

# ESTIMULACION IN VITRO DE LAS CELULAS DE LEYDIG CON GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA EN RATAS ADULTAS DE DIFERENTES EDADES

Ingrid Tortolero de Fuguet; Gladys Marín de López; Jesús Vilchez Martínez;  
Gabriela Arata de Bellabarba y Walter Bishop.  
Departamento de Fisiopatología. Facultad de Medicina  
Universidad de Los Andes, Mérida. Apartado 42, C.P. 5101-A, Venezuela.

Recibido: 21/09/91; Revisado: 29/05/92; Aceptado: 27/07/92

**RESUMEN:** La capacidad de reserva funcional de las células de Leydig fue estudiada in vitro en ratas adultas de diferentes edades, utilizando suspensiones de dichas células obtenidas por el método de digestión con colagenasa y estimuladas a diferentes tiempos (1, 3 y 5 horas) con 0.5 UI de gonadotropina coriónica humana. Se observó que la capacidad de respuesta de las células de Leydig, en términos de concentración de testosterona en el medio de incubación mostró un patrón de respuesta similar en los tres grupos etarios estudiados, presentándose los niveles máximos a las 3 horas de incubación. Por otro lado, esa capacidad de respuesta varió con la edad. Así, aumentó en el animal de mediana edad (14 meses) en relación con el animal joven (5 meses) y disminuyó en el animal de edad avanzada (21 meses). Los resultados sugieren una disminución de la capacidad funcional de las células de Leydig con la edad. **Palabras clave:** Célula de Leydig, función testicular, esteroidogénesis testicular, vejez.

## IN VITRO STIMULATION OF LEYDIG CELLS BY HUMAN CHORIONIC GONADOTROPHIN IN ADULT RATS OF DIFFERENT AGES

**ABSTRACT:** We studied the functional reserve of Leydig cells in adult rats of different ages in vitro. Suspensions of Leydig cells after digestion by collagenase were stimulated with Human Chorionic Gonadotropin (hCG) during different times (1, 3 and 5 hours). We observed that response of Leydig cells, expressed by the testosterone concentration in the culture medium, showed a similar pattern in all studied group, and the highest response was seen at three hours of incubation. On the other hand, the testosterone response to hCG varied with age of animal. Thus, it was higher in the group of 14 months old (middle aged) than young animals (5 month old) and decreased in old animals (21 months old). These results suggest that a primary testicular lesion occurs with aging. **Key words:** Leydig cells, testicular function, testicular steroidogenesis, aging.

## INTRODUCCION

El estudio funcional del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, en el macho, se ha realizado en diferentes etapas de la vida y en distintas especies<sup>25,36</sup>.

En el humano, la concentración de testosterona en sangre periférica fluctúa a lo largo de la vida. Se observan elevaciones en fetos de 12 a 18 semanas de gestación y a los 2 meses de vida extrauterina; luego, entre los 12 y 17 años comienza a elevarse definitivamente, alcanzando las cifras máximas entre los 20 y 30 años de edad. Posteriormente, se observa, una disminución paulatina de la concentración de testosterona que se va acentuando a medida que transcurren los años<sup>10</sup>. Resultados similares a los humanos se han descrito en la rata<sup>12</sup>.

De lo anteriormente anotado, es evidente que ocurre una insuficiencia testicular en las últimas décadas de la vida. Esto se expresa como una disminución de la concentración de la testosterona sérica, la cual puede ser debida a una disfunción hipotálamo-hipofisiaria, con una disminución de

la liberación de hormona luteinizante (LH); o a un defecto gonadal primario, es decir, a una alteración funcional de las células de Leydig. Con respecto a esto último, se han encontrado altos niveles séricos de LH acompañando a las bajas concentraciones de testosterona en hombre mayores de 40 años<sup>21</sup>. Además, otros investigadores han reportado una disminución con la edad de la respuesta de las células de Leydig a la estimulación con gonadotropina coriónica humana (GCh)<sup>13,26,37</sup>. Sin embargo, no está suficientemente claro si ésto es debido a un defecto intrínseco de la misma célula de Leydig, ya que existen resultados conflictivos en relación con la respuesta de estas células a la estimulación con la GCh in vitro. Se ha reportado, usando testículos enteros incubados con GCh, una disminución de la respuesta de la testosterona en ratas viejas<sup>4,28</sup>; mientras que otros autores, usando cortes de tejido testicular, no encontraron diferencias<sup>27</sup>. Por otro lado, el efecto de la edad sobre la respuesta testicular a la GCh se ha investigado, utilizando suspensiones de células de Leydig aisladas por diversas metodologías, encontrándose también resultados

contradictorios<sup>4,20,28,32,35,37</sup>.

Por ello, nos pareció interesante estudiar la respuesta testicular de las células de Leydig *in vitro*, utilizando suspensiones de células de Leydig obtenidas por el método de dispersión con colagenasa, de testículos de ratas adultas de diferentes edades.

## MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 90 ratas machos adultas, Wistar, las cuales fueron distribuidas en grupos de 30 según su edad:

Grupo 1: ratas de 5 meses (jóvenes)

Grupo 2: ratas de 14 meses (edad media)

Grupo 3: ratas de 21 meses (viejas).

Todos los animales fueron mantenidos bajo un régimen de luz controlada (14 horas luz - 10 horas oscuridad) y con agua y comida a voluntad.

En la mañana de los días de los experimentos, previo registro del peso corporal, los animales fueron sacrificados por decapitación.

Los testículos fueron removidos, pesados y colocados sobre hielo en una capsula de Petri que contenía medio M-199, fueron decapsulados y colocados 4 testículos por tubo. Para el aislamiento y purificación de las células de Leydig se siguió la técnica de Dufau y col.<sup>9</sup>, modificando la velocidad de agitación, en el incubador Dufnoff, a 60 ciclos/minuto. Las células de Leydig, previo conteo según la técnica de Levi y col.<sup>19</sup>, modificada por Sharpe y Cooper<sup>30</sup> y estudiada su viabilidad, fueron incubadas durante 1, 3 y 5 horas sin GCh (controles) o con 0.5 UI/ml de GCh bajo una atmósfera de 95% de O<sub>2</sub>/5% de CO<sub>2</sub> con una agitación constante de 60 ciclos/minutos. Al finalizar los períodos de incubación, el material fue centrifugado a 1600 g/10 minutos a 4° C. El sobrenadante fue almacenado a -20° C. La concentración de testosterona total en el sobrenadante se determinó por radioinmunoensayo (RIA), sin extracción previa<sup>16</sup> y el esquema de ensayo fue el descrito por Coyotupa y col.<sup>6</sup>.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el análisis de varianza múltiple de Fischer y por el test de Student.

## RESULTADOS

### 1. CONTAJE Y VIABILIDAD DE LAS CELULAS DE LEYDIG.

En la tabla I se muestra el número de células de Leydig en ratas macho adultas de diferentes grupos etarios. Como puede observarse, hay una disminución progresiva del número de células de Leydig a medida que transcurre la edad.

La tabla II muestra el grado de pureza y de viabilidad de las preparaciones de las células de Leydig obtenidas por el método de la colagenasa, los cuales fueron de 35 - 45% y de 67 - 83%, respectivamente.

Tabla I.  
Número de células de Leydig en ratas machos adultas de diferentes grupos etarios.

5 meses	14 meses	21 meses
7.0 ± 1.51	6.0 ± 1.03	3.5 ± 0.58*

El número de células de Leydig se expresa en millones/g tejido testicular. Los resultados se presentan en  $\bar{X} \pm ES$ .

\* Significativamente menor ( $p < 0.001$ )

Tabla II.  
Grado de pureza y de viabilidad de las preparaciones de las células de Leydig.

Parametros	% de células ( $\bar{X} \pm ES$ )
Células de Leydig 3B - HSD <sup>+</sup>	40 ± 5(35 - 45)
Viabilidad celular	75 ± 8(67 - 83)

### 2. RESPUESTA DE LAS CELULAS DE LEYDIG A LA ESTIMULACION IN VITRO CON GCh EN DIFERENTES GRUPOS ETARIOS A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACION.

La respuesta de las células de Leydig a la estimulación con 0.5 UI/ml de GCh, expresada en concentraciones de testosterona en el medio de incubación (Fig. 1) mostró un patrón similar en los distintos grupos etarios, alcanzando un máximo de respuesta a partir de las 3 horas, cuando fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) al ser comparada con las concentraciones de testosterona cuantificadas a la primera hora de incubación. Por otro lado, el grupo de 14 meses de edad presentó una mayor respuesta de testosterona tanto a las 3 como a las 5 horas ( $p < 0.001$ ) con respecto a los otros dos grupos. En el grupo de ratas de mayor edad (21 meses) se notó un ligero incremento de la respuesta de las células de Leydig, a la primera hora de incubación, con respecto a lo observado en los otros grupos; sin embargo, la diferencia no alcanzó significancia estadística.

## DISCUSION

Tal como lo demuestran los resultados obtenidos en esta investigación y de acuerdo con las observaciones en diversas especies animales, incluyendo al hombre<sup>15,18,23,27,30,34</sup>, las células de Leydig del testículo de la rata incubadas *in vitro*, son capaces de responder al estímulo de la GCh segregando testosterona en el medio de incubación.

Desde que Cristensen y Mason<sup>7</sup> demostraron que el tejido intersticial del testículo de la rata, obtenido por simple disección mecánica, es capaz de producir andrógenos bajo la estimulación con GCh, una gran cantidad de métodos han sido utilizados para aislar y purificar las células de Leydig.

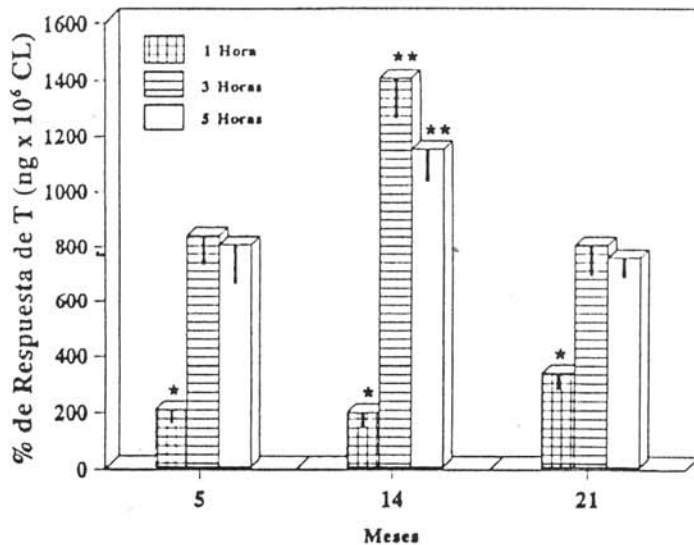


FIGURA 1: Porcentaje de respuesta de la testosterona a la estimulación in vitro con gonadotropina corionica humana, en células de Leydig de ratas machos adultas de diferentes grupos etarios y en distintos tiempos de incubación.

Las células de Leydig fueron estimuladas con 0.5 UI de GCh e incubadas durante 1, 3 y 5 horas a una velocidad de 60 ciclos/minuto. La testosterona (T) fue cuantificada en el medio de incubación. Los resultados se presentan en  $\bar{X} \pm E.S.$

\* Significativamente menor que a las 3 horas de incubación ( $p < 0.001$ )

\*\* Significativamente mayor que en los otros dos grupos etarios ( $p < 0.001$ )

Uno de los primeros métodos fue la dispersión de dichas células mediante la digestión con colagenasa, obteniéndose una preparación que contenía un 20 - 50% de células de Leydig, las cuales respondieron satisfactoriamente a la estimulación con GCh<sup>22</sup>. Posteriormente se ha tratado de purificar aún más las preparaciones de las células de Leydig usando distintos gradientes con diversas sustancias, tales como metrizamida<sup>5,8</sup> o percol<sup>3</sup>. La recuperación del número de células de Leydig y el grado de pureza de las preparaciones finales dependen de las concentraciones de dichas sustancias. También se ha usado la centrifugación con elución la cual da un 90 - 95% de pureza en las preparaciones finales de células de Leydig<sup>1</sup>. Nuestra preparación, aun cuando fue obtenida solamente por medio de digestión con colagenasa, resultó sensible a la GCh en todos los grupos estudiados.

Los resultados obtenidos en la presente investigación permitieron comprobar que la capacidad funcional de las células de Leydig del testículo de la rata in vitro, expresada por la magnitud de la secreción de testosterona al estímulo con la GCh, varía con la edad. Es así como la respuesta a la GCh aumenta en la edad adulta (14 meses) en relación con la rata joven de 5 meses de edad, para disminuir en los animales viejos (21 meses de edad). Es decir, que la capacidad funcional de las células de Leydig, en las ratas adultas, disminuye progresivamente con la edad del animal. Esta conclusión concuerda con lo encontrado por otros investigadores, usando testículos enteros incubados con GCh<sup>4</sup>,

cortes testiculares<sup>27</sup>, o por el método del gradiente de densidad con metrizamida después de la dispersión con la colagenasa para purificar las células de Leydig<sup>20</sup>.

En relación con el deterioro de la capacidad funcional de las células de Leydig con la edad, otros autores no pudieron demostrar la disminución de la respuesta a la GCh de las células de Leydig in vitro en la rata vieja<sup>14,17</sup>. Esta discrepancia con nuestras observaciones se podría explicar porque los otros investigadores compararon la respuesta obtenida en células de Leydig de animales de 2-6 meses de edad, con la de 22-27 meses de edad (edades extremas); detalle que marca una diferencia fundamental desde el punto de vista metodológico. Por otro lado, Schafer y col.<sup>32</sup>, usando células de Leydig purificadas por el método del percol, no encontraron ninguna diferencia al estudiar la respuesta de la testosterona a la GCh en ratones de 5, 7, 21 y 27 meses de edad. Esto podría deberse a una diferencia de especie en el comportamiento de la célula de Leydig bajo la estimulación con la GCh<sup>30,33</sup>.

Aun cuando en un principio se postulaba que la insuficiencia testicular observada en la vejez obedecía a un defecto del eje hipotálamo-hipofisiario con una disminución de la secreción de la LH<sup>11,28,38</sup>, es evidente que existe también, por los resultados obtenidos en esta investigación, una disminución funcional de las células de Leydig. La disminución de la capacidad funcional primaria en la vejez, podría explicarse por varios mecanismos. Uno de ellos sería por la disminución del número de células de Leydig por gramo de tejido testicular, tal como se señala en esta investigación (tabla I). Otra posibilidad sería un defecto en la síntesis de testosterona. En tal sentido, se ha reportado una disminución del número de receptores a la LH/GCh<sup>27,37</sup>. Por otro lado, Lin y col.<sup>20</sup> encontraron que aun cuando el AMPc basal y el formato durante la estimulación con LH en el cultivo de las células de Leydig de ratas viejas eran similares a las de las jóvenes, en las primeras la respuesta de la testosterona fue menor. Esto llevó a los autores a postular que el problema principal de las células de Leydig en la vejez, radica probablemente más allá del sistema receptor a la LH/GCh-sistema adenil-ciclasa. A este respecto, existen evidencias de que el tratamiento con colagenasa podría ocasionar pérdida de receptores hormonales en la membrana celular y que, aparentemente, las células de Leydig de animales viejos son más sensibles a las proteasas<sup>31</sup>.

En relación a un defecto posterior a la activación del sistema adenil-ciclasa por la unión a su receptor, se ha reportado una disminución de la actividad de la enzima C-17-20 liasa en testículos de hombres viejos<sup>2,29</sup>. Además, Nankin y col.<sup>24</sup> no pudieron evidenciar aumento en la secreción de 17-OH-progesterona y de testosterona en medios de cultivos de células de Leydig, de hombres de edad avanzada, estimuladas con GCh; más aún, Takahashi y col.<sup>35</sup> demostraron que la suma de las concentraciones intratesticulares de los 9 esteroides que se derivan de la pregnenolona producida en la mitocondria era menor en los hombres de mayor edad cuando se comparó con la de hombres jóvenes. Esto último señala que el defecto de la célula de Leydig en la vejez podría ser consecuencia de una disminución del suministro



de precursores mitocondriales, más que a una alteración en la esteroidogénesis microsomal.

En relación con lo observado en la respuesta de las células de Leydig provenientes de ratas de 21 meses de edad, es conveniente señalar que dado que ellas en un primer momento (primera hora de incubación) bajo el estímulo de la GCh, muestran una tendencia a segregar una mayor cantidad de testosterona, pero rápidamente esa capacidad disminuye, podría pensarse en la existencia en estas células de un defecto en la resíntesis hormonal de novo, ya que es conocido que la secreción de una hormona por una determinada glándula ocurre fundamentalmente en dos etapas: la primera, que constituye la liberación de la hormona previamente formada y almacenada en la célula (pool de liberación rápido), y la segunda etapa que corresponde a la liberación de la hormona recién sintetizada (pool de liberación lento)<sup>39</sup>. Otra explicación posible podría ser que las células de Leydig de ratas viejas, debido a una disminución de la producción de LII (hipoestimulación crónica), tendrían al comienzo del estudio in vitro un número

aumentado de receptores a la LII/GCh, es decir, un efecto contrario al "down regulación", tal como lo postularon Schaffer y col.<sup>32</sup>.

En conclusión, este trabajo demuestra que:

- 1.- La metodología utilizada nos permitió aislar células de Leydig, mediante la digestión con colagenasa, con un grado de pureza de 35 - 45% y una viabilidad de 67 - 83%, conservando así su integridad biológica y su capacidad funcional.
- 2.- La capacidad funcional de las células de Leydig disminuye con la edad en las ratas adultas.

#### AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su reconocimiento a los Sres. Rolando Lupi y Carmen Haydée Fernández, y al Centro de Microscopía Electrónica de la ULA, por la colaboración prestada. Igualmente, al CDCIT-ULA, por el apoyo financiero (Proyecto M294).

#### REFERENCIAS

1. Aquilano, D. R. and Dufau M. I. Functional and morphological studies on isolated Leydig cells: purification by centrifugal elutriation and metrizamide fractionation. *Endocrinology*. 114: 499-510, 1984.
2. Axelrod, L. A. Metabolic patterns steroid synthesis in young and aged human testis. *Biochem. Biophys. Acta* 97: 551-556, 1965.
3. Bhalla, V. K., Flash, M. K., Bowne, E. S., Sohal, G. S. and Shara Wy, M. M. Interstitial cell heterogeneity in rat testes. *J. Biol. Chem.* 262, 5322-5332, 1987.
4. Chan, S. W. C., Leatham, J. H. and Esashi, T. Testicular metabolism and serum testosterone in aging male rats. *Endocrinology* 101: 128-133, 1977.
5. Conn, M., Tsuruhara, T., Dufau, M. and Catt, K.J. Isolation of highly purified Leydig cells. *Endocrinology* 101: 639-642, 1977.
6. Coyotupa, J., Parlow, A. and Abraham, G. Simultaneous radioimmunoassay of plasma testosterone and dihydrotestosterone. *Analyt. Lett.* 5: 329-340, 1972.
7. Cristensen, A. K. and Mason, M. A. Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of rats testis to synthesized androgens from progesterone- $4C^{14}$  in vitro. *Endocrinology*. 76: 646-656, 1965.
8. Dehajia, A., Nozu, K. I., Catt, K. J. and Dufau, M. L. Luteinizing hormone receptors and gonadotropic activation of purified rat Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 257: 13781-13786, 1982.
9. Dufau, M. J., Mendelson, C. R. and Catt, K. J. A highly sensitive in vitro bioassay for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin: testosterone production by dispersed Leydig cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39: 610-613, 1974.
10. Ewing, L. and Zirkin, B. Leydig cells structure and steroidogenic function. *Rec. Prog. Horm. Res.* 39: 599-632, 1983.
11. Ghanadian, R., Lewis, G. T. and Chisolm, G. D. Serum testosterone and dihydrotestosterone changes with age rat. *Steroid*. 25: 753-762, 1975.
12. Grotta, L. Effects of age and experience on plasma testosterone. *Neuroendocrinology*. 8: 136-143, 1971.
13. Hammar, M. Impaired in vitro testicular endocrine function in elderly men. *Andrologia*. 17: 444-449, 1985.
14. Hammar, S. M., Auner, R. L. and Roth, G. S. Testosterone secretion in the rat in response to chorionic gonadotropin: alteration with age. *Endocrinology*. 102: 540-544, 1978.
15. Hedger, M. and Eddy, E. The heterogeneity of isolated adult rat Leydig cells separated on Percoll density gradients: an immunological, citochemical, and functional analysis. *Endocrinology*. 121: 1824-1838, 1987.
16. Ismail, A., Niswender, G. and Midgely, A. Radioimmunoassay of testosterone without chromatography. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34: 177-184, 1972.
17. Kaler, L. W. and Neaves, W. B. Attrition of the human Leydig cell population with advancing age. *Anat. Rec.* 192: 513-518, 1978.
18. Kerr, J. B., Robertson, D. M. and De Kretser, D. M. Morphological and functional characterization of interstitial cells from mouse testis fractionated on Percoll density gradients. *Endocrinology*. 116: 1030-1043, 1985.
19. Levi, H., Dean, H. W. and Rubin, B. L. Visualization of steroid-3 $\beta$ -ol dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology*. 65: 932-943, 1959.

20. Lin, T., Muroño, E., Osterman, I., Allen, D. O. and Nankin, H. P. The aging Leydig cell. I. Testosterone and adenosine 3'5' monophosphate response to gonadotropin stimulation in rat. *Steroid*. 35: 653-663, 1980.
21. Marín de López, G., Vílchez, J. A. y Bishop, W. Disminución de la función esteroidogénica testicular con la edad. *Acta Cient. Venez.* 35 (Sup. 1): 150, 1985.
22. Mendelson, C., Dufau, M. L. and Catt, K. K. Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 250: 8818-8823, 1975.
23. Nankin, H. R., Muroño, E., Lin, T. and Osterman, J. Morning and evening human Leydig cell response to hCG. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 95: 560-569, 1980.
24. Nankin, H. R., Lin, T., Muroño, E. P. and Osterman, J. The aging Leydig cell. III. Gonadotropin stimulation in men. *J. Androl.* 2: 181-189, 1981.
25. Nelson, J., Latham, K. and Finch, C. Plasma testosterone levels in C57BL/6J male mice: effects of age and disease. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 60: 744-752, 1975.
26. Nieschlag, E., Kley, K. and Wiegelmann, W. Age dependence of the endocrine testicular function in adult men. *Acta Endocrinol. (Kbh) sup.* 177: 122-124, 1973.
27. Pirke, K. M., Vogt, M. J. and Geiss, M. In vitro and in vivo studies on Leydig cell function in old rats. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 89: 393-403, 1978.
28. Pirke, K. M., Krings, B. and Vogt, H. J. Further studies on hypothalamic - pituitary - testicular function in old rats. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*. 92: 358-369, 1979.
29. Pirke, K. M., Sinterman, R. and Vogt, H. J. Testosterone and testosterone precursors in the spermatic vein and in the testicular tissue of old men. *Gerontology* 26: 221-230, 1980.
30. Sharpe, R. M. and Cooper, I. Variation in the steroidogenic responsiveness of isolated rat Leydig cells. *J. Reprod. Fert.* 65: 475-481, 1982.
31. Sharpe, R. M. and Mc Nully, A. S. Differences between dispersed Leydig cells and intact testis in their sensitivity to gonadotropin-stimulation in vitro after alteration of LH-receptor number. *Moll. Cell. Endocrinol.* 18: 75-86, 1980.
32. Schafer, G., Holstein, A. and Hilz, H. Steroidogenic capacity of isolated adult mouse Leydig cells does not decrease with age. *Endocrinology*. 110: 1362-1366, 1982.
33. Schumacher, M., Schafer, G., Holstein, A. F. and Hilz, H. Rapid isolation of mouse Leydig cells by centrifugation in Percoll density gradients with complete retention of morphological and biochemical integrity. *FEBS Lett.* 91: 333-338, 1979.
34. Simpson, B., Wu, F. and Sharpe, R. Isolation of human Leydig cells which are responsive to human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65: 415-422, 1987.
35. Takahashi, J., Higashi, Y., Lanasa, J., Voshida, K. L., Winters, S., Oshima, H. and Troen, P. Studies of the human testis. XVIII. Simultaneous measurements of nine intratesticular steroids: evidence for reduced mitochondrial function in testis of elderly men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56: 1178-1187, 1983.
36. Toscano, V., Balducci, R., Adamo, M., Manca, M., Sciarra, F. Response to a single dose of human chorionic gonadotropin in prepuberal boys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57: 421-424, 1983.
37. Tsitouras, D. P., Kowatch, A. M. and Harman, M. Age-related alteration of isolated rat Leydig cell function: gonadotropin receptors, adenosin 3'5' monophosphate response and testosterone secretion. *Endocrinology*. 105: 1400-1405, 1979.
38. Vermeulen, A., Rubens, R. and Verdonck, L. Testosterone secretion and metabolism in male senescence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43: 730-735, 1972.
39. Vílchez, J. A. Papel de los esteroides sexuales y de la hormona liberadora de hormona luteinizante (luteinizing hormone-releasing hormone-LH-RH) endógena en la modulación de la secreción hipofisiaria de la hormona luteinizante durante el ciclo estral de la rat. *Rev. Fac. Med.* 10: 1-25, 1978.