 1976: The role of membrane-bound receptors. *Biol. Reprod.* 14, 16—29.
20. SCATCHARD, G., 1949: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Am. N. Y. Acad. Sci.* 51, 660—672.
21. TSURUHARA, T., M. L. DUBAU, S. CIGORRAGA, and K. J. CATT, 1977: Hormonal regulation of testicular luteinizing hormone receptors. *J. Biol. Chem.* 252, 9002—9009.
22. VAN DER GUGTEN, A. A., M. J. WATERS, G. S. MURTHY, and H. G. FRIESEN, 1980: Studies on the irreversible nature of prolactin binding to receptors. *Endocrinology* 106, 402—411.

Dirección de los autores: Apartado 42, Mérida, Venezuela.