

Tesis de Posgrado

Estudio de la interacción de la gonadotropina coriónica humana, (hCG), y el túbulo seminífero de la rata : efectos, mecanismos fisiopatológicos y variaciones ontogénicas

León, Marina Daniela

1990

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

León, Marina Daniela. (1990). Estudio de la interacción de la gonadotropina coriónica humana, (hCG), y el túbulo seminífero de la rata : efectos, mecanismos fisiopatológicos y variaciones ontogénicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2296_Leon.pdf

Cita tipo Chicago:

León, Marina Daniela. "Estudio de la interacción de la gonadotropina coriónica humana, (hCG), y el túbulo seminífero de la rata : efectos, mecanismos fisiopatológicos y variaciones ontogénicas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2296_Leon.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

ESTUDIO DE LA INTERACCION DE LA
GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA (hCG)
Y EL TUBULO SEMINIFERO DE LA RATA.
EFECTOS, MECANISMOS FISIOPATOLOGICOS
Y VARIACIONES ONTOGENICAS.

MARINA DANIELA LEON

1990

2296
ej. 2

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LA INTERACCION DE LA GONADOTROFINA CORIONICA
HUMANA (hCG) Y EL TUBULO SEMINIFERO DE LA RATA. EFECTOS,
MECANISMOS FISIOPATOLOGICOS Y VARIACIONES ONTOGENICAS.

Autor: Lic. Marina Daniela LEON
Director: Dr. Héctor Edgardo CHEMES
Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones
Endocrinológicas (CEDIE). Hospital de
Niños "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires.

Tesis presentada para optar por el título de :

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

A mi madre

A Dany

A Luciana

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor Chemes por haberme brindado la oportunidad de iniciarme en la investigación científica y por guiar mis primeros pasos en esta tarea.

Al Dr. Eduardo Charreau por su valioso asesoramiento y colaboración durante la realización del presente trabajo.

A la Bioq. Violeta A. Chiauzzi y al Dr. Juan Carlos Calvo por su colaboración en llevar a cabo algunos de los trabajos experimentales.

A la Bioq. Isabel Almirón por su constante apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

A la Sra. Yolanda Castaño de Mansilla y al Sr. Oscar Rodríguez por la eficiencia y calidad de su asistencia técnica.

Quiero agradecer también al Dr. César Bergadá, Director del Centro de Investigaciones Endocrinológicas por haberme brindado el marco adecuado para desarrollar el presente trabajo de tesis.

Finalmente agradezco a todos mis compañeros, colegas y amigos del Centro de Investigaciones Endocrinológicas con quienes he compartido tantos ateneos, seminarios y charlas los cuales han contribuido a completar mi formación científica y a realizar esta tesis.

INDICE

	Pág.
<u>INTRODUCCION</u>	1
- Estructura básica del testículo	3
- Desarrollo pre y post-natal de la gonada masculina	5
- Desarrollo del epitelio seminífero	8
- Espermatogénesis y ciclo del epitelio seminífero	9
- La célula de Sertoli	13
- Crecimiento y diferenciación de las células de Leydig	14
- Control hormonal de la función testicular	18
- Objetivos de la presente investigación	24
 <u>MATERIALES Y METODOS</u>	 27
<u>PARTE A</u> LESIONES DEL TUBULO SEMINIFERO PRODUCIDAS POR EL TRATAMIENTO CON hCG, CARACTERIZACION Y MECANISMOS FISIOPATOLOGICOS INVOLUCRADOS	 28
A.1. Animales de experimentación	28
A.2. Hormonas utilizadas y vías de administración	28
A.3. Diseño experimental	
I) Tratamiento de los animales con hCG y phCG	29

	Pág.
II) Tratamiento de los animales con diferentes dosis de hCG por periodos de tiempo variable	30
III) Tratamiento de los animales con una dosis alta de hCG a intervalos de tiempo cortos. Estudio del entorno hormonal	31
IV) Estudio de la reversibilidad de la lesión tubular	32
V) Tratamiento de los animales con hCG y hCG + FSH purificada	32
VI) Tratamiento de los animales con benzoato de estradiol por vía subcutánea e intratesticular	33
A.4. Procesamiento y análisis histológicos	34
A.5. Separación de túbulos seminíferos por la técnica de transiluminación	36
A.6. Medición de receptores de LH en la fracción particulada tubular	39
A.7. Determinación radioinmunológica de testosterona (T) y estradiol (E ₂) séricos	40
A.8. Determinación radioinmunológica de FSH sérica	42

**PARTE B VARIACIONES ONTOGENICAS DE LA MORFOLOGIA
Y FUNCION DEL INTERSTICIO TESTICULAR. SU
RELACION CON EL DESARROLLO DE LESIONES**

	Pág.
TUBULARES	44
B.1. Animales de experimentación	44
B.2. Hormonas utilizadas y vías de administración	45
B.3. Estudio ontogénico de la morfología testicular	45
B.4. Determinación radioinmunológica de T sérica	50
B.5. Producción in vitro de andrógenos totales (T + DHT + 3 α -diol)	51
B.6. Determinación de sitios receptores de LH en la fracción particulada testicular	53
ESTADISTICA	54
 <u>RESULTADOS</u>	 55
<u>PARTE A</u> ACCION DE LA hCG SOBRE LOS TUBULOS SEMINI- FEROS. EFECTO, CARACTERIZACION Y MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA PRODUCCION DEL DAÑO TUBU- LAR POR hCG	 56
- Lesiones de los túbulos seminíferos inducidas por el tratamiento con dos preparaciones de hCG de distinta pureza	 56
- Caracterización del daño tubular inducido por el tratamiento con hCG	 59
- Estudio del tiempo requerido por el tratamiento con hCG para inducir la lesión del túbulo seminífero. Análisis del entorno hormonal	 69

	Pág.
- Estudio de la reversibilidad del daño tubular	74
- Reposición de los niveles de FSH en los animales tratados con hCG	74
- Papel del estradiol en la producción de la lesión tubular inducida por hCG	79
- Búsqueda de la existencia de receptores de LH en los túbulos seminíferos	80
 <u>PARTE B</u> VARIACIONES ONTOGENICAS DE LA MORFOLOGIA Y FUNCION DEL INTERSTICIO TESTICULAR. SU RELACION CON EL DESARROLLO DE LESIONES TUBULARES	 86
- Cambios histológicos en la composición celular del intersticio durante la maduración testicular y luego del tratamiento con hCG	87
- Niveles séricos de T en animales control de distintas edades y con estimulación gonadotrófica	97
- Variaciones ontogénicas de los niveles de receptores testiculares de LH y la producción "in vitro" de andrógenos luego de una estimulación aguda con hCG	97
- Estudio ontogénico de la morfología de los túbulos seminíferos luego de la estimulación aguda con hCG	102

	Pág.
<u>DISCUSION</u>	105
<u>CONCLUSIONES</u>	140
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	146

ABREVIATURAS

AMP c	3',5'-adenosina monofosfato cíclico
BSA	albúmina sérica bovina
cpm	cuentas por minuto
DHT	dihidrotestosterona, 5 α -androstano 17 β -ol 3-ona
3 α -diol	5 α -androstano 3 α ,17 β -diol
DS	Desvío estandard
ES	Error estandard
E ₂	estradiol, 1,3,(5-10)-estratrien-3,17 β -diol
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
fmol	femto mol
FSH	hormona folículo estimulante
g	gramo
³ H	tritio
hCG	gonadotrofina coriónica humana
¹²⁵ I	iodo 125
LH	hormona luteinizante
LH-RH	hormona liberadora de la hormona luteinizante
M	molar
ml	mililitro
mm	milimetro

mM	milimolar
ng	nanogramo
PAS	ácido peryódico de Schiff
PBS	buffer fosfo-salino
pg	picogramo
rpm	revoluciones por minuto
T	testosterona,4-androsten 17 β -ol-3 ona
μ Ci	microcurie
μ g	microgramo
U.I.	unidad internacional
μ l	microlitro
μ m	micrometro
X	media

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La función del testículo en el proceso reproductivo fue reconocida desde la antigüedad. Aproximadamente 300 años antes de Cristo, Aristóteles describe la influencia de la castración en las aves y su diferente efecto según la edad del animal y relaciona estos cambios con los observados en los hombres castrados en edad temprana.

A mediados del siglo XIX, Berthold (1849) provee, mediante experimentos de ablación y sustitución, la primera evidencia directa de una producción hormonal por la gonada masculina. El descubrimiento de que los espermatozoides provienen de células localizadas en el testículo (Von Kolliker, 1841) fue rápidamente seguido por la descripción de las características microscópicas de las células intersticiales (Leydig, 1857) y de las de Sertoli (Sertoli, 1865).

La clasificación morfológica de las células germinales (Von La Vallette, 1876) llevó a la comprensión de la espermatogénesis (Benda, 1887; Von Ebner, 1871) y al concepto de ciclo espermatogénico (Regaud, 1901; Von Ebner, 1902). Estos estudios constituyen la base del entendimiento actual de la cinética del proceso espermatogénico. La mayoría de los trabajos concernientes a

este tema fueron realizados en roedores, particularmente en rata. Pese a existir considerables diferencias interespecies, la histología del epitelio seminífero, la morfología de las células germinales y la cinética de la espermatogénesis están lo suficientemente emparentadas de modo de permitir una extrapolación de lo hallado en la rata a otras especies. Durante el desarrollo de esta tesis, a menos que haya una indicación diferente, los datos se referirán a la rata blanca de laboratorio.

Estructura básica del testículo

El parénquima testicular está formado por túbulos seminíferos y tejido intersticial. Se halla rodeado por dos envolturas diferentes: la más externa es la túnica vaginalis y la más interna comprende a la túnica albugínea de la cual es parte la capa vascular.

- Los túbulos seminíferos presentan una estructura compleja formando asas que desembocan por ambos extremos en la rete testis, la cual, a su vez, se conecta con el epidídimo por los ductuli efferentis (fig. 1). En la rata, a diferencia de otras especies de mamíferos, los túbulos se anastomosan en grado mínimo.

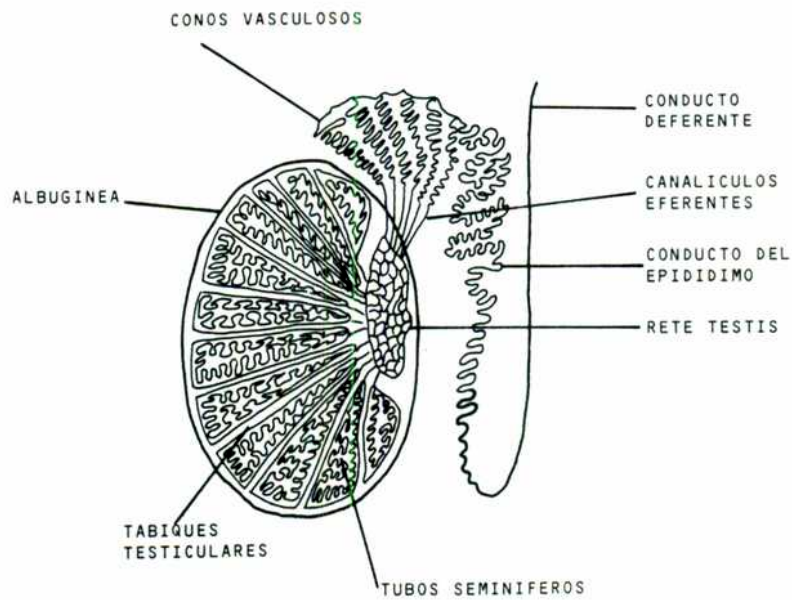


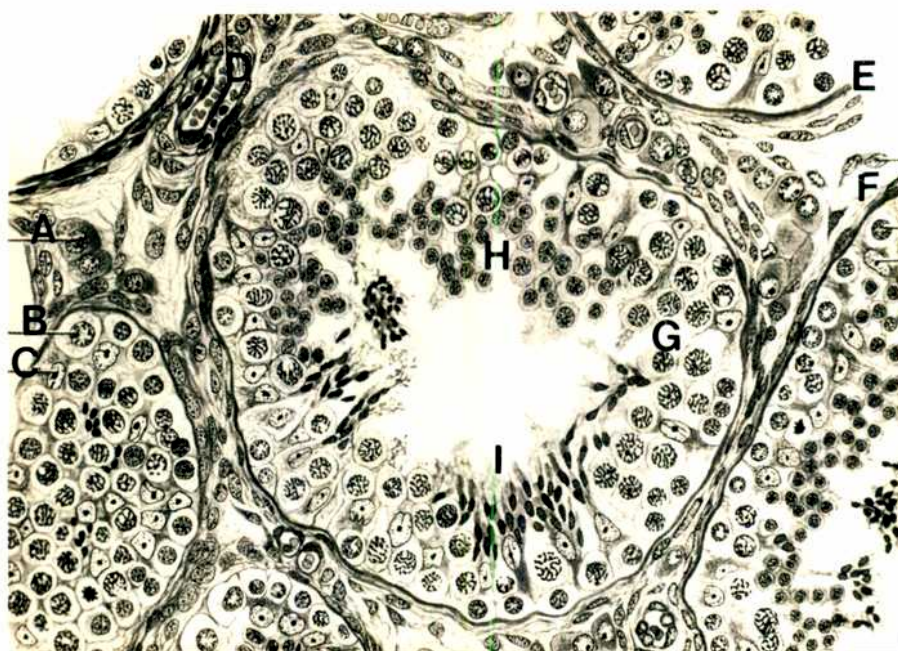
Fig. 1. Esquema de la disposición de los túbulos seminíferos y los conductos excretores en el testículo y en el epidídimo. (Tomado de Maximow, A.A y Bloom, W. Tratado de Histología, Ed. Labor, 1960)

- El tejido intersticial que ocupa el espacio entre los túbulos seminíferos, se halla compuesto por células de Leydig y células precursoras de las mismas, una extensa red de vasos sanguíneos y linfáticos, numerosos macrófagos, mastocitos y algunos linfocitos (fig. 2). En el testículo adulto las células de Leydig comprenden sólo el 10% de la población celular total (Bascom, 1925).

Desarrollo pre y post-natal de la gonada masculina

La gonada embrionaria está compuesta por elementos que poseen distintos orígenes: los elementos somáticos se originan de un engrosamiento del epitelio celómico y de una condensación del blastema mesonéfrico y las células germinales primordiales se originan fuera de la gonada, en el endodermo del saco vitelino, pero migran hacia ella durante la vida embrionaria.

Durante la migración, las células germinales primordiales se dividen y dicha actividad continúa aún dentro de la cresta genital. Durante el desarrollo de la gonada el proceso de diferenciación sexual prosigue y en el caso del testículo se organizan los cordones que darán



- A: célula de Leydig
- B: espermatogonia
- C: célula de Seroli
- D: vaso sanguíneo
- E: pared tubular
- F: célula precursora mesenquimática
- G: espermatocitos primarios
- H: espermátides redondas
- I: espermátides elongadas

Fig. 2. Corte de un testículo humano. X 170.
 (Tomado de Maximow, A.A y Bloom W. Tratado de
 Histología, Ed. Labor, 1960)

origen a los túbulos seminíferos. Las células germinales primitivas (gonocitos) se hallan localizadas dentro de estos cordones. En esta etapa del desarrollo los túbulos seminíferos contienen células de sostén, precursoras de las células de Sertoli y gonocitos.

El mesénquima que rodea a los túbulos seminíferos se diferencia en tejido conectivo que se extiende hasta la túnica albugínea. En este tejido se diferencian las células de Leydig. En el embrión humano, éstas adquieren las características estructurales y luego la capacidad de convertir precursores esteroideos a testosterona entre las 12 y 13 semanas de gestación.

En determinados animales de laboratorio como por ejemplo la rata, inmediatamente luego del nacimiento comienza a aumentar el peso testicular y continúa incrementándose hasta alcanzar el tamaño que tendrá en el animal adulto. Este incremento se asocia con un aumento en el diámetro y longitud tubular y con el comienzo de la espermatogénesis que ocurre aproximadamente a los 5 días de vida. Queda aún poco claro, si en el humano, el desarrollo de las células de Leydig precede al crecimiento de los túbulos seminíferos. En la rata, las células de Leydig fetales degeneran o se atrofian luego del nacimiento

(Clegg, 1966; Roosen-Runge y Anderson, 1959) y vuelven a aparecer como elementos adultos en la cuarta semana de vida cuando el crecimiento testicular progresa marcadamente.

Desarrollo del epitelio seminífero

El epitelio seminífero del testículo fetal está compuesto por dos tipos celulares morfológicamente distintos: los gonocitos (originados en las células germinales primordiales) y las células de sostén (precursoras de las células de Sertoli).

Ambos despliegan una actividad mitótica intensa durante la vida fetal. Existe cierta controversia en lo que se refiere al origen de las células germinales definitivas. Algunos investigadores sugirieron que los gonocitos degeneran en el testículo post-natal y que la línea germinal definitiva se forma a partir de células de tipo epitelial indiferenciadas (Allen, 1918, 1949). Sin embargo, trabajos más recientes proveen evidencias concluyentes que indican que las células germinales provienen de los gonocitos (Clermont y Perey, 1957b; Beaumont y Mandl, 1963; Huckins, 1963; Roosen-Runge, 1962; Roosen-Runge y Leik, 1968; Sapsford, 1962).

Esta última hipótesis es ampliamente aceptada y constituye la base para el estudio de la cinética de iniciación de la espermatogénesis durante la pubertad.

Espermatogénesis y ciclo del epitelio seminífero

El hallazgo de que los espermatozoides se desarrollan a partir de células localizadas en el testículo, constituyó el punto de partida para el estudio de las características morfológicas del túbulo seminífero y para la descripción de la espermatogénesis como un proceso ordenado y bien definido.

Una vez que los diferentes tipos de células germinales fueron clasificados, se concluyó que las espermatogonias se dividen para formar espermatoцитos primarios los cuales por división meiótica dan células haploides, las espermátides. Las espermátides se transforman en espermatozoides a través del proceso denominado espermiogénesis el cual constituye una complicada metamorfosis que involucra modificaciones estructurales del núcleo, y complejos cambios de las organelas preexistentes con adquisición de mecanismos que le permiten a la célula la motilidad independiente y

direccional. Leblond y Clermont, (1952a), utilizando la técnica de coloración de PAS observaron cambios morfológicos en el acrosoma de las espermátides de rata, los cuales se hallaban directamente relacionados con el grado de desarrollo de las mismas y describieron las 19 etapas que conforman la espermiogénesis. Los distintos tipos de células localizadas en el epitelio seminífero forman asociaciones celulares bien definidas que se suceden cíclicamente en un área dada del túbulo seminífero. Cada secuencia completa de cambios entre dos asociaciones idénticas constituye un ciclo espermatogénico (Leblond y Clermont, 1952b). En la rata, el ciclo espermatogénico completo consiste en 14 asociaciones celulares características denominadas "estadios" del ciclo los cuales son designados con números romanos: I al XIV (fig. 3).

Von Ebner (1871), formuló el concepto de onda del epitelio seminífero perfeccionado posteriormente por Regaud (1901). Más recientemente este concepto fue confirmado y definido con gran precisión en los túbulos seminíferos del testículo de la rata (Perey y cols., 1961). Análisis exhaustivos de las asociaciones celulares a lo largo de segmentos de túbulos seminíferos revelaron que los estadios del ciclo se hallan dispuestos en un orden consecutivo de modo tal que segmentos adyacentes se encuentran en una etapa de su desarrollo anterior o posterior a la del

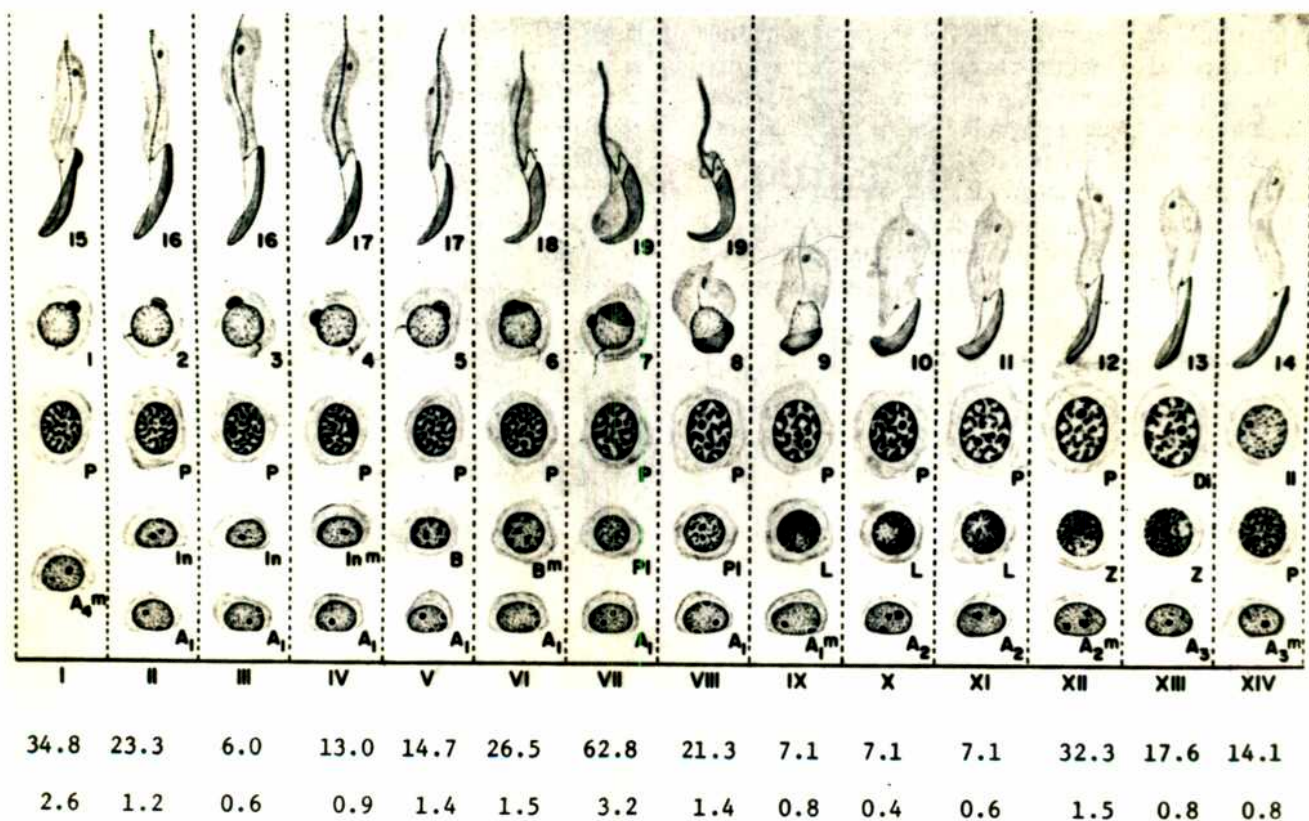


Fig. 3. Ciclo espermatogénico de la rata. En cada estadio (números romanos, columnas verticales) existe una asociación celular característica del mismo. (Tomado de Leblond, C.P. y Clermont, Y., 1952 b). Los números arábigos que figuran en dos renglones en la parte inferior de la figura corresponden a la duración en horas y a la longitud en milímetros de cada uno de los estadios del ciclo. (Tomado de Parvinen, M., 1982)

segmento vecino y que el desarrollo ocurre en una sola dirección. La longitud de los segmentos es, sin embargo, variable. El orden secuencial es interrumpido ocasionalmente en una corta distancia dando lugar a las llamadas modulaciones. El proceso completo de la espermatogénesis en la rata requiere cuatro ciclos del epitelio seminífero. Mediante la técnica de marcación de espermatoцитos preleptoténicos con ^3H -timidina, Clermont y cols. (1959) calcularon la duración de este proceso en la rata Sherman, siendo ésta de 48 días.

Se halla bien documentado el control de la espermatogénesis por la FSH hipofisaria y por los andrógenos provenientes de las células de Leydig. Los componentes somáticos del epitelio seminífero, las células de Sertoli, son el principal blanco de estas hormonas. Recientemente se ha demostrado que además de la acción hormonal sobre la célula de Sertoli, existen mecanismos regulatorios locales que involucran la interacción células de Sertoli-germinales, que modularían la respuesta de la célula de Sertoli a las hormonas mencionadas. Se han abierto nuevas posibilidades en el terreno de los estudios bioquímicos de estas interacciones gracias al desarrollo de la microdissección de túbulos seminíferos por la técnica de transiluminación (Parvinen y Vanha-Pertulla, 1972). Esta

metodología permite la recolección de segmentos tubulares de los distintos estadios del ciclo en los cuales se mantiene intacta la relación normal entre células de Sertoli y germinales, evitando la contaminación con células de Leydig. Esta técnica constituye una herramienta muy importante en el estudio de la regulación del epitelio seminífero y brinda la posibilidad de analizar cambios cíclicos de determinados parámetros tubulares (Parvinen, 1982; Parvinen y Ruokonen, 1982).

La célula de Sertoli

Descrita por primera vez por Sertoli (1865), este elemento celular no germinal fue considerado como "nursing cell" para el epitelio germinal. Investigaciones más recientes, a nivel ultraestructural, aportaron una información más detallada sobre el posible papel de estas células (Vilar y cols., 1962; Fawcett y cols., 1969). Se ha demostrado que la célula de Sertoli está involucrada en el transporte soluble a través del epitelio germinal y en la creación de compartimentos estructurales y funcionales dentro del epitelio seminífero. Existe una relación íntima entre células de Sertoli dada por la presencia de uniones altamente especializadas. La población sertoliana en el

testículo adulto es estable dado que no se observa actividad mitótica en ratas desde los 15 a 18 días. Se hallan distribuidas al azar y su número es constante a lo largo de la membrana basal del túbulo seminífero en todos los estadios del ciclo (Bustos-Obregón, 1970). Debido a esta característica estas células son utilizadas como punto de referencia o factor de corrección en estudios cuantitativos del epitelio germinal.

Crecimiento y diferenciación de las células de Leydig

Se ha establecido que la morfología y función de las células de Leydig del testículo adulto se hallan reguladas por la gonadotropina hipofisaria LH. Durante el desarrollo prenatal y postnatal las células de Leydig muestran un complicado patrón de crecimiento caracterizado por períodos de intensa actividad mitótica, de diferenciación morfológica y de degeneración. Se halla claramente demostrado que dichas células constituyen la mayor fuente de andrógenos testiculares (Christensen y Mason, 1965; Steinberger y cols., 1970).

La gran abundancia de retículo endoplásmico liso que existe en las células de Leydig de una gran variedad de especies refleja que dicha organela se halla involucrada en la síntesis de hormonas esteroideas, particularmente en la producción de colesterol que constituye la materia prima para la síntesis hormonal. Christensen y Mason (1965) relacionaron la abundancia de retículo endoplásmico liso con la capacidad de la célula de Leydig de sintetizar colesterol "de novo", basándose en el hallazgo de enzimas sintetizadoras de colesterol localizadas en la fracción microsomal (que incluye al retículo endoplásmico liso) de los homogenatos testiculares.

La conversión del colesterol a pregnenolona tiene lugar en la mitocondria e involucra la ruptura de la cadena lateral del colesterol constituyendo el paso limitante en la síntesis de andrógenos. Está descrito que la LH estimula la esteroidogénesis acelerando esta etapa (Hall, 1963, 1966; Hall y cols., 1964).

En el retículo endoplásmico liso ocurre la transformación de pregnenolona a testosterona utilizando como vía preferencial aquélla que tiene como intermediaria a la progesterona.

Dado que las células de Leydig son consideradas como las principales células testiculares productoras de esteroides, la presencia de T y sus precursores en la sangre venosa testicular es atribuida a la actividad secretora de este tipo celular.

En la mayoría de los mamíferos se han identificado dos ondas en el proceso de diferenciación de las células de Leydig. La primera transcurre durante la vida fetal bajo la estimulación de la gonadotropina coriónica del tejido trofoblástico y la segunda ocurre en la pubertad bajo el control de la LH hipofisaria (Mancini y cols., 1963; Gondos y cols., 1976).

Durante el desarrollo post-natal del intersticio testicular del toro, Hooker, (1944) observó que las células de Leydig se diferencian a partir de células mesenquimáticas intertubulares. Esta transformación involucra cambios en el núcleo y en el citoplasma. El período de tiempo en que ocurre la diferenciación de las células de Leydig va acompañado por un aumento en el contenido androgénico del testículo.

Estudios morfológicos realizados por Roosen-Runge y Anderson, (1959) en el testículo de la rata, revelaron la existencia de dos fases en el desarrollo de las células de

Leydig. La primera de ellas tiene lugar durante la vida intrauterina; la diferenciación de las células comienza en el día 15 y hasta el día 19 se observa una rápida multiplicación y diferenciación de las mismas, momento en el cual alcanzan un pico máximo en su desarrollo cuantitativo en relación al tamaño de la gonada. A partir del día 19 y hasta el nacimiento la diferenciación continúa pero declina la velocidad del crecimiento. Luego del nacimiento se observa una drástica regresión y hacia el día 4 comienza un período de crecimiento lento durante el cual hay poca diferenciación. Este proceso de maduración del intersticio se acelera y se torna muy activo en la tercera semana de vida y continúa hasta la edad adulta. Este patrón bifásico fue interpretado como correspondiendo a la existencia de dos generaciones celulares: una fetal y una adulta. Este concepto se halla también sustentado por estudios citoquímicos que demuestran que las actividades de ciertas enzimas siguen un modelo similar (Niemi e Ikonen, 1963).

Estas células de Leydig que aparecen en dos períodos de la vida muy distintos tienen diferentes características en cuanto a propiedades tintoriales, a ordenamiento dentro del espacio intertubular y en relación a los vasos sanguíneos y posiblemente en su capacidad de secretar andrógenos. Según Roosen-Runge y Anderson, (1959) es muy

difícil saber si las células de Leydig que funcionan en el testículo adulto son las mismas que las que se encuentran en la gonada fetal. Estos autores consideran que se trata probablemente de una única célula de Leydig que funciona en forma diferente de acuerdo a las demandas del entorno que cambia durante el crecimiento del organismo. Sin embargo, resultados posteriores (Lording y de Kretser, 1972) indican que las diferencias en las características histoquímicas y ultraestructurales de las células de cada fase se deben a la presencia de dos tipos celulares diferentes. Asimismo, ha sido descrito en el testículo humano, la existencia de dos ciclos de crecimiento, diferenciación e involución de las células de Leydig (Mancini y cols., 1963) uno fetal y otro puberal. Las células de ambas generaciones se originarían por la diferenciación progresiva de fibroblastos precursores y poseerían actividad de síntesis y secreción de esteroides constituyendo dos poblaciones celulares diferentes.

Control hormonal de la función testicular

El testículo realiza dos funciones básicas:

- producción exócrina de espermatozoides
- secreción endócrina de hormonas androgénicas, principalmente T.

A principios del siglo XIX numerosos estudios sugirieron que el daño del área hipotálamo-hipofisaria resultaba en una atrofia de los órganos reproductores. En una serie de experimentos que involucran ablación de la hipófisis y terapia sustitutiva, Smith, (1927, 1930) demostró la importancia de la glándula pituitaria en la función testicular normal. Estos hallazgos fueron rápidamente confirmados por otros autores y se concluyó que tanto la función endócrina del testículo como la exócrina se hallan bajo el control de las gonadotrofinas hipofisarias. Greep y cols. (1936) y Greep y Févold (1937) propusieron que la FSH regula la espermatogénesis y la LH controla el crecimiento y la secreción androgénica de las células de Leydig. La LH hipofisaria se halla emparentada con la gonadotrofina coriónica humana (hCG), de origen placentario, y como toda hormona proteica produce una respuesta biológica mediante su interacción con sitios receptores de alta afinidad localizados en la membrana plasmática de la célula efectora. Los sitios de unión de la LH presentan una alta especificidad por la hCG y por ende ambas hormonas interactúan con el mismo receptor de membrana produciendo una respuesta idéntica (Catt y Dufau, 1976). La única diferencia funcional que existe entre ellas es la vida media más larga que posee la hCG en el plasma (Hsueh y cols., 1977) pero este hecho no modifica la idéntica capacidad de estas dos hormonas en inducir la

hiperplasia de las células de Leydig. La LH/hCG induce dos tipos de respuesta sobre estas últimas: una de tipo trófica estimulando el aumento del número y tamaño de las células intersticiales y otra respuesta de tipo aguda que involucra la producción y secreción de andrógenos testiculares.

Pese a que los niveles de LH aumentan gradualmente desde el nacimiento, la capacidad de síntesis de T describe una curva bifásica. Los testículos de los animales recién nacidos producen activamente T, fenómeno que declina con la edad produciéndose un nadir alrededor del día 20 de vida, edad a partir de la cual comienzan nuevamente a incrementarse los niveles de T como andrógeno predominante, manteniéndose hasta la edad adulta. La disminución de la producción de T observada luego del nacimiento, se ha atribuido a una metabolización de la misma a andrógenos 5 α -reducidos.

Como se mencionó previamente se acepta que las células de Leydig constituyen la fuente principal de producción de T por el testículo. Sin embargo, pese a que clásicamente se consideraba que sólo las células de Leydig maduras eran esteroideogénicamente competentes, se ha demostrado en precursores fibroblásticos, la existencia de algunas enzimas y lípidos que indicarían la capacidad funcional de estos tipos celulares. En efecto, investigaciones recientes

(Chemes y cols., 1985) indican que, en el testículo humano, los fibroblastos precursores son esteroidogénicamente activos produciendo T en condiciones basales y respondiendo a la estimulación con hCG mediante un aumento rápido de la T intratesticular.

Se halla ampliamente aceptado que el desarrollo y mantenimiento del tejido testicular intersticial depende de la LH. El aumento en el número de células de Leydig diferenciadas observado en ratas inmaduras sometidas al impacto de la hCG es debido a la capacidad de esta hormona en promover el aumento de las mitosis de las células de Leydig pre-existentes y por otro lado de estimular el proceso de diferenciación de los fibroblastos precursores (Chemes y cols., 1976a). El tratamiento crónico de ratas adultas con una alta dosis de hCG produce un incremento en el volumen de los agregados de células de Leydig debido a una hiperplasia de estas células que predomina sobre la hipertrofia de las mismas (Christensen y Peacock, 1980).

Aún cuando la gonadotropina coriónica ejerce un efecto trófico sobre las células del intersticio testicular, y en bajas concentraciones es capaz de mantener la funcionalidad de estas células, la elevación de los niveles plasmáticos de LH por la administración de LH-RH o gonadotropina exógena (hCG) tiene en la rata adulta un marcado efecto

negativo sobre los receptores testiculares de LH y la subsiguiente respuesta esteroidogénica (Hsueh y cols., 1976; 1977; Sharpe 1976; Tsuruhara y cols., 1977; Chen y cols., 1977; Haour y cols., 1977; Dufau y cols., 1978, 1979; Catt y cols., 1979).

Este fenómeno llamado de "desensibilización" testicular es común a muchas hormonas proteicas y nos referiremos a él, con más detalle, en la discusión del presente trabajo. Brevemente, durante la re-estimulación in vitro con hCG de testículos pretratados con la misma hormona se demuestra una caída de los receptores de LH con una pérdida concomitante de la respuesta del AMP cíclico. La depleción de receptores se halla acompañada por una segunda lesión que involucra a enzimas de la vía esteroidogénica y que conduce a una producción disminuida de T. Esto genera una acumulación de progesterona y 17 OH progesterona lo cual refleja un bloqueo a nivel de las enzimas 17 α hidroxilasa y 17-20 desmolasa (Cigorruga y cols., 1978). La desensibilización testicular tan claramente descrita en el animal adulto, presenta cierta controversia en cuanto a su existencia en la rata en maduración. Algunas investigaciones demuestran la aparente ausencia de este fenómeno en el animal neonatal (Huhtaniemi y cols., 1981, 1982, 1983) mientras que otros autores describen la presencia del mismo y le asignan un carácter

transitorio (Moger, 1980; Cheng, 1986). Sin embargo, es llamativa la carencia de información concerniente a las posibles modificaciones estructurales de los túbulos seminíferos que puedan acompañar a este interesante fenómeno. Existen en la literatura algunas referencias a la presencia de lesiones en los túbulos seminíferos del testículo humano y animal inducidas por tratamientos crónicos con hCG (Maddock y Nelson, 1952; Chemes y cols., 1976b; Cusan y cols., 1982).

OBJETIVOS DE LA PRESENTE INVESTIGACION

La información presentada resumiría el conocimiento actual sobre la acción de la LH/hCG sobre el intersticio testicular. Muy poco se conoce sobre la posible interacción de esta hormona con el túbulo seminífero. Por otra parte, observaciones no publicadas (Charreau y Chemes) revelaron la existencia de alteraciones morfológicas en los túbulos seminíferos de ratas adultas sometidas a un impacto agudo con hCG que coinciden temporalmente con el proceso de desensibilización de las células de Leydig. Este hallazgo nos llevó a estudiar detalladamente las modificaciones estructurales, el entorno hormonal y los mecanismos fisiopatológicos que acompañan a este fenómeno, con el objeto de aclarar cuál es la consecuencia sobre los túbulos seminíferos del tratamiento con hCG. Asimismo nos pareció interesante analizar la posible acción directa de esta hormona sobre la fracción tubular. Para ello utilizamos la técnica de transiluminación que posibilita la separación de túbulos seminíferos en los distintos estadios del ciclo espermatogénico. En fracciones de túbulos seminíferos en distintos estadios del ciclo se intentó entonces determinar la posible existencia de sitios de unión de LH/hCG.

El fenómeno de desensibilización de las células de Leydig maduras, que ha sido exhaustivamente analizado por numerosos grupos de investigadores, no será tratado en detalle en el presente estudio en el que se explorará en forma sistemática la ontogenia de la respuesta testicular a la inyección aguda de hCG. Esto se realizará mediante la medición de la producción de andrógenos "in vitro" en testículos provenientes de animales control y pretratados con hCG, en condiciones basales y de estimulación gonadotrófica, así como la determinación de receptores de LH en los mismos grupos experimentales. Asimismo se realizará un examen cuantitativo de las distintas poblaciones celulares intersticiales presentes en cada edad.

La utilización de modelos animales para llevar a cabo nuestros objetivos pretende ahondar en el conocimiento de mecanismos normales e intenta, por medio de manipulaciones experimentales, reproducir situaciones que nos permitan entender algunos aspectos de la fisiología y patología testicular en humanos.

La gonadotrofina coriónica humana (hCG) es corrientemente utilizada en la terapéutica de diversas enfermedades infantiles (testículo no descendido) y de adultos (esterilidad). Este fue otro de los motivos de

nuestro interés en aclarar algunos aspectos poco conocidos de la acción de esta hormona y para ello realizamos el estudio que se detalla a continuación.

MATERIALES
Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

PARTE A. LESIONES DEL TUBULO SEMINIFERO PRODUCIDAS POR EL TRATAMIENTO CON hCG. CARACTERIZACION Y MECANISMOS FISIOPATOLOGICOS INVOLUCRADOS

A.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho adultas (de 80 a 90 días de edad) de la cepa Sherman (Rattus norvegicus, variedad Sherman: endocría Laboratorio Elea). Los animales fueron mantenidos a temperatura constante (25°C) bajo un régimen lumínico de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, recibiendo dieta balanceada y agua "ad libitum". Para cada grupo experimental se utilizaron de 5 a 8 animales.

A.2. Hormonas utilizadas y vías de administración

Las hormonas utilizadas fueron las siguientes:

- Gonadotropina coriónica humana (hCG), (Endocorion, Lab. Elea).
- Gonadotropina coriónica humana altamente purificada

(p hCG; 11500 UI/mg) gentilmente cedida por el Dr. Passeron, Lab. Elea.

- Hormona folículo-estimulante humana (p FSH), (75 UI FSH/1 UI de LH) (Metrodine, Lab. Serono).
- Benzoato de estradiol (BE₂) disuelto en aceite de girasol, gentilmente cedido por el Dr. Montuori, Lab. Gador.

Todas las hormonas fueron administradas por vía subcutánea (SC) y el BE₂ fue también inyectado, según el esquema experimental, en forma intratesticular (IT).

A.3. Diseño experimental

I) Tratamiento de los animales con hCG y p hCG

Un grupo de animales fue tratado con una única dosis de 100 UI de hCG, un segundo grupo fue inyectado con una dosis idéntica de p hCG y un tercer grupo considerado como control no recibió ningún tratamiento.

Luego de 3 días de efectuado el tratamiento, los animales fueron pesados y sacrificados por decapitación. La sangre troncal fue recogida y el suero obtenido almacenado

a -20°C para la posterior determinación radioinmunológica de T.

Los testículos y glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales y próstata ventral) fueron cuidadosamente extraídos y pesados. Uno de los testículos de cada animal fue procesado histológicamente para su estudio por microscopía óptica.

Este procedimiento fue realizado en cada uno de los experimentos que se detallan a continuación y por lo tanto no será enunciado en cada oportunidad.

II) Tratamiento de los animales con diferentes dosis de hCG por períodos de tiempo variable

Tres grupos de animales fueron inyectados con una única dosis de 200 UI de hCG y sacrificados a los 2, 3 y 5 días del tratamiento respectivamente. Un cuarto grupo fue tratado con una dosis de 400 UI de hCG y sacrificado 3 días después. El grupo control no recibió ningún tratamiento.

Los animales fueron pesados y luego anestesiados con éter. La extracción de sangre fue realizada por punción cardíaca y el suero obtenido almacenado a -20°C para la posterior determinación radioinmunológica de T.

III) Tratamiento de los animales con una dosis alta de hCG a intervalos de tiempos cortos. Estudio del entorno hormonal

Se evaluó el efecto de la hormona a intervalos de tiempos cortos luego de la inyección de la misma. Estos tiempos fueron: 6, 12, 24 y 48 horas respectivamente. El grupo control no recibió ningún tratamiento.

Los animales fueron pesados y luego anestesiados con éter. La extracción de sangre fue realizada por punción cardíaca y el suero obtenido almacenado a -20°C para la determinación radioinmunológica de T, FSH y E_2 .

IV) Estudio de la reversibilidad de la lesión tubular

Con el propósito de analizar la posible reversibilidad de este proceso, un grupo de animales fue inyectado con una dosis única de 200 UI de hCG y sacrificado tres meses luego del tratamiento. Un grupo similar no recibió tratamiento hormonal (grupo control).

En cada animal, se realizó el análisis histológico de uno de los testículos con el objeto de explorar la presencia de lesiones en los túbulos seminíferos.

V) Tratamiento de los animales con hCG y hCG + FSH purificada

Un grupo de animales fue inyectado con una dosis única de 200 UI de hCG y los animales fueron sacrificados a las 24 horas del tratamiento. Otro grupo recibió una única dosis de 200 UI de hCG, y 20 UI de pFSH cada 12 horas, y fue sacrificado al mismo tiempo que el grupo anterior.

Los animales fueron anestesiados con éter y la sangre obtenida por punción cardíaca. El suero fue almacenado a -20°C para la determinación radioinmunológica de FSH.

VI) Tratamiento de los animales con benzoato de estradiol por vía subcutánea e intratesticular

Dos grupos de animales fueron inyectados (SC) con una solución de 50 µg y 200 µg de BE₂ en aceite de girasol por día respectivamente. El grupo control recibió un volumen idéntico de vehículo (0.5 ml de aceite de girasol).

Dos grupos de animales fueron tratados con inyecciones intratesticulares bilaterales de BE₂. El primer grupo recibió una dosis de 2 ng en 20 µl de aceite de girasol. El segundo fue inyectado con 4 ng en igual volumen de vehículo. Los animales controles recibieron inyecciones intratesticulares bilaterales de 20 µl de aceite de girasol. El esteroide fue administrado en un volumen lo suficientemente pequeño como para prevenir distorsiones mecánicas producidas por alta presión intratesticular.

Todos los animales fueron sacrificados a las 48 horas del comienzo del tratamiento. Luego del sacrificio ambos testículos fueron extirpados y procesados histológicamente para su estudio de microscopía óptica.

A.4. Procesamiento y análisis histológicos

En cada uno de los diseños experimentales que se detallaron, el procedimiento fue el siguiente: una vez extraídos, los testículos fueron inmediatamente fijados por inmersión en solución de Bouin alcohólico (picro-formol-aceto-alcohólica) previa sección de ambos polos testiculares para facilitar la penetración del fijador. 30 minutos más tarde se cortaron de 2 a 4 secciones transversales de la región ecuatorial del testículo y se prosiguió con la fijación por dos horas más. Las secciones fueron luego deshidratadas por tratamiento con soluciones de etanol de concentraciones crecientes, aclaradas en xilol e incluidas en parafina. Las piezas incluidas fueron cortadas en un micrótopo Reichert tipo rotatorio en secciones de 5 a 7 μm de espesor y coloreadas con hematoxilina-eosina y PAS-hematoxilina.

Con el objeto de cuantificar el daño existente en cada individuo de los diferentes grupos experimentales, se realizó un barrido de los preparados histológicos correspondientes a cada animal. Todos los túbulos seminíferos que integran el corte entero del testículo, realizado en el plano ecuatorial, fueron evaluados. Esto se llevó a cabo mediante la proyección de los preparados histológicos y el calcado del contorno de todos los túbulos

seminíferos (aprox. 500) que aparecen en cada corte. Este método permitió confeccionar mapas del testículo, los cuales luego fueron cotejados con su correspondiente preparado histológico con el fin de analizar la distribución topográfica de las áreas afectadas y calcular el porcentaje de túbulos seminíferos lesionados. Asimismo se realizó la caracterización de la lesión desde el punto de vista morfológico, estableciendo los criterios de daño.

Por otro lado, se analizó la posibilidad de que exista un efecto deletéreo preferencial de la hCG sobre determinados estadios del ciclo espermatogénico. En la rata las células que integran el epitelio germinal de los túbulos seminíferos, espermatogonias, espermatocitos y espermátides, no se hallan distribuidas al azar sino formando 14 asociaciones celulares bien determinadas (Leblond y Clermont, 1952b). Utilizando la coloración de PAS que permite visualizar la evolución del aparato acrosomal de las espermátides, fue posible clasificar a cada túbulo seminífero dentro de los 14 estadios que conforman el ciclo espermatogénico (Leblond y Clermont, 1952b; Clermont y Perey, 1957a). De esta manera se determinó la distribución porcentual del daño tubular en cada uno de los mencionados estadios.

La respuesta al tratamiento hormonal del tejido intersticial fue evaluada en forma cualitativa.

A.5. Separación de túbulos seminíferos por la técnica de transiluminación

La variabilidad en la composición celular de los distintos estadios del ciclo, se traduce en diferencias de absorción de la luz cuando los túbulos seminíferos son estudiados por transiluminación (Parvinen y Vanha-Perttula, 1972).

Se puso a punto la técnica de Parvinen y Vanha - Perttula utilizando ratas macho adultas sacrificadas por dislocación cervical.

En cada animal se extirparon los testículos, se decapsularon y se colocaron en buffer fosfo-salino frío. Por disección manual los túbulos seminíferos fueron separados del tejido intersticial. Los túbulos fueron colocados en una caja de Petri conteniendo buffer y estudiados por transiluminación en un estereo-microscopio a 25 X.

De este modo se pueden distinguir 4 zonas diferentes a lo largo de los túbulos seminíferos, dependiendo de la composición celular de cada estadio (fig. 4):

- Transición de una zona oscura a pálida, la cual corresponde al momento de la espermiación: límite entre estadios VIII y IX.
- Zona clara, dada por la presencia de espermátides elongadas no dispuestas en grupos, lo cual se refleja en una pálida absorción de la luz: estadios IX al XII.
- Zona punteada clara: ya al finalizar el estadio XII las espermátides se disponen en grupos o manojos asociados a las células de Sertoli, aumentando la condensación nuclear, lo cual resulta en una absorción que puede ser reconocida como un punteado pálido: estadios XIII-XIV-I.
- Zona punteada oscura, aumenta la densidad de los manojos de espermátides, los que se desplazan hacia el lumen del túbulo seminífero: estadios II al VI.
- Zona oscura: homogénea en el centro del túbulo debido a la disposición de las espermátides formando una capa continua hacia la luz: estadios VII y VIII.

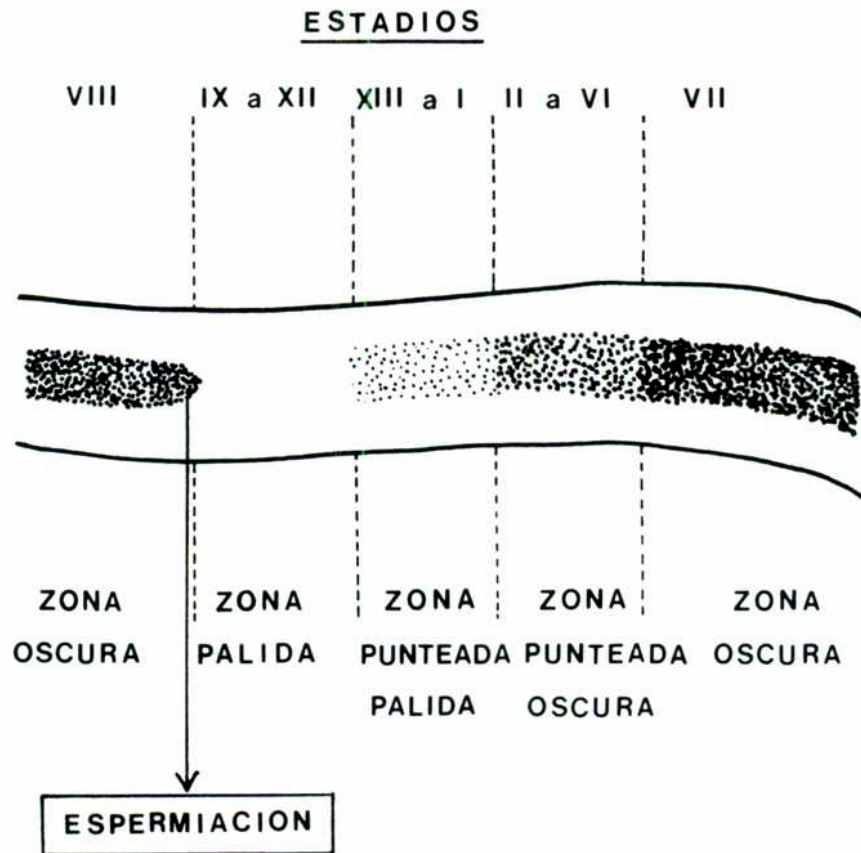


Fig. 4 Esquema del patrón de absorción de un túbulo seminífero estudiado por transiluminación y su relación con los estadios del ciclo espermatogénico.

De acuerdo a este patrón de absorción se procedió a la microdisección de segmentos tubulares de 2 mm de longitud, que contienen cada una de las cuatro zonas mencionadas. La exactitud del procedimiento de disección fue controlada por estudios histológicos en parte del material obtenido (ver resultados).

A.6. Medición de receptores de LH en la fracción particu- da tubular

En el material tubular recolectado según la técnica descrita en el punto anterior, se procedió a la medición de sitios receptores de LH de acuerdo a la metodología que se detalla a continuación.

Se utilizaron 12 ratas a las cuales se les extirparon ambos testículos. Los segmentos tubulares resultantes de la separación, por la técnica de transiluminación, fueron agrupados en dos lotes: uno que abarca los estadios pre-espermiación (II al VIII) y otro los post-espermiación (IX al XIV-I). Los túbulos seminíferos de ambos lotes fueron homogenizados en cuatro volúmenes de buffer Dulbecco (PBS) pH 7,4 utilizando un homogenizador del tipo Polytron. El homogenato se filtró por Nitex (malla de poro

50) y se centrifugó a 14.000 rpm, durante 30 minutos, en una Centrífuga International, modelo B-20 refrigerada. El pellet se resuspendió en igual volumen de buffer PBS y se utilizó para determinar la posible existencia de receptores para LH.

La mezcla de incubación contenía 50 µl de hormona marcada ^{125}I -hLH (actividad específica: 50 µCi/µg; 12.500-100.000 cpm), 50 µl de BSA al 10% y 100 µl del pellet de membrana tubular. La unión inespecífica fue evaluada agregando una cantidad mil veces superior de hormona no radioactiva. La incubación se efectuó a 6°C durante toda la noche y se detuvo por dilución con 2 ml de PBS frío. Luego de la centrifugación de los tubos se determinó la radioactividad del pellet utilizando un contador gamma automático Beckman.

A.7. Determinación radioinmunológica de testosterona (T) y estradiol (E₂) séricos

Una vez obtenida la sangre de los animales se le permitió coagular y el suero se separó para las determinaciones hormonales.

Para el dosaje de cada uno de estos esteroides, una alícuota del suero fue extraída dos veces con 2 ml de éter etílico (Merck). El residuo evaporado de los extractos etéreos fue resuspendido en 0.5 ml de buffer de ensayo (Na_2HPO_4 - 0.04 M; NaH_2PO_4 . 0.03 M; azida sódica 0.015 M; NaCl 0.15 M; EDTA 10 mM y gelatina 0.1%, pH=7) y una alícuota apropiada fue utilizada para la determinación del contenido de T y E_2 .

I) Testosterona: el dosaje de T se realizó utilizando un suero anti-testosterona, obtenido por inmunización activa de conejos, a intervalos de dos semanas, con un conjugado de testosterona - BSA preparado por acoplamiento de la carboxi-metil-oxima de la testosterona a BSA. Este anticuerpo tiene una alta reacción cruzada (80%) con la DHT y por lo tanto ambos esteroides fueron determinados en forma conjunta. El suero anti-testosterona utilizado poseía una constante de afinidad de 10^{10} M^{-1} y se utilizó en una dilución apropiada (1:2.500) para ligar el 50% de la ^3H -testosterona de referencia (aprox. 10.000 cpm).

El rango de utilidad fue de 25 a 800 pg de T en un volumen final de 0.5 ml.

II) Estradiol: para su determinación se utilizó un anticuerpo altamente específico (estradiol 6 carboximetiloxima - BSA) gentilmente cedido por los Dres. K. Pirke y P. Doerr (Max Planck Institut, München): El anticuerpo fue utilizado en una dilución 1:10.000 para ligar el 50% del ³H-estradiol de referencia (aprox. 10.000 cpm). El rango de utilidad fue de 12.5 a 800 pg de E₂ en un volumen final de 0.5 ml.

La incubación se realizó durante 16 horas a 4°C y la hormona libre fue separada de la hormona unida por agregado de 0.2 ml de una suspensión de carbón (Norit A). - dextrano (dextrano 70); 0.5 - 0.05% (P/V) en buffer de ensayo respectivamente. La radioactividad se determinó, en cada caso, en un contador de centelleo líquido Beckman.

A.8. Determinación radioinmunológica de FSH sérica

La FSH fue cuantificada usando el juego de reactivos provistos por NIAMDD, Instituto Nacional de Salud, Maryland, EEUU. Se utilizó un radioinmunoanálisis por doble anticuerpo (Libertun, 1980). Para la marcación, la hormona utilizada fue NIAMDD-Rat-FSH-I-5. Se usó ¹²⁵I Na (New

England Nuclear) y la iodinación fue realizada por el método de la cloramina T limitante (Molinolo y cols., 1987).

El primer antisuero fue obtenido en conejos contra FSH purificada de rata (NIAMDD-AntiRat FSH-serum 10) y la dilución de trabajo fue 1:2.000 a 1:2.500. El standard de referencia fue FSH purificada de rata (NIAMDD-Rat-FSH-RP 1) con contaminación casi nula de LH y TSH. La curva standard se construyó con cantidades de FSH fría que variaron entre 7.8 y 1.000 ng por tubo y fueron preparados en buffer fosfatosalino con 1% de albúmina de huevo. La separación de los complejos inmunes de la hormona libre se logró usando antisuero de oveja contra globulina de conejo en una dilución aproximada 1/30 en buffer fosfatosalino (100 µl).

El protocolo de rutina fue el siguiente: el primer día se agregó el primer antisuero a los sueros, se incubó 24 horas a 4°C, se agregó la hormona marcada, se incubó nuevamente 24 horas a 4°C y finalmente se agregó el segundo anticuerpo. 48 a 72 horas más tarde se centrifugó. El sobrenadante fue aspirado y se leyó la radioactividad en el pellet (complejo hormona-anticuerpo) en un contador gamma.

PARTE B. VARIACIONES ONTOGENICAS DE LA MORFOLOGIA Y FUNCION
DEL INTERSTICIO TESTICULAR. SU RELACION CON EL
DESARROLLO DE LESIONES TUBULARES

B.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho inmaduras de la cepa Sherman (Lab. Elea). Los animales fueron mantenidos a temperatura constante (25°C) bajo un régimen lumínico de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, recibiendo dieta balanceada y agua "ad libitum".

Las edades de los animales fueron seleccionados teniendo en cuenta ciertos momentos representativos a lo largo de la maduración del epitelio germinal (Clermont y Perey, 1957b): 7 días (proliferación espermatogonial), 11 días (comienzo de la meiosis), 20 días (meiosis en desarrollo), 26 días (finalización de la meiosis y comienzo de la espermiogénesis), 35 días (espermiogénesis en desarrollo) y 45 días (espermiogénesis tardía).

Los animales más inmaduros (7 y 11 días) fueron alojados de a 10 por jaula con una madre lactante. Los restantes fueron colocados en jaulas en grupos de a 5.

B.2. Hormonas utilizadas y vías de administración

Se utilizó gonadotropina coriónica humana (hCG; 1.000 UI/ml; Endocorion, Lab.Elea), administrada en dosis únicas por vía subcutánea. Las dosis empleadas fueron calculadas, para cada edad, en base al peso de los animales y teniendo en cuenta que en ratas de 80 a 90 días de edad una dosis de 200 UI de hCG genera lesiones de los túbulos seminíferos. De este modo las dosis utilizadas fueron las siguientes: 50 UI (7 y 11 días), 100 UI (20, 26 y 35 días) y 200 UI (45 días).

Para cada edad, un grupo de animales considerado como control recibió una inyección de vehículo (buffer Dulbecco pH 7.4). El efecto de la inyección de gonadotropina fue evaluado a las 48 horas. En ese momento todos los animales fueron pesados y sacrificados por decapitación. La sangre troncal fue recogida y el suero separado para la determinación radioinmunológica de T.

B.3. Estudio ontogénico de la morfología testicular

En el momento del sacrificio, los testículos provenientes de los diferentes grupos experimentales fueron

extirpados y procesados histológicamente para su estudio de microscopía óptica según fue detallado en el punto A.4.

Se llevó a cabo un análisis morfológico de los túbulos seminíferos y del intersticio:

- Túbulos seminíferos: para evaluar cualitativamente los cambios ocurridos luego del tratamiento con hCG en las distintas edades estudiadas, se examinaron secciones ecuatoriales enteras de los testículos prestando especial atención a la presencia de lesiones tubulares, las cuales fueron consideradas de acuerdo a los criterios establecidos en el animal adulto (ver parte A). En cada caso los preparados histológicos fueron comparados con su correspondiente grupo control.

- Intersticio: se realizó un análisis morfométrico de las poblaciones celulares intersticiales mediante el conteo diferencial de células de Leydig (CL) y precursores mesenquimáticos (PM). Esta última categoría celular abarca a los precursores de las CL y a aquéllos que se hallan en transformación hacia CL diferenciadas. Las características morfológicas de todas estas células intersticiales serán descriptas con detalle en la sección de Resultados.

Las figuras mitóticas en todas las etapas de división fueron identificadas en células poligonales de tipo CL y en células elongadas de tipo fibroblásticas. Sin embargo, como fue imposible estimar en estas células el diámetro nuclear, se realizaron estimaciones cuantitativas aunque éstas no se pudieron corregir por diámetros nucleares.

Las células endoteliales de los vasos sanguíneos y los macrófagos no fueron contadas.

La cuantificación fue realizada en un microscopio Zeiss usando un objetivo plano apocromático de 100 X. Dicho procedimiento fue diseñado con el objeto de obtener información sobre la composición celular del intersticio testicular. Dado que los estudios esteroidogénicos y de receptores fueron llevados a cabo en animales de distintas edades, utilizando tejido testicular total, consideramos de importancia conocer una estimación de las posibles variaciones en la composición relativa de los PM y CL diferenciadas a lo largo de la maduración de la gonada. Esto fue realizado cuantificando 25 espacios intertubulares seleccionados al azar en el testículo de cada animal de los distintos grupos experimentales. Se determinó así el número de CL diferenciadas y PM. Estos valores fueron corregidos debido a las variaciones que pueden existir en el diámetro nuclear medio (D) y el espesor del corte (T), de acuerdo a

la ecuación de Floderus $NV = NA / D + T - 2h$, donde NA es el conteo crudo obtenido en el microscopio y h es la altura de la menor sección distinguible de un núcleo. Se asume que el valor de h es de D/10 (Christensen y Peacock, 1980).

Los valores promedio de los diámetros nucleares fueron obtenidos por la medición microscópica directa de 10 células de Leydig por sección en los animales control y tratados con hCG en cada una de las edades estudiadas. En las células de Leydig cuyos núcleos eran de forma ovoide se determinaron los diámetros mayor y menor y se calculó el promedio de ambos. Los valores obtenidos fluctuaron entre 6 y 7 μm sin variaciones debidas a la edad o al tratamiento hormonal.

En el caso de los fibroblastos no fue posible realizar una medición directa de los diámetros nucleares dado que la forma de los núcleos no es esférica. Mediante un análisis seriado se concluyó que estos núcleos son lentiformes, lo cual coincide con datos de Mendis-Handagama y cols. (1987). En estos tipos celulares se obtuvieron mediciones microscópicas de los ejes mayores y menores y se calculó el diámetro medio utilizando la fórmula $D = b + (a/E) \cdot \arccos(b/a)$ donde a y b son los semiejes mayor y menor respectivamente y E es igual a $[1 - (b/a)^2]^{1/2}$ (Elias y

cols., 1971).

El espesor de los cortes fue obtenido enfocando los mismos en la superficie superior e inferior de acuerdo al método de Christensen y Peacock (1980).

Luego de corregir los contajes celulares de acuerdo a las variaciones en diámetro nuclear y espesor del corte, se calculó en cada animal la proporción relativa de células de Leydig diferenciadas (CL) y precursores mesenquimáticos (PM) mediante el cociente entre CL y PM. El cociente R así obtenido representa una estimación de las cantidades relativas de células diferenciadas e inmaduras en cada animal y expresa el grado de madurez alcanzado por el intersticio testicular a una edad determinada o bajo diferentes condiciones experimentales.

Cuanto mayor es el valor del cociente $R = CL/PM$ mayor es la proporción de células de Leydig diferenciadas (de la generación fetal y/o adulta) en relación a sus precursores mesenquimáticos. De este modo se obtuvo un índice que refleja directamente la composición celular del intersticio, el cual constituye una herramienta para las comparaciones con el contenido de receptores testiculares y la capacidad esteroidogénica dado que representa el balance entre la población testicular de células maduras e

inmaduras. Para nuestros propósitos, resulta más adecuado expresar los resultados por este método y no utilizando los valores absolutos de CL y PM por testículo. El cociente R reúne en un solo número los valores de las distintas poblaciones celulares intersticiales el cual puede ser comparado con los datos bioquímicos.

Con el objeto de explorar posibles variaciones con la edad, se cotejaron los valores R con las distintas edades de los animales y se calculó la recta de regresión en animales controles y tratados con hCG. Las diferencias estadísticas entre estos dos grupos, a cada edad, fueron calculadas utilizando el test "t" de Student y las significaciones fueron expresadas como valores de probabilidad.

B.4. Determinación radioinmunológica de T sérica

En todos los grupos de animales se llevó a cabo la determinación radioinmunológica de T de acuerdo a la técnica descrita en el punto A.7.

B.5. Producción in vitro de andrógenos totales

(T + DHT + 3 α - diol)

Los testículos fueron obtenidos inmediatamente después de sacrificar los animales de todos los grupos experimentales por decapitación.

Las incubaciones se realizaron en medio 199 (Difco Laboratories, Detroit, MI) conteniendo 0.1% de albúmina sérica bovina (Fracción V, Sigma, St. Louis, MO) y 1-metil-isobutil-xantina (MIX) 0.1 mM (Aldrich Chemical Co. Milwaukee, WI).

En los animales de 7 y 11 días de edad se incubaron dos testículos (provenientes de dos animales diferentes) en un volumen de 2 ml del medio mencionado, para evaluar la producción de andrógenos en forma basal. Al par de testículos contralaterales se los incubó en presencia de 20 ng de LH humana (hLH) (7500 UI/mg) gentilmente provista por el Dr. P. Torgensen, Hormone Laboratory, Aker Hospitalet, Oslo, Noruega, para determinar la respuesta a la gonadotrofina.

En los animales de 20, 26, 35 y 45 días de edad, las incubaciones fueron realizadas en un volumen de 3 ml de medio y utilizando un testículo y su contralateral, en

ausencia o en presencia de LH para determinar las producciones de andrógenos basales y bajo estimulación gonadotrófica respectivamente. La incubación se llevó a cabo durante 4 horas a 37°C en un incubador Dubnoff, en una atmósfera de 95% O₂ y 5% CO₂ y con agitación constante. Finalizada la incubación, los medios fueron separados por centrifugación a 1500 xg durante 10 minutos y se tomaron alícuotas adecuadas de los sobrenadantes, que sin extracción previa, fueron utilizadas para la determinación radioinmunológica de T (+DHT) y 5 α -androstan 3 α ,17 β diol. Los resultados fueron expresados en ng de andrógenos totales/testículo. La técnica utilizada para el radioinmunoanálisis de T(+DHT) fue descrita en el punto A.7.

Para la determinación de 5 α -androstan-3 α ,17 β diol se utilizó un anticuerpo altamente específico (3 α - diol - 15 -CMO - HSA, Immunotech Diagnostic, Montreal, Canadá) en una dilución 1:4000 para ligar el 40% del andrógeno marcado. Este anticuerpo posee una muy baja reacción cruzada con otros andrógenos (5% con T y DHT y menos del 2% con otros andrógenos). El rango de utilidad fue de 12.5 a 800 pg de 3 α -diol en un volumen final de 0.5 ml.

B.6. Determinación de sitios receptores de LH en la fracción particulada testicular

Los testículos provenientes de los animales controles e inyectados con hCG fueron homogeneizados en 4 volúmenes de buffer PBS Dulbecco. La homogeneización fue realizada en un homogeneizador Polytron a 0°C. El homogeneizado se centrifugó en una centrífuga International B- 20 a 12000 rpm durante 30 minutos. El precipitado se resuspendió en igual volumen de buffer PBS, se filtró por Nitex y fue usado para determinar el número de sitios receptores de LH/hCG. Alícuotas de 100 µl de esta preparación se incubaron con 100.000 cpm de ^{125}I -hLH (act. específica 50 uCi/ug). Para evaluar la unión inespecífica se agregó un exceso de hormona fría, (100 UI, Endocorion). Se agregó albúmina hasta una concentración del 1% final. Se incubó durante 3 horas a 34°C y se detuvo la incubación con el agregado de 2 ml de PBS frío. Se centrifugó 15 minutos a 5000 rpm a 4°C y el sobrenadante se aspiró con bomba de vacío. El precipitado se contó en un contador gamma automático Beckman.

Estadística

Los datos cuantitativos fueron analizados de la siguiente manera:

- en el caso de comparaciones múltiples mediante un análisis de la varianza seguido por un test de Dunnett, el cual permite comparar a cada dato experimental con su correspondiente valor control.
- en el caso de pares de datos, mediante un test "t" de Student.
- en caso de existir diferencias significativas, éstas fueron expresadas como valores de probabilidad.

RESULTADOS

RESULTADOS

PARTE A. ACCION DE LA hCG SOBRE LOS TUBULOS SEMINIFEROS. EFECTO, CARACTERIZACION Y MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA PRODUCCION DEL DAÑO TUBULAR POR hCG

Lesiones de los túbulos seminíferos inducidas por el tratamiento con dos preparaciones de hCG de distinta pureza

Observaciones preliminares de los Dres. Charreau y Chemes realizadas en testículos de ratas adultas sometidas a un estímulo agudo con 100 UI de hCG (Pregnyl; Organón) evidenciaron en este material lesiones tubulares de variable intensidad.

Con el objeto de confirmar la existencia de dichas lesiones y demostrar que el efecto lesional observado luego del tratamiento hormonal no era debido a la presencia de posibles contaminantes en la preparación de hCG (Endocorion), sino que obedecía a la acción misma de la gonadotrofina coriónica, se comparó la acción de 100 UI hCG

con la misma dosis de gonadotrofina purificada (hCG p) sacrificando los animales a los 3 días de la inyección.

La tabla 1 reúne los pesos testiculares y de las glándulas sexuales accesorias y los valores de T sérica. El peso testicular no varió con los distintos tratamientos. Por el contrario, se observa que existe una tendencia clara al aumento de los pesos de las vesículas seminales y de la próstata en los grupos experimentales con respecto a los animales control, el cual no llega a ser estadísticamente significativo. La T sérica muestra un incremento significativo.

El análisis microscópico testicular reveló un incipiente daño a nivel de los túbulos seminíferos en los animales tratados con ambas gonadotrofinas, no hallándose diferencia morfológica alguna entre los dos tratamientos hormonales.

Estos resultados indican por lo tanto, que la preparación de hCG usada por nosotros (Endocorion, 1000 UI/ml) es una hormona útil para nuestros estudios.

TABLA 1

Pesos de órganos y niveles séricos de T en ratas tratadas con hCG (Endocorion, Elea) y hCG purificada

	Peso corporal (g)	Peso testicular (mg)	Peso vesículas seminales (mg)	Peso próstata (mg)	(ng/100 ml)
control	203.0 ± 2.0	1257.5 ± 48.7	295.0 ± 84.3	160.0 ± 22.1	281.0 ± 81.2
100 UI hCG/3d	211.7 ± 11.9	1368.7 ± 56.4	507.7 ± 53.9	224.3 ± 25.9	658.3 ± 192.4
100 UI hCGp/3d	203.8 ± 3.8	1229.8 ± 43.2	430.0 ± 87.3	187.5 ± 30.2	881.3 ± 140.5*

$\bar{X} \pm ES$

* significativamente diferentes $p < 0.05$

Caracterización del daño tubular inducido por el tratamiento con hCG

Con el fin de caracterizar el daño tubular hallado luego de la administración aguda de hCG se realizó el estudio del efecto de diferentes dosis (200 y 400 UI) y tiempos de administración de dicha gonadotrofina.

Puede observarse en la tabla 2 que no existen diferencias estadísticamente significativas en el peso de los testículos, de las vesículas seminales y de la próstata en los grupos tratados con respecto al control. Las glándulas sexuales accesorias muestran, sin embargo, una clara tendencia a aumentar como en el experimento anterior.

Como es de esperar los niveles de T sérica se incrementan significativamente a los 2 y 3 días de la administración de 200 UI y 400 UI de la gonadotrofina.

La figura 5 corresponde a una microfotografía del testículo de un animal control. En los grupos de animales tratados con 200 y 400 UI de hCG (figs. 6, 7 y 8) encontramos numerosas alteraciones en la morfología de los túbulos seminíferos cuya intensidad varía de acuerdo a cada individuo en particular. Las características de la mencionada lesión son las siguientes y pueden presentarse

TABLA 2

Pesos de órganos y niveles séricos de T en animales tratados con diversas dosis de hCG por períodos de tiempo variables

	Peso corporal (g)	Peso testicular (mg)	Peso vesículas seminales (mg)	Peso próstata (mg)	T sérica (ng/100 ml)
control	207.3 ± 1.3	1202.3 ± 64.9	316.7 ± 47.9	146.0 ± 19.1	393.7 ± 47.8
200 UI hCG/2d	214.0 ± 9.5	1224.3 ± 93.1	409.7 ± 37.6	174.0 ± 15.5	1091.7 ± 36.4 **
200 UI hCG/3d	215.0 ± 16.0	1258.3 ± 36.1	498.0 ± 43.8	206.0 ± 27.2	1166.7 ± 216.4 *
200 UI hCG/5d	217.7 ± 4.2	1160.7 ± 54.9	391.0 ± 42.8	199.3 ± 29.2	300.0 ± 50.0
400 UI hCG/3d	233.3 ± 8.8	1205.7 ± 89.8	537.0 ± 68.2	269.3 ± 30.4	729.2 ± 99.9 *

X ± ES

Significativamente diferentes * (p < 0.05) y ** (p < 0.01)

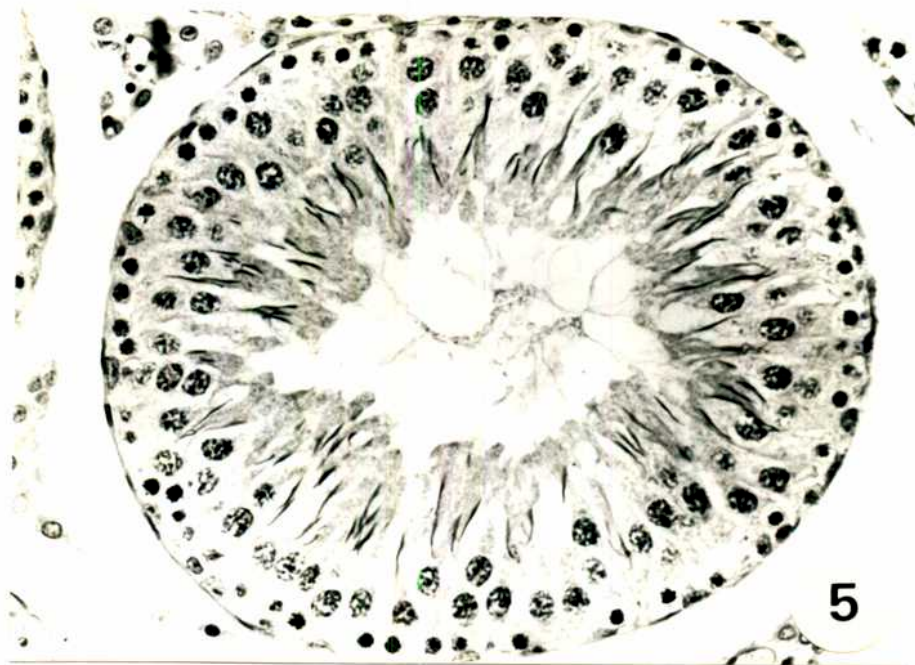
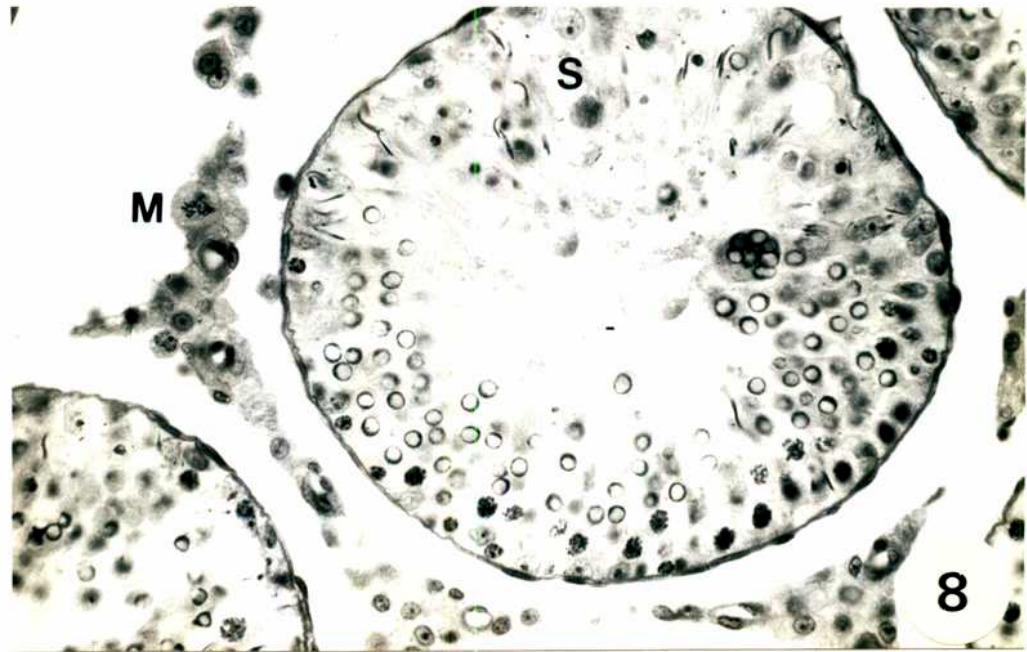
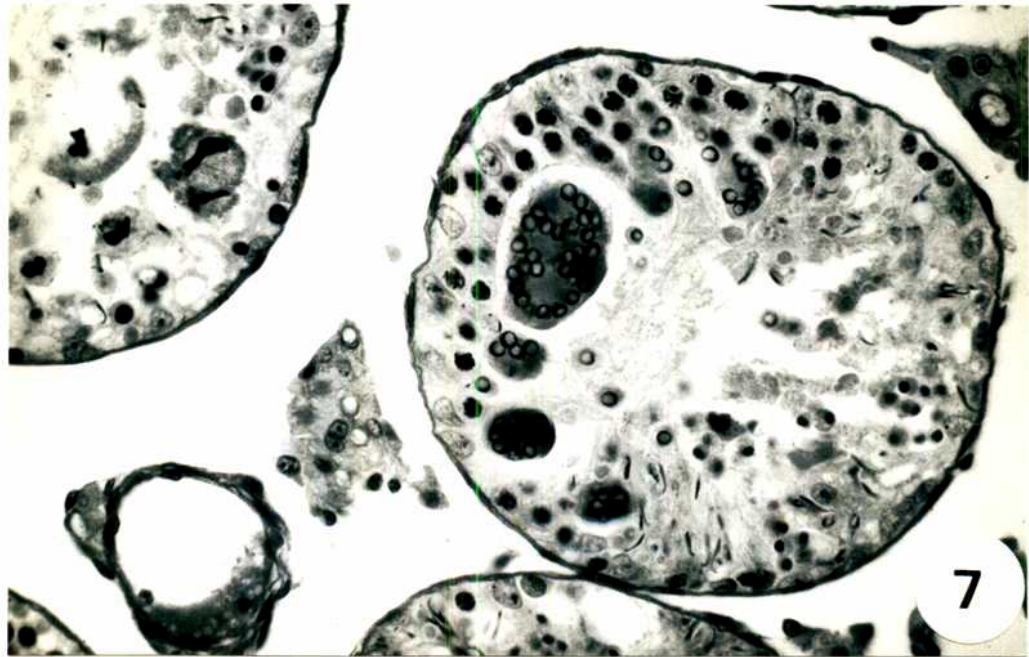


Fig. 5. Túbulo seminífero perteneciente a un animal control. Se observa la organización del epitelio germinal en el cual se distinguen dos generaciones de espermatocitos meióticos y una de espermatídes elongadas. Estadío XII. PAS-H X 350

Fig. 6. 400 UI hCG, 3 días luego de la inyección. El epitelio germinal se halla altamente desorganizado. Se evidencian áreas de necrosis (N), marginación de la cromatina de las espermatídes redondas (E), formación de células gigantes multinucleadas y parcial depleción celular. PAS-H X 360



Figs. 7 y 8. Ambas microfotografías corresponden a túbulos seminíferos de animales tratados con 200 UI hCG, 3 días luego de la inyección. Se observan las mismas alteraciones morfológicas en los túbulos seminíferos que en la Fig. 6. Cabe destacar numerosos núcleos de células de Sertoli (S) con su estructura conservada y una mitosis (M) de una célula de Leydig.
PAS-H X 390

tanto en forma aislada como más de una a la vez:

- desplazamiento marginal de la cromatina de las espermátides redondas.
- formación de células gigantes multinucleadas en espermátides o espermatocitos.
- desorganización del epitelio germinal.
- descamación masiva de células.
- áreas focales de necrosis.

Modificaciones menores, como células individuales eosinofílicas o picnóticas, no fueron tenidas en cuenta. En las áreas afectadas, la mayoría de los núcleos de las células de Sertoli mantuvieron una morfología normal aunque no es posible excluir probables alteraciones citoplasmáticas más finas no detectables por microscopía óptica.

De acuerdo a esta descripción, hemos establecido los criterios de daño los cuales serán tenidos en cuenta en los próximos experimentos.

El daño tubular descrito se halla bien instalado a los 2 días del tratamiento y mantiene las mismas características a lo largo del tiempo estudiado (5 días) independientemente de la dosis (200 ó 400 UI de hCG) administrada.

En la tabla 3 mostramos los porcentajes de túbulos dañados existentes en cada uno de los animales de los distintos grupos experimentales. Esta cuantificación fue llevada a cabo teniendo en cuenta todos los túbulos que integran el corte ecuatorial del testículo (aprox. 500) de acuerdo a la metodología descrita en la sección A 4.

No existe ninguna clase de daño en el grupo control. En los grupos tratados no se aprecian diferencias intergrupales en la intensidad de la lesión pero sí son notables las variaciones intragrupalas. En uno de los casos del grupo tratado con 400 UI de hCG, la intensidad alcanza su máxima expresión siendo su magnitud del 67%.

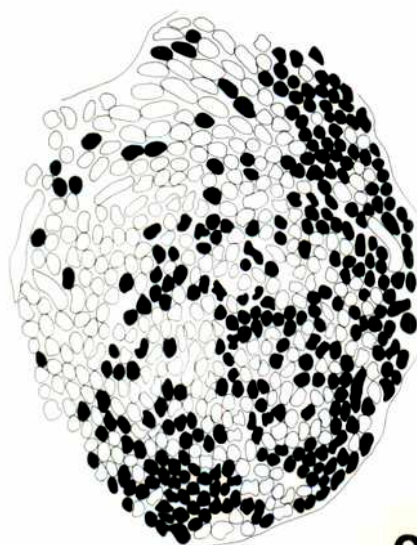
El análisis exhaustivo de los cortes enteros del testículo permitió realizar mapas de la gonada en cuanto a ubicación topográfica de las áreas afectadas. Con tal propósito para cada grupo tratado se realizó un mapeo de los túbulos seminíferos lesionados. Hemos seleccionado los mapas más significativos en los cuales representamos en blanco los túbulos normales y en negro los lesionados (figs. 9 a 12).

Observamos que el daño no involucra túbulos seminíferos aislados sino áreas enteras del testículo con

TABLA 3

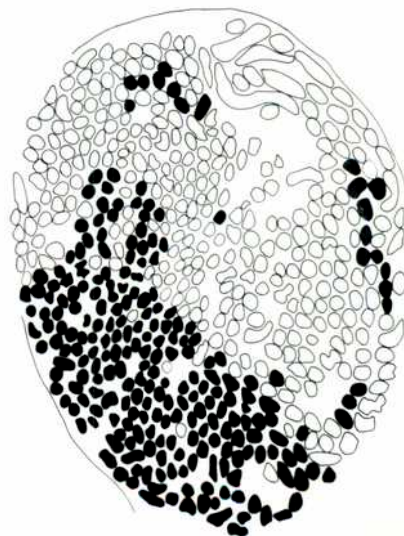
**Porcentaje de túbulos seminíferos lesionados
(valores individuales)**

	0%
CONTROL	0%
	0%
	14%
200 UI hCG/2d	48%
	47%
	44%
200 UI hCG/3d	18%
	24%
	25%
200 UI hCG/5d	2%
	42%
	67%
400 UI hCG/3d	7%
	3%



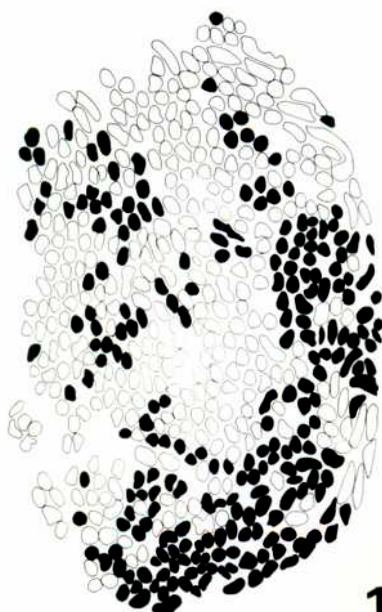
200 IU hCG /2d

9



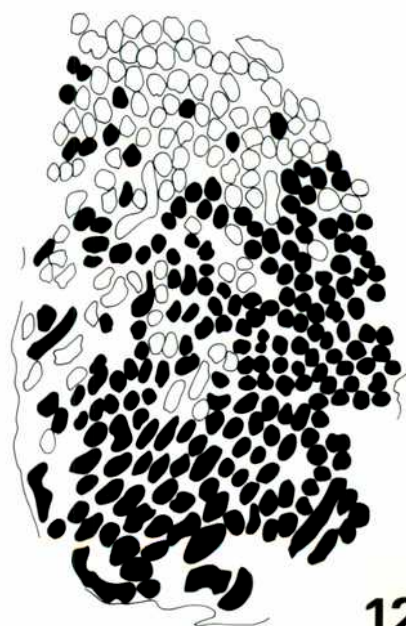
200 IU hCG/3d

10



200 IU hCG /5d

11



400 IU hCG/3d

12

- Fig. 9. Mapa de un testículo correspondiente al grupo 200 UI/2 días.
Fig. 10. Mapa de un testículo correspondiente al grupo 200 UI/3 días.
Fig. 11. Mapa de un testículo correspondiente al grupo 200 UI/5 días.
Fig. 12. Mapa de un testículo correspondiente al grupo 400 UI/3 días.

una distribución de tipo focal preferentemente subalbugínea.

Con el objeto de estudiar si existe una acción preferencial de la gonadotrofina en producir las lesiones tubulares sobre determinados estadios del ciclo espermatogénico, tratamos de correlacionarlos con el daño observado.

Cuando los estadios pre-espermiación (I al VIII) y post-espermiación (IX al XIV) fueron agrupados, no fue hallada ninguna diferencia significativa que indicara una distribución preferencial del daño (datos no mostrados).

Al considerar los estadios IX al XIV, los valores obtenidos muestran una tendencia al aumento de la incidencia de túbulos lesionados en estos estadios (no significativa) (56.3% vs 43.4%) (tabla 4). Cuando se tomaron solamente los casos más patológicos (intensidad de la lesión \geq 24%) y acotando el rango de los túbulos post-espermiación a los estadios XI al XIII, los resultados revelaron un predominio estadísticamente significativo de la lesión en dichos túbulos seminíferos.

La respuesta del tejido intersticial al tratamiento hormonal fue evaluada en forma cualitativa. La observación

TABLA 4

**Asociación de la lesión con los estadios
post-espermiación ***

	% Túbulos seminíferos normales	% Túbulos seminíferos lesionados
Estadios IX - XIV	43.4 ± 17.6	56.3 ± 5.9
Estadios XI - XIII	38.1 ± 18.9	62.0 ± 13.9 **

* X ± DS

** Significativamente diferente (p<0.05)

microscópica revela una hiperplasia de las células de Leydig, principalmente notable en el grupo tratado con 400 UI de hCG. Esto concuerda con lo descrito por Christensen y Peacock (1980), que registran un aumento del 35% en el número de células de Leydig/cm³ del testículo adulto, a la semana del tratamiento diario con 100 UI de hCG.

Estudio del tiempo requerido por el tratamiento con hCG para inducir la lesión del túbulo seminífero. Análisis del entorno hormonal

En el punto anterior demostramos que dosis únicas y elevadas de hCG de 200 y 400 UI generan diversas lesiones en los túbulos seminíferos que se evidencian desde los 2 días post-tratamiento y persisten con la misma intensidad durante los 3 días subsiguientes.

Administrando una dosis de 200 UI hCG analizamos la aparición de las primeras lesiones tubulares sacrificando los animales a tiempos cortos, luego de la inyección de la gonadotropina: 6, 12, 24 y 48 horas.

De acuerdo a la tabla 5, observamos que tanto los pesos testiculares como el peso de las vesículas seminales y de la próstata no difieren estadísticamente con el de su correspondiente grupo control. Un daño tubular incipiente fue detectado tan precozmente como a las 6 horas de la inyección hormonal. Este consiste en pequeños focos de células germinales en degeneración presentes en túbulos seminíferos aislados (fig. 13). Este fenómeno aumenta su intensidad progresivamente y alcanza las características descritas en el experimento anterior a las 24 horas.

En la tabla 6 mostramos el perfil hormonal encontrado en los distintos grupos experimentales. La T sérica aumentó significativamente a las 6, 12, 24 y 48 horas del tratamiento. Un incremento en los valores de E₂ circulante fue observado a las 12, 24 y 48 horas post-hCG. Por el contrario, los niveles séricos de FSH mostraron una considerable disminución 24 y 48 horas luego de la administración hormonal.

TABLA 5

**Pesos de órganos a tiempos cortos luego de la
administración de hCG**

	Peso corporal (g)	Peso testicular (mg)	Peso vesículas seminales (mg)	Peso próstata (mg)
control	222.4 ± 5.8	1494.2 ± 62.2	358.0 ± 22.5	249.0 ± 25.5
200 UI hCG/6hs	215.2 ± 7.1	1484.2 ± 53.7	369.6 ± 55.0	222.0 ± 33.5
200 UI hCG/12hs	236.8 ± 4.2	1473.2 ± 46.3	395.6 ± 71.1	215.0 ± 23.3
200 UI hCG/24hs	234.4 ± 6.1	1491.6 ± 43.5	359.2 ± 24.1	217.0 ± 11.1
200 UI hCG/48hs	228.4 ± 9.8	1462.8 ± 44.3	474.2 ± 37.8	234.2 ± 26.4

X ± ES

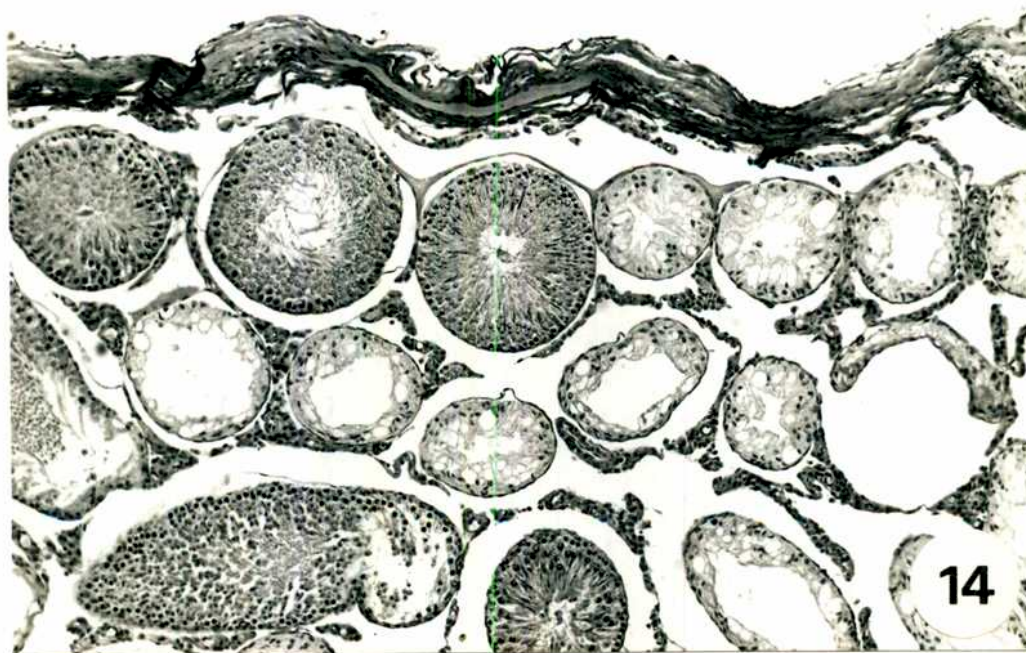
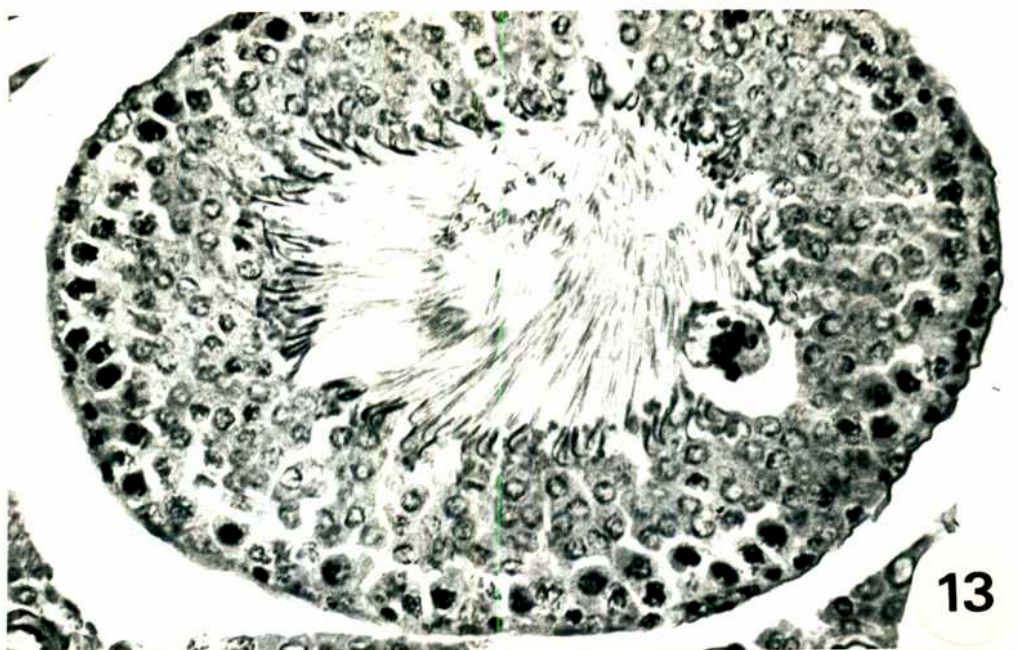


Fig. 13. 200 UI hCG, 6 horas luego de la inyección. Se observa la presencia de una célula gigante multinucleada dentro de un epitelio germinal por lo demás normal. PAS-H X 390

Fig. 14. 200 UI hCG, 3 meses luego de la inyección. Se destaca un grupo de túbulos seminíferos con depleción germinal severa que representan la secuela de una lesión anterior alternando con túbulos normales. PAS-H X 70

TABLA 6

Niveles séricos de T, E₂ y FSH a tiempos cortos
luego de la administración de hCG

	T sérica (ng/100ml)	E ₂ sérico (pg/ml)	FSH sérico (ng/ml)
control	186.3 ± 45.2	21.8 ± 1.9	389.2 ± 34.4
200 UI hCG/6hs	1710.0 ± 139.5 **	23.3 ± 1.8	330.2 ± 73.9
200 UI hCG/12hs	1725.0 ± 287.8 **	55.8 ± 10.6 *	351.9 ± 52.3
200 UI hCG/24hs	1880.0 ± 289.8 **	89.5 ± 1.5 **	195.7 ± 56.7 *
200 UI hCG/48hs	1137.5 ± 309.9 *	83.0 ± 3.1 **	152.9 ± 51.1 *

X ± BS

Significativamente diferentes * (p < 0.05) y ** (p < 0.01)

Estudio de la reversibilidad del daño tubular

Con el propósito de analizar la evolución temporal de este proceso, ratas adultas de edades idénticas a las anteriores fueron inyectadas con una dosis de 200 UI de hCG y sacrificadas 3 meses después.

La fig. 14 muestra un área importante de localización subalbugínea que denota la evolución tardía de este fenómeno lesional. Puede observarse una desaparición casi total del epitelio germinal lo cual resulta en túbulos seminíferos poblados únicamente por células de Sertoli. En otros casos la desaparición celular involucra a todas las células que integran el túbulo seminífero, dando lugar a túbulos fantasmas con hialinización de la pared tubular.

Reposición de los niveles de FSH en los animales tratados con hCG

Teniendo en cuenta que el daño tubular coexiste con niveles séricos deprimidos de FSH, se llevó a cabo un esquema experimental de reposición de FSH. En él se evaluó la histología testicular con el fin de detectar la posible reversión de la lesión.

Como era de esperar los niveles circulantes de FSH disminuyeron a las 24 horas de la inyección de 200 UI de hCG (tabla 7). La administración simultánea de hCG y FSH resultó en niveles circulantes de FSH que superaron al control 24 horas luego de la inyección.

La tabla 7 muestra que los pesos testiculares de los animales experimentales no variaron con respecto al control. El incremento del peso de las glándulas sexuales accesorias no alcanza niveles significativos luego del tratamiento con hCG y hCG + FSHp.

Por otro lado, el análisis histológico de los testículos tratados, reveló la existencia de lesiones en los túbulos seminíferos, similares a las descritas anteriormente, tanto en el grupo inyectado con hCG como en el que recibió hCG + FSHp (figs. 15 y 16). Estos resultados indican que la disminución de los tenores de FSH séricos inducidos por la inyección de hCG no se hallan involucrados en la producción del daño tubular, dado que la lesión persiste aún cuando los niveles de FSH son superiores al valor control en los animales que reciben hCG + FSHp.

TABLA 7

Pesos de órganos y niveles séricos de FSH luego del tratamiento con hCG y hCG + FSHp

	Peso corporal (g)	Peso testicular (mg)	Peso vesículas seminales (mg)	Peso próstata (mg)	FSH sérica (ng/ml)
control	174.0 ± 1.7	1203.2 ± 51.3	192.4 ± 25.3	117.1 ± 10.7	491.2 ± 61.2
200 UI hCG/24hs	185.0 ± 3.4	1228.8 ± 33.5	181.6 ± 18.5	131.0 ± 9.4	247.0 ± 25.2 *
200 UI hCG + 20 UI FSH _p /24hs	186.0 ± 4.3	1219.5 ± 38.3	229.8 ± 24.5	133.6 ± 13.3	1453.2 ± 162.9 **

X ± ES

Significativamente diferentes * (p < 0.05) y ** (p < 0.01)

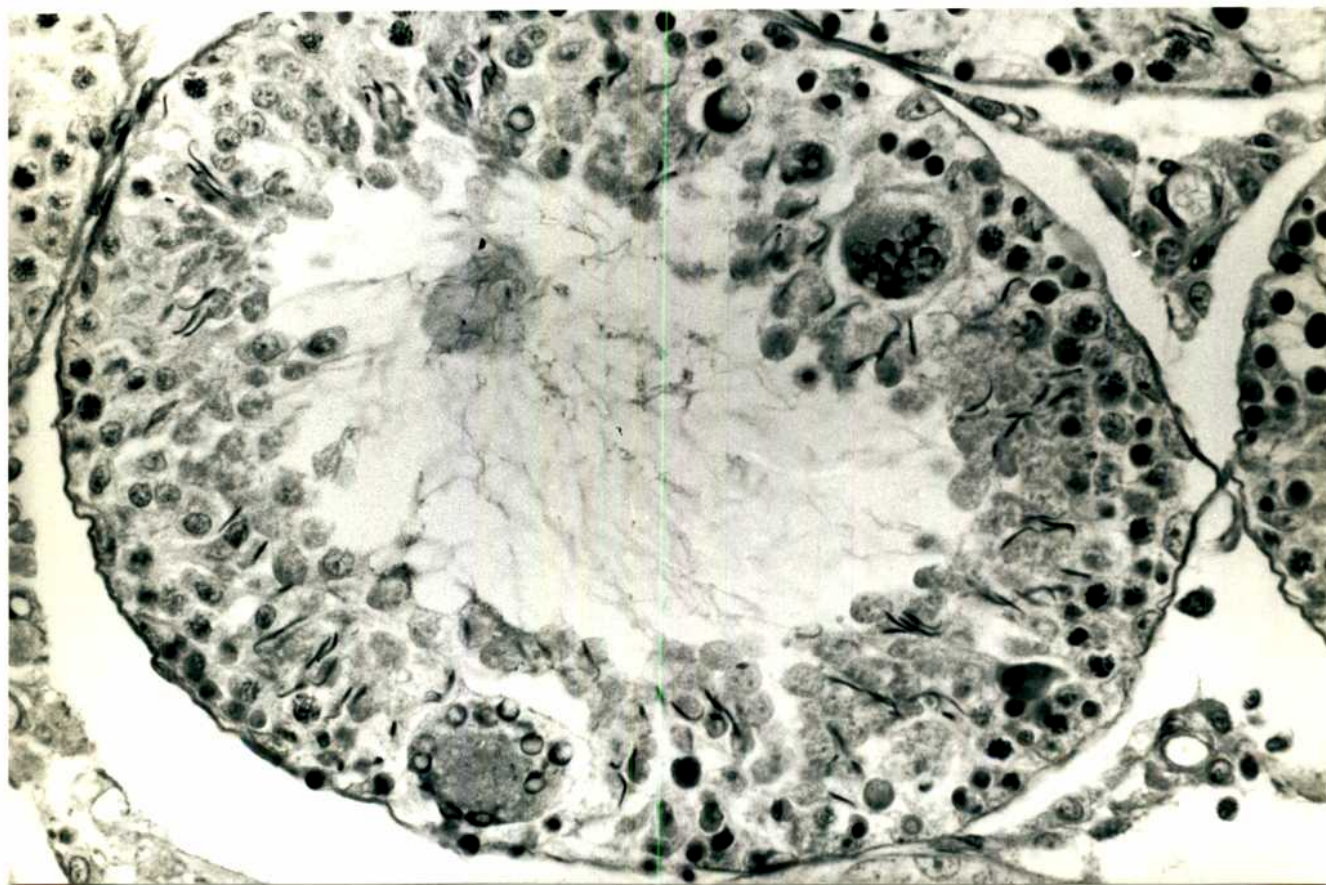


Fig. 15. 200 UI hCG + 20 UI FSHp, 24 horas luego de la inyección. Se observa la marginación de la cromatina de las espermatídes redondas y la formación de células gigantes. PAS-H X 500

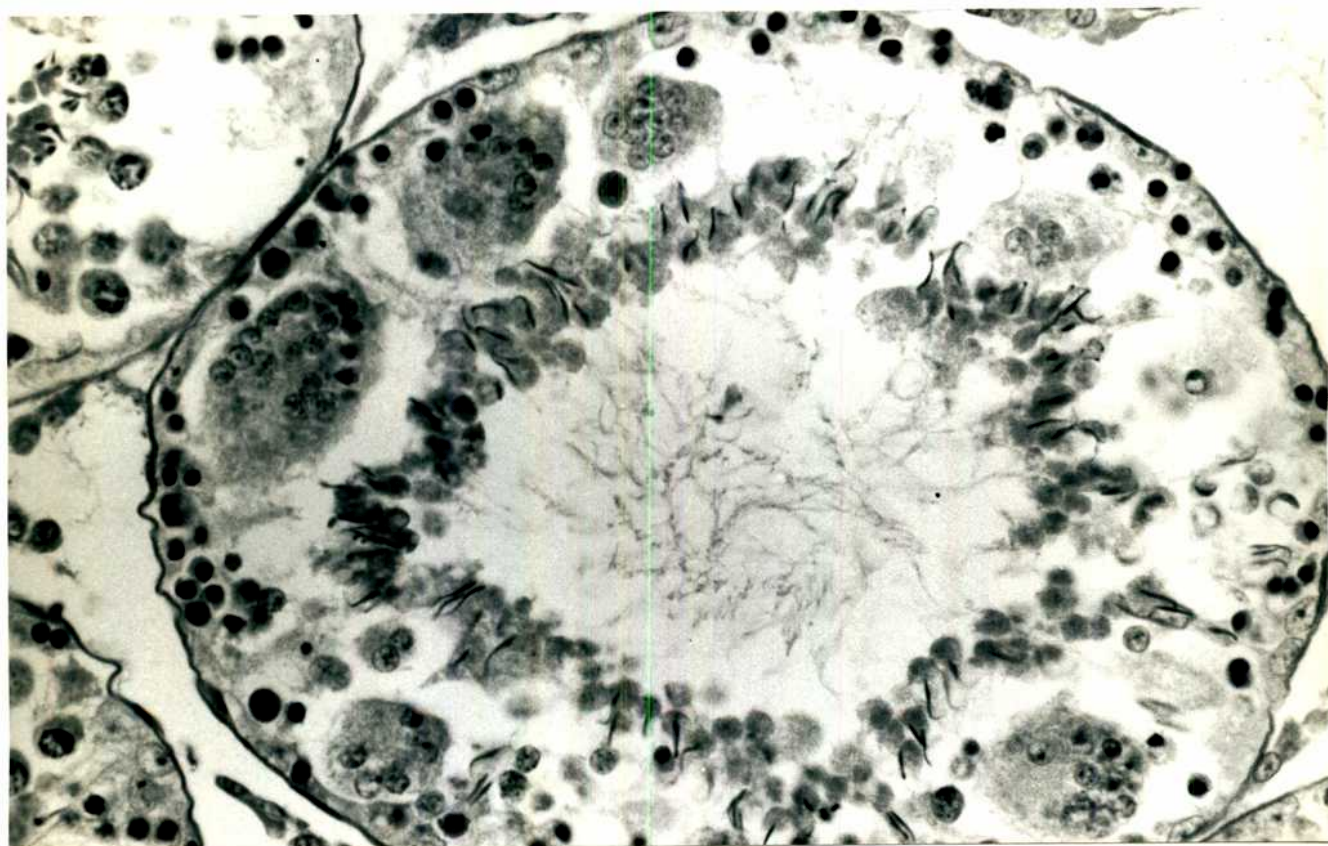


Fig. 16. 200 UI hCG + 20 UI FSHp, 24 horas luego de la inyección. Al igual que en la microfotografía anterior, se observa la marginación de la cromatina de las espermatídes redondas, la formación de células gigantes, la existencia de áreas de necrosis y una importante depleción celular. PAS-H X 500

Papel del estradiol en la producción de la lesión tubular inducida por hCG

Dado que el daño hallado en los túbulos seminíferos luego de la administración aguda con hCG coexiste con un aumento de los niveles séricos de E₂, fue nuestro propósito investigar si el incremento de dicho esteroide juega un papel en la producción del mencionado daño.

Se realizaron inyecciones subcutáneas o intratesticulares de BE₂ tratando de reproducir las condiciones experimentales halladas luego de la administración aguda de hCG. En estos animales se realizó un estudio histológico de ambas gonadas con el propósito de establecer o no la presencia de lesiones.

En los animales tratados con soluciones de 50 y 200 µg de BE₂ por vía subcutánea, el análisis microscópico de los testículos reveló una morfología normal no hallándose diferencias con su correspondiente grupo control.

Cuando el tratamiento con BE₂ se hizo por vía intratesticular (2 ó 4 ng), se logró inducir lesiones.

El estudio histológico de los animales controles inyectados intratesticularmente con aceite de girasol mostró la existencia de una respuesta local a la inyección

del vehículo bajo la forma de un infiltrado leucocitario intersticial. No se observaron en ellos lesiones tubulares del tipo anteriormente descrito (fig. 17). En los grupos experimentales inyectados con BE₂ se verificó, en algunos casos, la presencia de una importante degeneración tubular similar a la descrita luego de la administración aguda de hCG: formación de células gigantes multinucleadas, marginación de la cromatina, hipocelularidad del epitelio germinal y necrosis tubular (fig. 18).

Búsqueda de la existencia de receptores de LH en túbulos seminíferos

Con el objeto de descartar una posible acción directa de la hCG sobre los túbulos seminíferos se estudió la presencia de receptores de LH/hCG en poblaciones tubulares en los distintos estadios del ciclo espermatogénico.

Se llevó a cabo la técnica de transiluminación anteriormente descrita introduciendo ciertas modificaciones:

Se utilizaron 5 ratas macho de 80 a 90 días de edad. A cada una de ellas se les extirparon los dos testículos los cuales fueron procesados separadamente. Para nuestros fines

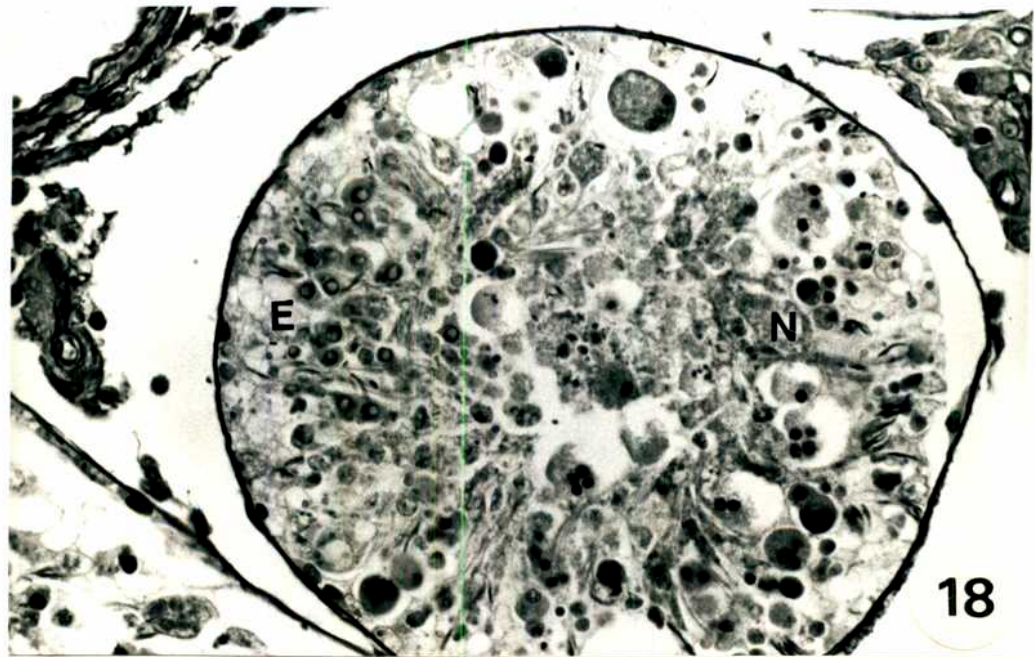
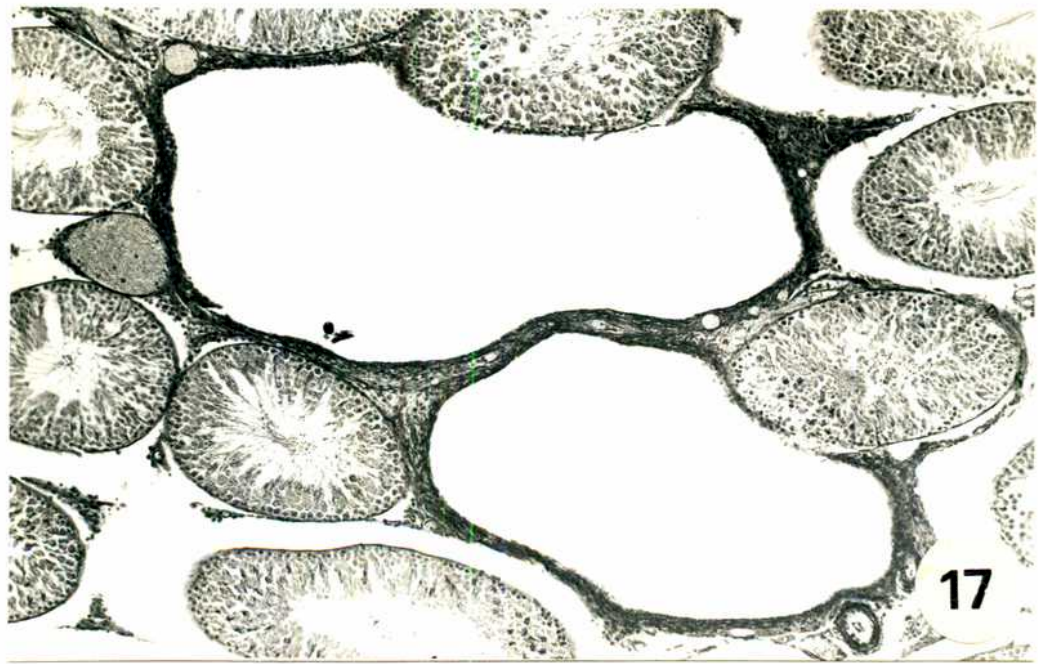


Fig. 17. Corte transversal de un testículo correspondiente a un animal control inyectado intratesticularmente con 20 μ l de aceite de girasol. Obsérvense grandes "lagunas" ocupadas por el vehículo. Los túbulos seminíferos vecinos conservan una morfología normal, observándose un infiltrado leucocitario en las márgenes del depósito de aceite. PAS-H X 100

Fig. 18. 2 ng BE₂, a las 48 horas de la inyección intratesticular. Este túbulo seminífero cercano al área de la inyección muestra un daño severo: zonas de necrosis (N), marginación de la cromatina de las espermatídes redondas (E), formación de células gigantes multinucleadas y áreas de depleción celular. PAS-H X 370

experimentales se agruparon las cuatro zonas descritas anteriormente en dos lotes:

1. Zona punteada oscura seguida por zona oscura: abarca los estadios II al VIII los cuales son considerados como estadios pre-espermiación.
2. Zona clara seguida por zona punteada clara: abarca los estadios IX al XIV-I los cuales son considerados como estadios post-espermiación.

En consecuencia, los segmentos tubulares poseen una longitud mayor de 2 mm dado que abarcan más de una región. De acuerdo a este patrón de absorción en cada uno de los 10 testículos se procedió a la microdissección de al menos 60 segmentos tubulares pertenecientes a cada uno de los 2 lotes, totalizando aproximadamente 600 en cada uno de ellos. Cada segmento fue medido mediante una grilla colocada en la base del estéreo-microscopio y colocado de inmediato en hielo seco; luego fue congelado a -70°C para su posterior estudio de receptores. Así se obtuvieron 7082 mm correspondientes al grupo post-espermiación y 9424 mm al grupo pre-espermiación.

Por otro lado, para controlar la precisión de la técnica de separación de túbulos seminíferos por

transiluminación, cada 10 segmentos de cada lote destinados a la medición de receptores, uno elegido al azar fue colocado en solución de Bouin-alcohólico para su estudio por microscopía óptica. Por lo tanto, para cada testículo un grupo de aproximadamente 6 segmentos tubulares de cada lote fue considerado como grupo de control histológico. La precisión de la técnica de microdissección fue evaluada y se muestra en la Tabla 8.

Se puede considerar como óptima la precisión de esta metodología dado que los porcentajes de contaminación existentes en cada lote son despreciables. Habiendo logrado reproducir con alta precisión (97 - 99%) la separación de poblaciones homogéneas de túbulos seminíferos, procedimos a analizar la existencia o no de receptores de LH en los 2 lotes de segmentos tubulares correspondientes a las zonas pre y post-espermiación.

Cuando se intentó determinar la existencia de receptores para LH/hCG en los túbulos seminíferos aislados en distintos estadios del ciclo, la medición de radioactividad en la fracción particulada tubular indicó la ausencia de unión específica de la gonadotrofina marcada, en ambas poblaciones de túbulos seminíferos (fig. 19).

TABLA 8

Precisión de la técnica de transiluminación para identificar los estadios del ciclo espermatogénico de la rata. Comparación de los resultados obtenidos por transiluminación y por análisis histológico de los mismos segmentos tubulares

	Pool pre-espermiación Estadios II-VIII	Pool post-espermiación Estadios IX-I
Nº total de túbulos identificados por transiluminación	87	67
Nº total de túbulos del grupo anterior identificados por examen histológico como correspondientes a los mismos estadios	86	65
Nº de túbulos correspondientes histológicamente a otros estadios diferentes a los supuestamente identificados por transiluminación	1	2
% de contaminación	1.1	3
% de acierto	98.9	97.0

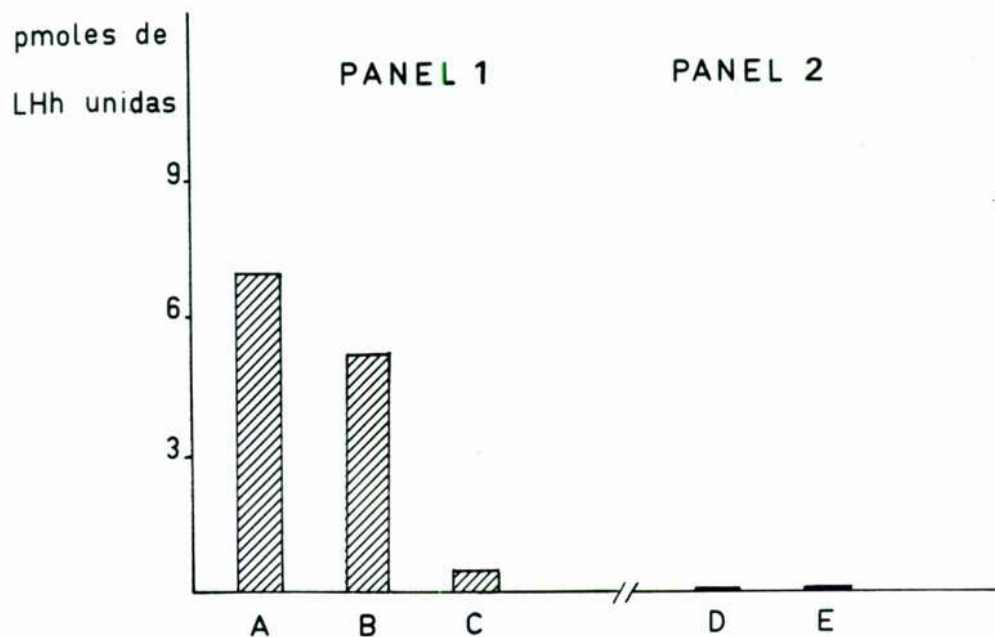


Fig. 19. Unión específica de ^{125}I - LHh a los distintos compartimentos gonadales en la rata macho.

Panel 1: Datos tomados de "Prolactin Binding in rat testis: Specific receptors in interstitial cells". Charreau, EH; Attramadal, A; Torjesen, PA; Purvis, K; Calandra, R; Hansson, V. Mol. and Cel. Endocrinol., 6, 303-307, 1977.

A: testículo total
 B: tejido intersticial
 C: túbulos seminíferos
 B y C fueron obtenidos por disección manual

Panel 2: Datos experimentales propios (ver punto A.6. en Materiales y Métodos).

D: túbulos seminíferos estadios pre-espermiación
 E: túbulos seminíferos estadios post-espermiación
 D y E fueron aislados por la técnica de transiluminación

**PARTE B. VARIACIONES ONTOGENICAS DE LA MORFOLOGIA Y FUNCION
DEL INTERSTICIO TESTICULAR. SU RELACION CON EL
DESARROLLO DE LESIONES TUBULARES**

Hemos demostrado en la primera parte del presente trabajo, que la administración aguda de una alta dosis de hCG genera lesiones degenerativas en los túbulos seminíferos de la rata adulta que coexisten temporalmente con la desensibilización de las células de Leydig ante una nueva estimulación gonadotrófica.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos proponemos analizar en esta sección, la evolución ontogénica de ambos procesos en animales controles y tratados con una única dosis de hCG, prestando especial atención a las modificaciones cuali y cuantitativas de las poblaciones celulares intersticiales.

Las edades de los animales utilizadas para este estudio fueron seleccionados de acuerdo a los hallazgos de Clermont y Perey (1957) en su investigación sobre la evolución de la primera onda espermatogénica de la rata. Estos autores demostraron que durante los primeros 4 a 10 días de vida, los gonocitos primordiales dan nacimiento a

las primeras espermatogonias A de tipo adulto. Durante este período se observa una importante proliferación mitótica tanto a nivel gonial (aparición de espermatogonias I_a y B) como a nivel de las células de Sertoli. Entre los días 10 y 12 de vida aparecen los primeros espermatocitos preleptoténicos, evento que marca el comienzo de la meiosis. Esta etapa se extiende hasta el día 26 de vida en el cual aparecen espermátides tempranas, finalizando de este modo la meiosis y dando comienzo a la espermiogénesis. La diferenciación y maduración de las primeras espermátides concluye en el momento de la espermiación alrededor del día 45 de vida.

Cambios histológicos en la composición celular del intersticio durante la maduración testicular y luego del tratamiento con hCG

Durante el crecimiento prenatal y postnatal del testículo, las células de Leydig muestran un complicado patrón de crecimiento caracterizado por períodos de intensa actividad mitótica, de diferenciación morfológica y de degeneración. La diferenciación de las células de Leydig

constituye un proceso progresivo que se origina a partir de células precursoras mesenquimáticas. Estos tipos celulares sufren una serie de modificaciones morfológicas hasta convertirse en células de Leydig maduras.

En todos los animales estudiados (7, 11, 20, 26, 35 y 45 días de edad) se pudieron identificar numerosos tipos de células intersticiales cuyas características morfológicas describimos a continuación (fig. 20).

Se identificaron CL diferenciadas por sus núcleos redondos con nucleolos prominentes y un anillo periférico de heterocromatina. Estas células poseen abundante citoplasma eosinofílico de forma poliédrica con bordes celulares marcados y apariencia granular o vacuolada.

Todos los elementos elongados del tejido conectivo que se encontraron en los espacios intertubulares, incluyendo aquéllos que rodean a los túbulos seminíferos o a los vasos sanguíneos, fueron considerados como posibles precursores de las células de Leydig. Poseen núcleos lentiformes, elongados y delgados con cromatina dispersa y nucleolos inconspicuos. Sus citoplasmas muy delgados y alargados se colorean débilmente con eosina, haciéndolos apenas distinguibles del tejido conectivo de fondo. Asimismo se puede identificar una serie de estadios intermedios entre

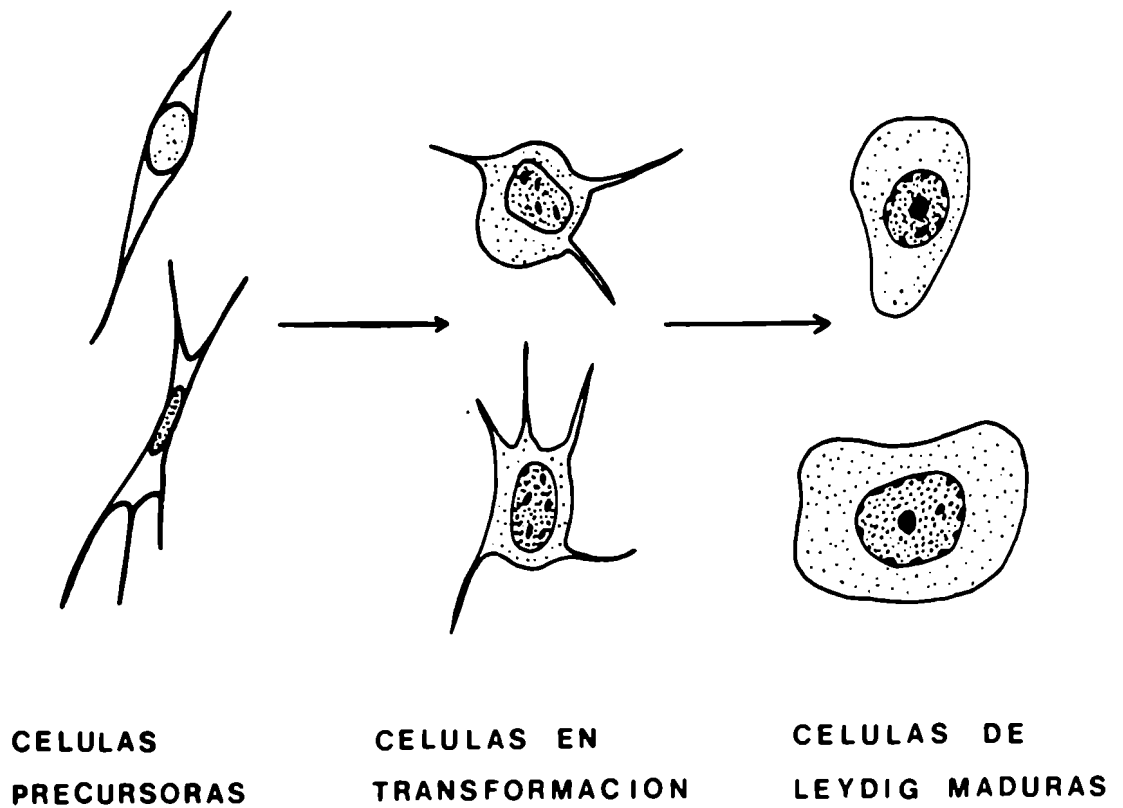


Fig. 20. Dibujo esquemático del proceso de diferenciación de las células de Leydig. Las células precursoras y en transformación fueron agrupadas en una sola categoría como precursores mesenquimáticos (PM). (Levemente modificado de Hooker, Ch.W., 1944).

estas células precursoras y las CL maduras. Estos elementos intermedios fueron clasificados como precursores en transformación hacia CL diferenciadas. Los núcleos aun elongados y lentiformes evidencian un perfil engrosado y un desarrollo progresivo de los nucleolos. Se observa un aumento del tamaño de los citoplasmas, los cuales se hacen más eosinofílicos y se destacan del fondo; a veces exhiben una textura granular fina. Los precursores y aquéllos que se hallan en su transformación hacia CL diferenciadas fueron agrupados como precursores mesenquimáticos (PM).

Los PM se observan entremezclados con las CL (fig. 21). Los agregados de CL están constituidos por pequeños grupos de células que se hallan, a veces, en estrecha relación con los capilares sanguíneos (fig. 22) aun cuando en otros casos esta relación no es evidente (fig. 23). Se identificaron figuras mitóticas en PM y en CL (fig. 24).

En las ratas tratadas con hCG, se detecta un aumento en el tamaño de los agregados celulares y en la frecuencia de figuras mitóticas en relación con los animales control.

Las figuras 25 A y B muestran los cambios del cociente $R = CL/PM$ el cual expresa la modificaciones de la composición celular del intersticio de las ratas control y tratadas con hCG. A los 7 días de edad, los animales

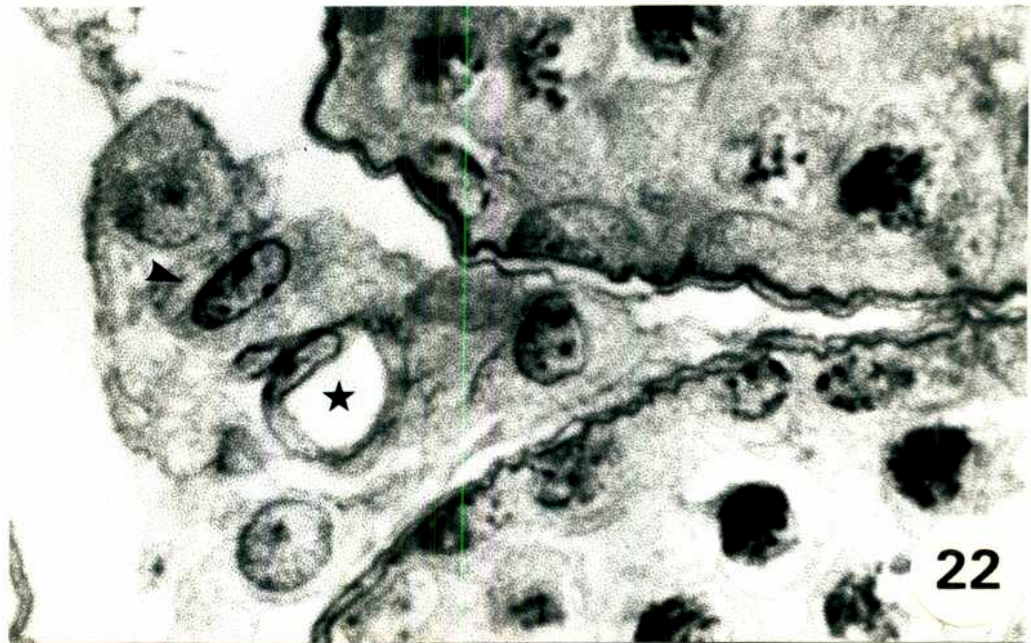
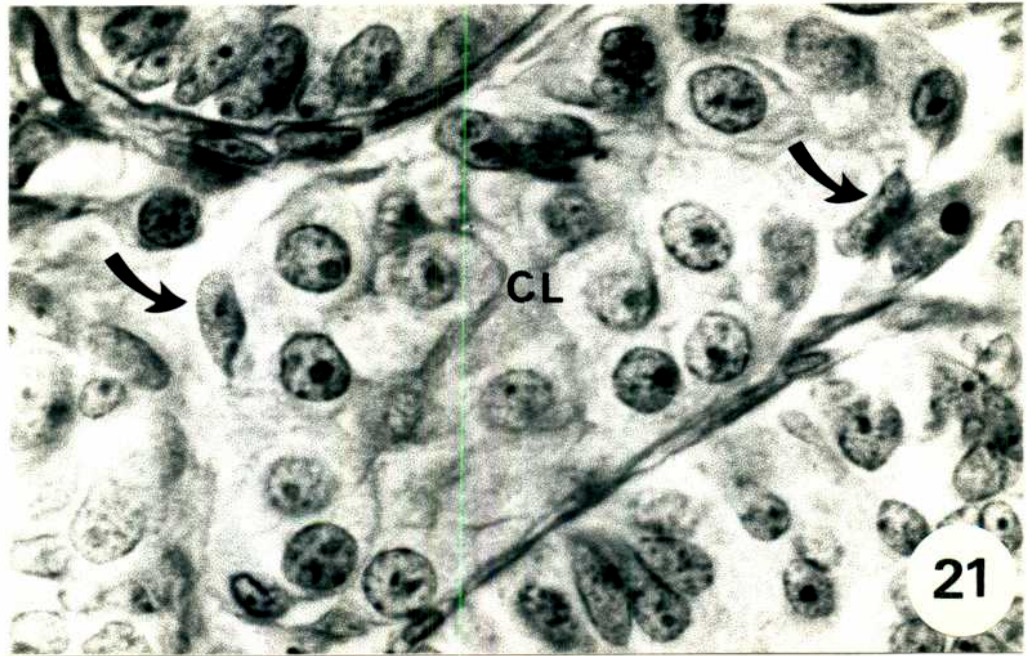


Fig. 21. En una rata de 7 días de edad inyectada con hCG observamos PM (flechas) entremezclados con CL diferenciadas. PAS-H X 600

Fig. 22. Rata de 26 días control. A la izquierda del capilar (*) se observa un precursor mesenquimático (flecha) en proceso de diferenciación a CL el cual posee características citoplasmáticas y nucleares intermedias entre una célula precursora no estimulada y una CL madura. PAS-H X 560

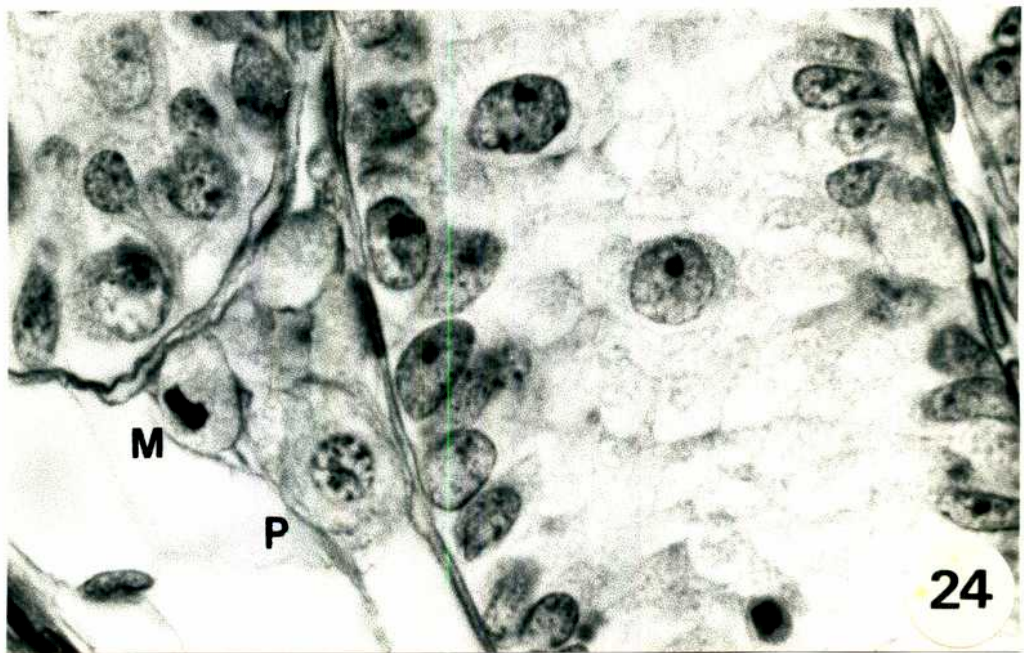
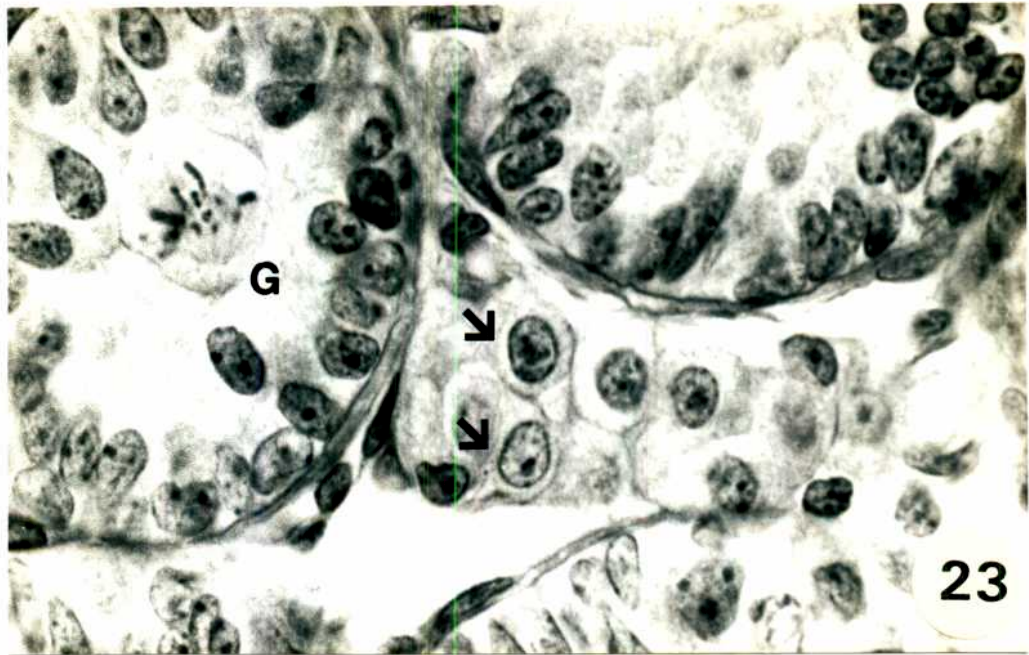


Fig. 23. Rata de 7 días de edad inyectada con hCG. Se destaca un grupo de CL diferenciadas (flechas) las cuales poseen núcleos típicos, citoplasmas claros y bordes celulares bien diferenciados. Se observa un gonocito en mitosis (G) en el túbulo seminífero que se encuentra a la izquierda. PAS-H X 470

Fig. 24. En una rata de 7 días de edad se observan 2 CL diferenciadas en mitosis (P profase temprana; M metafase). En la célula que se halla en profase la cromatina aún conserva un patrón característico de un núcleo interfásico. Ambas células poseen citoplasmas típicos de CL. PAS-H X 600

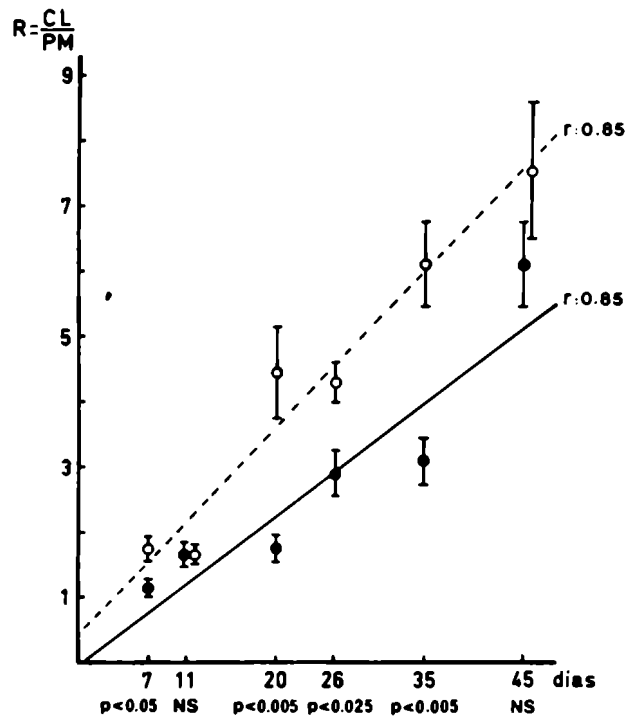


Fig. 25 A. Cambios del cociente $R = CL/PM$ con la edad expresados mediante una regresión lineal. Puntos negros: animales control. Puntos blancos: animales tratados con hCG.

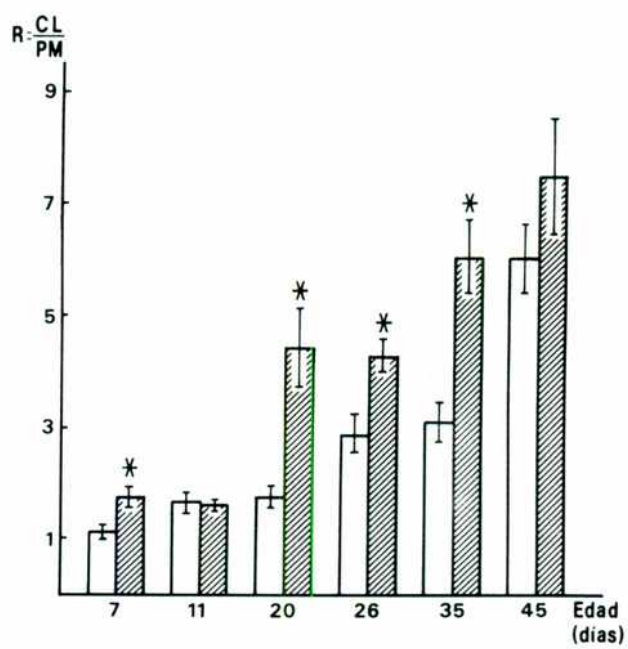


Fig. 25 B. Cambios del cociente $R = CL/PM$ representados mediante un diagrama de barras en función de la edad de los animales.
 Barras blancas: animales control.
 Barras grisadas: animales tratados con hCG.

control tienen similares proporciones de CL y precursores mesenquimáticos ($R = 1,14 \pm 0,14$). A medida que avanza la edad, el número relativo de CL aumenta progresivamente alcanzando el valor máximo a los 45 días ($R = 6,11 \pm 0,66$). A esta edad las CL diferenciadas son, de lejos, la población celular predominante del tejido intersticial. En las ratas tratadas con hCG, observamos similitudes y diferencias con respecto a las controles. El cociente R también aumenta con la edad y alcanza, a los 45 días, el valor de $7,52 \pm 1,05$ que no difiere del control. Sin embargo, a los 7 días la proporción de CL es mayor que en el control y se mantiene en casi todas las edades estudiadas (fig. 25). Las ratas sometidas al tratamiento hormonal alcanzan un valor de $R = 6,1 \pm 0,67$ a los 35 días llegando al valor más "maduro" diez días antes que los animales control. El coeficiente de correlación de ambas rectas de regresión es de 0,85 ($p < 0.001$).

En la tabla 9 mostramos los valores no corregidos correspondientes al número de mitosis registrado en 25 espacios intertubulares. En las ratas más jóvenes (7, 20 y 26 días de edad) observamos un aumento significativo de las divisiones celulares en los grupos de animales que recibieron el impacto de la hCG con respecto a su correspondiente valor control. A medida que avanza la edad el número de mitosis hallado luego del tratamiento hormonal no difiere del de su respectivo control.

TABLA 9

Número de mitosis en 25 espacios intertubulares en animales control y tratados con hCG (valores no corregidos)

EDAD (días)	CONTROL	hCG / 48 horas
7	27.8 ± 3.7	41.8 ± 3.9 *
11	30.4 ± 3.7	24.8 ± 5.2
20	7.8 ± 1.0	20.8 ± 2.6 *
26	12.8 ± 2.8	23.2 ± 2.3 *
35	17.2 ± 1.7	22.4 ± 3.2
45	23.4 ± 6.4	22.0 ± 2.8

X ± ES

Significativamente diferentes del control * p<0.05

Niveles séricos de T en animales control de distintas edades y con estimulación gonadotrófica

En la tabla 10 se muestran los valores de testosterona sérica basales y aquéllos alcanzados 48 horas luego de la inyección de hCG, correspondientes a las distintas edades estudiadas. En todas las edades se observa un incremento significativo de los tenores de T circulante en los animales sometidos al tratamiento hormonal, con respecto a su correspondiente valor control. La magnitud de este aumento varía entre 2 y 4,5 veces.

Variaciones ontogénicas de los niveles de receptores testiculares de LH y de la producción "in vitro" de andrógenos luego de una estimulación aguda con hCG

La pérdida de receptores testiculares de LH 48 horas luego de la administración de la gonadotrofina varía notablemente de acuerdo a la edad de los animales. El porcentaje de receptores de LH remanentes en cada edad se halla expresado en la tabla 11. Se observa que existe una relación inversa entre edad del animal y porcentaje de receptores remanentes. En los animales de 7 días de edad, el nivel de receptores remanentes es del 47,3% de su

TABLA 10

Niveles de T sérica (ng/100ml) a distintas edades en condiciones basales y de estimulación.

EDAD (días)	CONTROL	hCG / 48 horas
7	104.9 ± 23.7	271.8 ± 20.2*
11	90.2 ± 24.8	224.8 ± 4.7*
20	100.6 ± 23.5	268.1 ± 32.5*
26	197.4 ± 60.8	886.6 ± 96.6*
35	121.0 ± 13.7	320.0 ± 42.2*
45	366.0 ± 69.0	760.0 ± 85.6*

X ± ES

Valores diferentes del control * p < 0.01

TABLA 11

Variaciones ontogénicas en el número de sitios receptores testiculares para LH/hCG en ratas control e inyectadas con hCG 48 horas antes.

EDAD (días)	CONTROL (fmol/test.)	hCG (fmol/test.)	% DE SITIOS RECEPTORES REMANENTES EN LOS ANIMALES TRATADOS
7	0.74 ± 0.07	0.35 ± 0.05	47.3
11	1.12 ± 0.09	0.41 ± 0.05	36.6
20	13.11 ± 1.10	2.54 ± 0.23	19.4
26	76.62 ± 0.98	15.32 ± 1.10	20.0
35	531.60 ± 3.70	N.D.	0
45	1844.00 ± 101.00	N.D.	0

Valores son la media X ± ES de pares de testículos provenientes de 3 a 5 ratas.

N.D. = no detectable

correspondiente control. Este número de sitios receptores remanentes va disminuyendo progresivamente con la edad (11 días: 37%; 20 días: 19%; 35 días: 20%) hasta alcanzar niveles no detectables en los animales de 35 y 45 días..

En la figura 26 se halla graficada la producción "in vitro" de andrógenos (T + DHT + 3α -diol) por los testículos de los animales control y pretratados con hCG en las distintas edades estudiadas.

La producción basal y luego de la estimulación "in vitro" con hLH se hallan representadas en los paneles superior e inferior respectivamente. En cada caso, los datos correspondientes a los animales control fueron graficados mediante barras blancas y aquellos correspondientes a animales pre-tratados con hCG mediante barras grisadas.

Puede observarse que a todas las edades la producción androgénica basal se halla aumentada significativamente en aquellos animales que recibieron hCG "in vivo" en relación a sus correspondientes controles. Este incremento responde a la estimulación producida en el testículo por la gonadotropina unida "in vivo". La producción androgénica resultante de la estimulación con LHh "in vitro" (panel

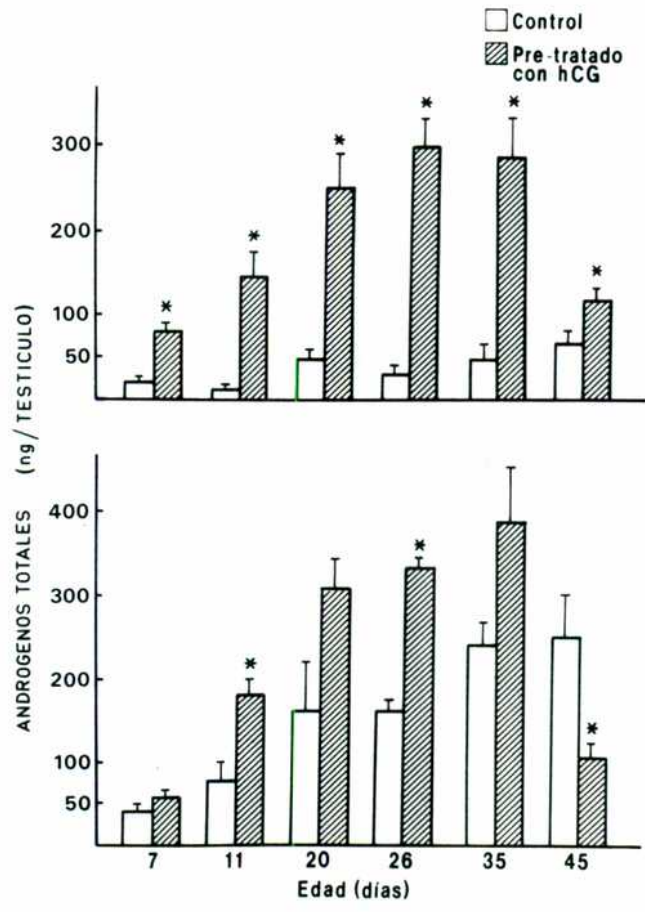


Fig. 26. Producción "in vitro" de andrógenos totales por los testículos de animales control y pre-tratados con hCG. Panel superior: incubación "in vitro" en ausencia de LHh. Panel inferior: incubación "in vitro" en presencia de LHh.

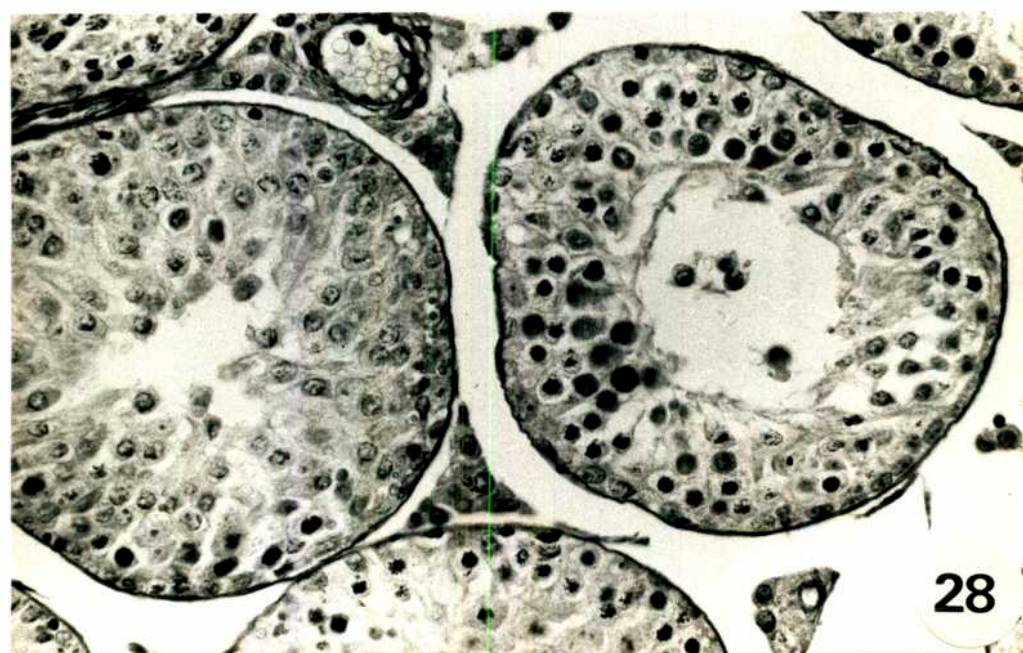
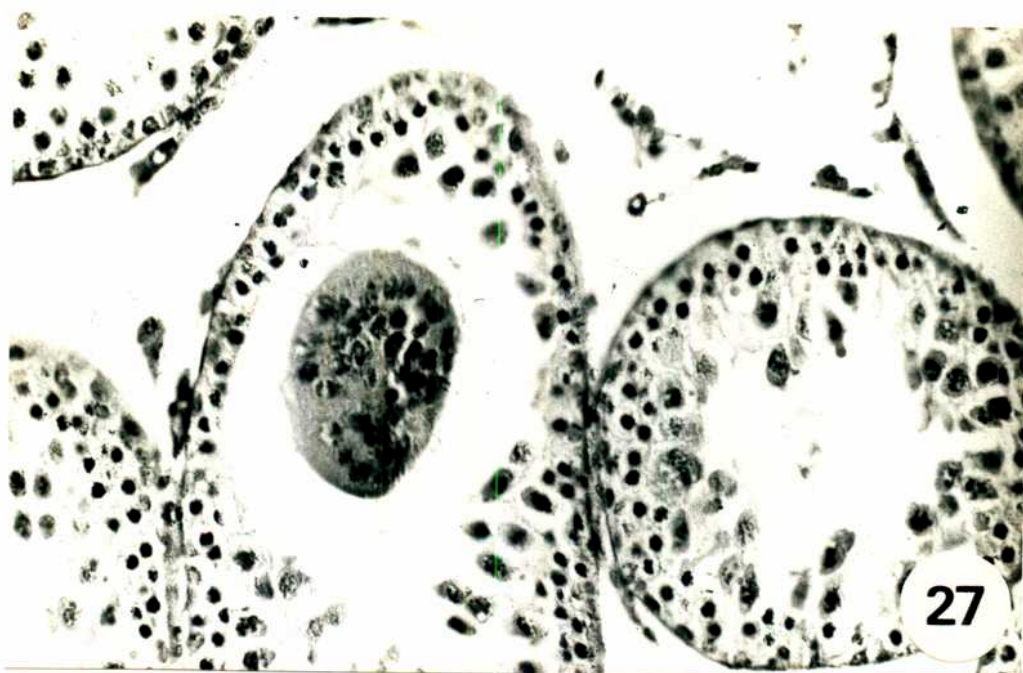
inferior) mostró diferencias con la edad. Los testículos provenientes de los animales de 7 a 35 días, inyectados con hCG "in vivo" y sometidos a la estimulación máxima con LHh "in vitro" alcanzan valores androgénicos que igualan o superan a aquéllos obtenidos en ratas controles de la misma edad. Por el contrario, a los 45 días de edad el nivel de andrógenos obtenido en los animales tratados con hCG "in vivo" es inferior al de su correspondiente grupo control.

Estudio ontogénico de la morfología de los túbulos seminíferos luego de la estimulación aguda con hCG

Los animales control (inyectados con vehículo) muestran una histología normal de los túbulos seminíferos con un desarrollo de la espermatogénesis propio de cada edad. A los 7 días se observan espermatogonias A en proceso de multiplicación y diferenciación, ubicadas en la periferia del túbulo, alternando con células de Sertoli inmaduras. A los 11 días ya aparecen todos los tipos de espermatogonias (A, In y B) así como espermatocitos preleptoténicos. A los 20 días se observan espermatocitos primarios en estadios leptoténico, cigoténico y paquiténico, ocupando la región más adluminal del túbulo. Las primeras espermátides fueron detectadas a los 26 días de edad,

momento en el cual la mayoría de los túbulos se encontraban finalizando la meiosis. A los 35 días se observan numerosas espermatídes redondas y elongadas, las cuales se transforman en tardías (estadios 15-16) a los 45 días, indicando que la espermatogénesis está próxima a completarse.

El análisis histológico de los testículos pertenecientes a los animales inyectados con hCG no reveló alteraciones morfológicas a los 7 y 11 días de edad. Signos ocasionales de lesión como la presencia de células gigantes multinucleadas, se registraron a los 20, 26 y 35 días. Este incipiente daño tubular aumentó su intensidad a la edad de 45 días, donde se detectan pequeñas áreas de degeneración, necrosis e hipocelularidad del epitelio germinal (figs. 27 y 28), lesión de similares características a las descritas en el animal adulto (ver parte A) pero de menor intensidad.



Figs. 27 y 28. Testículos pertenecientes a animales de 45 días, 48 horas luego de la inyección de 200 UI hCG.

En estas microfotografías la lesión de los túbulos seminíferos se manifiesta con áreas de necrosis celular, hipocelularidad de ciertas partes del epitelio germinal y formación de células gigantes multinucleadas. PAS-H X 370

DISCUSSION

DISCUSION

Se halla ampliamente documentado en la literatura el efecto "desensibilizante" que posee una alta dosis de hCG sobre las células de Leydig del testículo adulto (Dufau y cols., 1978). Sin embargo, es poca la información concerniente a la respuesta de los túbulos seminíferos a la administración aguda de dicha gonadotropina.

Existen referencias que describen el efecto del tratamiento crónico con hCG sobre el testículo de hombres adultos (Maddock y Nelson, 1952). Estos pacientes recibieron inyecciones intramusculares de 5000 UI de hCG, 3 veces a la semana durante 46 a 65 días. Al finalizar el tratamiento las biopsias testiculares revelaron cambios regresivos en los túbulos seminíferos, los cuales consistían en disminución del diámetro tubular, aparición de fibrosis peritubular, hialinización de la membrana basal, necrosis de células germinales y cese de la espermatogénesis. En ningún caso se detectaron alteraciones en la apariencia o en el número de las células de Sertoli. Sin embargo, esta última afirmación no ha sido sustentada por un análisis cuantitativo de las células de Sertoli y por lo tanto no es posible asegurar que el número de éstas no haya variado con el tratamiento hormonal. Coincidiendo con estos hallazgos en el testículo humano, se observó que

la administración crónica de hCG, durante 10 días, a ratas inmaduras genera una disminución en el número de células germinales (Chemes y cols., 1976b). Ambos grupos de trabajo atribuyen el daño observado en los túbulos seminíferos a una disminución en la secreción de FSH hipofisaria debido a niveles endógenos aumentados de andrógenos y/o estrógenos. Más recientemente, Cusan y cols., (1982), examinan el efecto de la administración de una alta dosis de hCG sobre el testículo de la rata adulta por períodos de tiempo que se extienden de 1 a 12 semanas. Este estudio muestra que el tratamiento crónico con hCG produce cambios degenerativos a nivel de los túbulos seminíferos con inhibición de la espermatogénesis, degeneración de las espermátides tipo 6-7, pérdida de receptores testiculares de LH y alteración parcial de la esteroidogénesis. Según estos autores, el mecanismo responsable del daño tubular podría estar relacionado con el aumento de algún esteroide testicular durante la desensibilización inducida por hCG. En este sentido, ha sido comunicado que la progesterona posee un efecto deletéreo sobre los túbulos seminíferos de la rata adulta cuando es administrada en forma crónica (Flickinger, 1977).

Nuestro trabajo constituye el primer intento por estudiar las lesiones tubulares que aparecen luego del tratamiento agudo con hCG, e indica que la inyección de una

dosis única de 100, 200 y 400 UI de hCG genera lesiones en los túbulos seminíferos del testículo de la rata adulta. Este fenómeno, detectado en forma temprana (a las 6 horas) luego de la administración hormonal adquiere su máxima expresión de 2 a 5 días luego de la misma. La dosis de gonadotrofina más baja utilizada en nuestro experimento piloto (100 UI) produce un efecto deletéreo de menor intensidad. La administración de hCG (Endocorion) y hCG altamente purificada produjo alteraciones morfológicas similares, lo cual confirma que el efecto lesional observado en los túbulos seminíferos es debido a la acción de la gonadotrofina coriónica y no a la presencia de posibles contaminantes en la preparación hormonal no purificada.

Los primeros cambios que detectamos son picnosis nuclear, marginación de la cromatina de las espermátides redondas y comienzo de formación de células gigantes. Luego observamos necrosis focal y descamación del epitelio germinal. Estas alteraciones tubulares son evidentes en todos los grupos experimentales e involucran principalmente a las células germinales. Los núcleos de las células de Sertoli preservan una apariencia normal pese a que no se pueden descartar alteraciones ultraestructurales no detectables al microscopio óptico.

Es importante destacar que el grado de lesión tubular que hallamos en los distintos grupos experimentales varía de acuerdo a cada individuo considerado, lo cual sugiere la existencia de susceptibilidades individuales al tratamiento hormonal. Este hallazgo concuerda con la heterogeneidad de la respuesta a la administración de hCG hallada por Cusan y cols. (1982) a la semana del tratamiento. Sin embargo, a pesar de estas variabilidades podemos considerar al fenómeno lesional como específico dado que en nuestros experimentos aparece en todos los animales tratados con la gonadotrofina y nunca fue observado en testículos control.

El carácter temporario de las lesiones tubulares descritas es atribuido por Cusan y cols. (1982) al aumento gradual en plasma de anticuerpos anti hCG, los cuales neutralizarían la acción de la gonadotrofina inyectada. Sin embargo, contrariamente a los hallazgos de estos autores, nuestro análisis microscópico testicular realizado 3 meses luego de la inyección de hCG, reveló la existencia de pequeños focos de túbulos en degeneración con pérdida casi total de células germinales. Las áreas afectadas se hallan reducidas en comparación a la extensión que presentan en la fase aguda, dependiendo su tamaño probablemente de la magnitud de la lesión inicial. Estos resultados demuestran una persistencia en el tiempo de las lesiones producidas

por el fenómeno agudo, las cuales no tienen carácter activo sino representan un daño cicatrizal residual.

Un hecho interesante para destacar en nuestros resultados experimentales es la distribución focal y periférica de las áreas afectadas en la proximidad de la túnica albugínea. Si esta distribución topográfica preferencial tiene alguna relación con el sistema vascular del testículo es un punto que requiere aún más investigación.

Si bien hemos hallado un aumento significativo en la incidencia de túbulos seminíferos lesionados en los estadios XI al XIII del ciclo espermatogénico es difícil explicar el significado biológico de este fenómeno. Quizás pueda tratarse de una susceptibilidad especial de ciertos estadios a diversas manipulaciones hormonales como ha sido demostrado por Russell y Clermont (1977).

Se conocen bastante poco hasta el presente, los factores que se hallan involucrados en la regulación del flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular testicular. La inyección de gonadotrofina coriónica a ratas inmaduras, genera entre las 6 y 20 horas subsiguientes, un aumento temporario del peso testicular debido a un incremento del fluido en la gonada (Sharpe, 1977a). Luego de períodos de

tiempo similares, posteriores a la administración de una única dosis de hCG, se registró un aumento en la permeabilidad capilar del testículo de la rata adulta que fue acompañado por acumulación del fluido intersticial (Setchell y cols., 1982). Estos resultados sugieren que los cambios en la dinámica de los fluidos testiculares tienen efectos importantes en regular el acceso de hormonas tróficas a las células de Leydig y la velocidad de secreción de esteroides por el testículo. Estos cambios podrían estar de algún modo involucrados en la desensibilización de las mismas luego de la administración de hCG, como fue sugerido por Setchell y cols., (1982). Más recientemente se demostró que la inyección de una alta dosis de la gonadotropina genera en el testículo de la rata normal e hipofisectomizada, una reducción del flujo sanguíneo, un aumento de la concentración de prostaglandina E₂ y una degeneración de las células germinales de los túbulos cercanos a la cápsula testicular (Van Vliet y cols., 1986). Estos autores postulan que la producción de prostaglandinas por las células de Leydig podría estar involucrada en la regulación del flujo sanguíneo y la disminución de éste a su vez estaría relacionada con la degeneración tisular.

Todas estas observaciones fueron confirmadas recientemente por Damber y cols., (1986) los cuales

demuestran que el tratamiento de ratas adultas con LH/hCG induce cambios importantes en la microcirculación testicular. Este concepto se ha extendido a animales inmaduros en los cuales se observan diferencias en cuanto a ciertas características de la circulación testicular (Damber y cols., 1988). Sin embargo, un estudio realizado por Maddocks y Sharpe, (1988) se contrapone a lo antedicho y sugiere por el contrario, que son los túbulos seminíferos los que regulan el volumen de fluido intersticial. Asimismo, ha sido descrito que la activación de los macrófagos potencia los cambios regresivos inducidos por hCG (Kerr y Sharpe, 1988) y que la hormona sola o en combinación con los macrófagos regularían el transporte de nutrientes desde la vasculatura hacia los túbulos seminíferos adyacentes.

Queda bastante claro, por los datos bibliográficos enunciados, que la hCG regula de algún modo el flujo sanguíneo testicular dando lugar a la posible aparición de un efecto deletéreo sobre la morfología de la gonada. Por otro lado, el hecho que en nuestros resultados observemos una distribución preferencial del daño tubular, pone de manifiesto la posibilidad que la hCG ejerza una acción sobre los túbulos seminíferos mediada por algún metabolito a través del sistema vascular testicular. Posibles candidatos serían los andrógenos y/o los estrógenos que se

hallan aumentados luego de la administración aguda de hCG, como postularon Maddock y Nelson, (1952); Chemes y cols., (1976a) y Cusan y cols., (1982).

Consideramos en primer término si el aumento de los niveles séricos de testosterona registrado a las 48 horas de la inyección de hCG, podría estar involucrado en la producción del daño tubular. No existen datos en la literatura de acción negativa de altas dosis del andrógeno sobre el testículo. Por el contrario, numerosos trabajos citan un efecto estimulador directo de la testosterona sobre la función de la célula de Sertoli (Kotite y cols., 1978) y sobre la espermatogénesis (Chowdhury y Steinberger, 1975; Chemes y cols., 1976b). Por lo tanto, podemos descartar a la testosterona como factor responsable del efecto deletéreo observado en los túbulos seminíferos.

Otros cambios en el entorno hormonal que acompañan a este fenómeno son la disminución de los niveles circulantes de FSH y el aumento del estradiol sérico e intratesticular. La administración simultánea de FSH purificada a animales inyectados con hCG repone los valores de FSH sérico a niveles que superan el basal. En estos grupos experimentales persisten cambios regresivos de iguales características a aquellos descritos luego de la administración aislada de hCG (que produce una disminución

del 60% de los tenores de FSH endógenos). Esta observación demuestra que la disminución de la FSH no se encuentra involucrada en la producción del daño tubular, dado que su reposición no modifica las lesiones inducidas por hCG.

Consideramos entonces si el aumento del estradiol circulante podía jugar un papel en la etiología de este fenómeno. Se sabe que la administración de hCG a ratas macho adultas induce un aumento en la aromatización testicular de la T a E₂. Valladares y Payne han descrito que el tratamiento "in vivo" de estos animales con cantidades crecientes de LH o hCG, pero no de FSH, resulta en un incremento dosis dependiente en la actividad de la aromatasa testicular (1979a) y que la estimulación de este complejo enzimático por la gonadotropina ocurre también en células de Leydig aisladas provenientes de animales adultos (1979b). Estos autores extendieron esta observación a ratas inmaduras de 25 días de edad en las cuales obtienen una estimulación aguda de la aromatización mediante hCG y AMPc (Valladares y Payne, 1981).

En nuestro experimento el benzoato de estradiol (BE₂) fue administrado por vía intratesticular en una dosis similar o superior a la concentración de estradiol testicular en los animales inyectados con hCG (Cigorruga y cols.; 1980, Nozu y cols.; 1982). El contenido

intratesticular de E₂ alcanzado luego de una estimulación con una dosis elevada de hCG es de 0.1 ng/testículo. Siendo nuestras dosis de trabajo 20 y 40 veces superiores respectivamente al contenido endógeno del esteroide alcanzado luego de una máxima estimulación con hCG, consideramos que son las adecuadas como para reproducir dicha situación. Por otro lado, hay que tener en cuenta que el E₂ en forma de benzoato tiene liberación lenta, por lo que la dosis administrada no se encuentra disponible en su totalidad en forma inmediata.

Pensamos que la inyección local de este esteroide debe crear dentro de la gonada un gradiente de concentraciones tal que en un punto determinado puede mimetizar el aumento de E₂ que se registra luego del tratamiento con hCG. Las lesiones tubulares que observamos en estos grupos experimentales tienen las mismas características morfológicas que aquellas descritas post-hCG. Estos resultados podrían por lo tanto indicar que el aumento en los tenores intratesticulares de E₂ se halla involucrado en este proceso degenerativo. Sin embargo, el hecho que encontremos túbulos seminíferos normales en animales sometidos al tratamiento con BE₂ plantea un interrogante sobre el papel de este esteroide como mediador del daño tubular. Podría ser que la susceptibilidad individual de los diversos animales fuera responsable de la no

homogeneidad de este fenómeno, de la misma manera que se observa luego de la inyección de hCG.

Investigaciones recientes han revelado que la LH-RH y sus agonistas generan una alteración en la función gonadal de los animales hipofisectomizados, de similar característica a la observada luego de la administración de altas dosis de LH o hCG (Sharpe, 1980). Por otro lado, la demostración de sitios de unión específicos y de alta afinidad para la LH-RH y sus agonistas en células luteales del ovario y células de Leydig del testículo (Clayton y cols., 1980; Labrie y cols., 1980; Sharpe y Fraser, 1980) hablaría de una regulación local de las gonadas por factores LH-RH simil. Otro hallazgo interesante es la gran similitud entre los efectos inhibitorios de la hormona liberadora y los de la hCG sobre las gonadas (Sharpe, 1980). Una explicación posible de este último hecho fue detallada por Sharpe y Fraser en 1980. Estos autores demuestran que el tratamiento con hCG estimula la producción testicular de un factor LH-RH simil biológicamente activo y que, por lo tanto, las conocidas acciones inhibitorias de la gonadotrofina sobre las células de Leydig podrían estar mediadas por la producción local de este factor. El mismo se originaría probablemente en la célula de Sertoli y constituiría un mensajero entre el túbulo seminífero y el intersticio (Sharpe y cols., 1981).

Un daño similar al que describimos luego de la administración aguda de hCG fue hallado en el testículo de la rata adulta tratada crónicamente con un potente agonista LH-RH. Este consiste en cambios degenerativos de los túbulos seminíferos e inhibición de la espermatogénesis (Pelletier y cols.; 1978). Teniendo en cuenta esto último, no se puede descartar que un factor LH-RH simil pueda mediar la acción de la hCG produciendo un efecto deletéreo sobre los túbulos seminíferos.

Queda aún por considerar la posibilidad que la hCG pudiera inducir fenómenos involutivos tubulares por una acción directa. Ello implicaría la existencia de sitios receptores de membrana específicos para dicha gonadotropina en el epitelio seminífero. Esta posibilidad se encuentra basada en la conocida participación de la hCG en el mecanismo de espermiación de los anfibios (Burgos y Vitale-Calpe., 1967, 1969; Burgos y cols., 1968). Estos autores describen, a nivel ultraestructural, el proceso de liberación de los espermatozoides en el testículo del sapo luego de la inyección de LH. El blanco de la acción hormonal es la célula de Sertoli en cuyo citoplasma se producen varios cambios como respuesta inmediata a la gonadotropina administrada. Estos son: distensión de las vesículas del retículo endoplásmico liso y edema del citoplasma apical, desprendimiento apical de las

espermatídes con la consiguiente liberación de espermatozoides al lumen. En este proceso intervendrían también un aumento de agua y sodio LH dependientes.

Pese a que estas observaciones fueron extendidas a los mamíferos (Vitale-Calpe y cols., 1970 a y b; Burgos y Cavicchia, 1981), esta interpretación del mecanismo de espermiación no fue ampliamente aceptada (Fawcett, 1975). En efecto, no se conoce cual es el mecanismo de acción de la LH y muchos autores niegan que dicha hormona actúa sobre los túbulos seminíferos, dado que hasta el momento, no se han detectado receptores de LH en los mismos.

La microdissección de segmentos tubulares por la técnica de transiluminación constituye un arma sumamente útil para el estudio de la fisiología de los túbulos seminíferos dado que permite la separación del tejido intersticial con óptima precisión y una contaminación prácticamente nula con otros estadios de la espermatogénesis (ver detalles en la sección Materiales y Métodos y Resultados). Por otro lado, el hecho de poder agrupar los túbulos seminíferos de acuerdo a los distintos estadios del ciclo espermatogénico posibilita un análisis de las variaciones cíclicas de determinados parámetros tubulares. Aprovechando las ventajas de esta metodología, investigamos la presencia de receptores de LH en fragmentos

tubulares pertenecientes a estadios pre y post-espermiación, obteniendo resultados negativos en cuanto a la existencia de los mismos. Estos resultados demuestran en forma concluyente la ausencia de sitios de unión de la LH a los túbulos seminíferos, aclarando definitivamente este tema, dado que hasta el presente la literatura no había aportado resultados definidos al respecto.

Clásicamente, se considera que las hormonas proteicas ejercen su acción biológica mediante su interacción con sitios receptores específicos localizados en la membrana plasmática de las células blanco. Por lo tanto, la ausencia de receptores de LH en los túbulos seminíferos descarta la posible acción directa de la hCG e indica la existencia de otros procesos desencadenados por la inyección aguda de esta hormona, que serían responsables del efecto lesional observado en los túbulos seminíferos.

Nuestros resultados demuestran que a las 48 horas de la administración aguda de hCG se observan en los testículos de la mayoría de los animales tratados, lesiones degenerativas de los túbulos seminíferos cuya intensidad varía de acuerdo a la susceptibilidad de cada individuo y las cuales coinciden temporalmente con la desensibilización testicular descrita en la rata adulta agudamente estimulada con gonadotrofina coriónica. De acuerdo a lo

discutido hasta el momento, serían varios los posibles mecanismos fisiopatológicos involucrados en la producción de este fenómeno. Hemos demostrado la ausencia de sitios de unión de la LH a la fracción tubular testicular y con ello la imposibilidad de una acción directa de esta hormona sobre los túbulos seminíferos.

Demostramos que la disminución de los niveles séricos de FSH no es responsable del mencionado daño ya que la reposición de los mismos no revierte la lesión tubular. Por el contrario demostramos que el aumento de E_2 , que se registra luego de la inyección de hCG, puede estar implicado en la producción de este fenómeno ya sea por una acción directa sobre los túbulos seminíferos o por mecanismos indirectos desencadenados por este esteroide. Asimismo hemos planteado la posibilidad de que otros factores tales como la LH-RH o LH-RH simil, aumentados luego de la inyección de hCG, puedan generar sobre los túbulos seminíferos un efecto deletéreo del tipo aquí descrito.

Pese a que las dosis de gonadotrofina utilizadas en nuestros esquemas experimentales son muy superiores a los niveles fisiológicos de LH, la respuesta patológica obtenida constituye un arma sumamente útil para el estudio de la fisiopatología del tubo seminífero ya que permite

identificar varios de los mecanismos básicos que se hallan implicados en el funcionamiento normal del túbulo seminífero.

La evaluación de la respuesta del tejido intersticial al tratamiento hormonal demostró una hiperplasia de las células de Leydig, principalmente notable en el grupo tratado con 400 UI de hCG. Este hecho coincide con resultados previos descritos en la literatura. Es conocido desde hace tiempo, que durante la estimulación crónica con altas dosis de hCG, los agregados de células de Leydig del testículo adulto aumentan notablemente su volumen (Greep y cols., 1936; Greep, 1937). Este incremento resulta tanto del aumento en el número de células de Leydig como en el tamaño de cada una de ellas. Similares resultados fueron hallados en el testículo humano crónicamente estimulado con hCG (Maddock y Nelson, 1952). En la rata inmadura, se observa una respuesta parecida atribuida a la combinación de un incremento en las mitosis de las células de Leydig y en la diferenciación de los fibroblastos precursores (Chemes y cols., 1976a). Asimismo, Christensen y Peacock, (1980), describieron un aumento del 35% en el número de células de Leydig por cm^3 del testículo de la rata adulta a la semana del tratamiento diario con 100 UI de hCG.

La hiperplasia e hipertrofia de células de Leydig obtenidas por nosotros que concuerda con las descripciones previas de la literatura llama la atención sobre un hecho que si bien es conocido en su existencia, no es bien comprendido en sus características y mecanismos de producción. Se trata de la acción trófica de la LH-hCG sobre el intersticio testicular. Esta acción trófica de aparición y desarrollo tardío sucede temporalmente a la acción aguda o esteroidogénica de manifestación sumamente rápida luego de la administración de la hormona. Es interesante notar que en la literatura reciente si bien la acción esteroidogénica (aguda) de la LH-hCG ha sido muy estudiada, poco se ha publicado sobre la acción trófica (crónica) especialmente en lo referido a su mecanismo celular y subcelular y modalidades de aparición en el testículo inmaduro o adulto. En efecto, las descripciones disponibles (ver referencias anteriormente citadas) se limitan a consignar la estimulación de las mitosis de células de Leydig o la diferenciación a partir de elementos precursores como mecanismos reponsables del aumento del número de células de Leydig. Sin embargo, es poco conocido qué relación tienen estos mecanismos con la dinámica de los receptores de membrana a LH-hCG, la inducción de enzimas involucradas en la biosíntesis de testosterona o la capacidad esteroidogénica del testículo incluyendo las lesiones enzimáticas descriptas luego de la inyección aguda

de LH-hCG. Estas preguntas y otras relacionadas con la ontogenia de las lesiones tubulares descritas previamente en animales adultos inyectados con hCG motivaron nuestro interés en el estudio de las variaciones de la respuesta a la estimulación con la gonadotropina a lo largo de la maduración puberal del testículo.

La regulación de la función endocrina del testículo por mecanismos hormonales depende de la acción conjunta de las gonadotropinas (LH, FSH y prolactina) y de los esteroides (estrógenos y andrógenos) sobre las células de Leydig. Así como bajas concentraciones de LH son necesarias para mantener la función trófica de dichas células intersticiales, la elevación aguda de los niveles plasmáticos de la misma, ya sea por administración exógena de LH-RH o de la gonadotropina, tiene un efecto negativo sobre los receptores de LH y la subsiguiente respuesta esteroidogénica (Dufau y cols., 1978).

En efecto, la inyección de altas dosis de hCG a ratas adultas induce en las células blanco de la hormona una serie de cambios que resultan en el proceso llamado de "desensibilización". El primer cambio que se registra es la rápida pérdida de la capacidad de respuesta de la adenilato ciclasa a la hormona con la consiguiente disminución de la producción de AMPc. Esta desensibilización inicial de la

adenilatociclasa es la consecuencia inmediata de la ocupación de receptores y ocurre más tempranamente que la caída de los receptores de membrana. Las consecuencias más tardías incluyen la pérdida de receptores y cambios más distales como alteraciones en vías metabólicas que modifican la capacidad de las células de responder a futuros estímulos hormonales. Este fenómeno de desensibilización fue objeto de numerosos estudios en los últimos años y se halla ampliamente detallado en la literatura.

La estimulación de las células de Leydig del testículo adulto con LH/hCG exógena es seguida por una pérdida de receptores de LH dosis dependiente y una disminución en la repuesta de AMP_c y de testosterona de las células de Leydig aisladas cuando son incubadas con gonadotrofina "in vitro" (Hsueh y cols., 1976, 1977; Tsuruhara y cols., 1977; Haour y cols., 1977). Este último efecto es atribuido a un bloqueo parcial en la actividad de las enzimas 17-20 desmolasa y 17 α -hidroxilasa testicular (Cigorruga y cols., 1978) y es particularmente más acentuado cuando la dosis de hCG es administrada por vía endovenosa y no subcutánea (Dufau y cols., 1978, 1979; Catt y cols., 1979, 1980). Dado que se registra un aumento rápido del 17 β estradiol intratesticular luego de la inyección endovenosa de hCG o de LH-RH, se postuló que el E₂ jugaría un papel en la

producción del bloqueo enzimático. El efecto inhibitorio del E₂ endógeno sobre la esteroidogénesis testicular fue confirmado por la capacidad del tamoxifeno, conocido antagonista estrogénico de prevenir la disminución de la respuesta de la testosterona que se observa luego de la administración de la gonadotrofina (Cigorruga y cols., 1980; Nozu y cols., 1981, 1982).

Varios estudios han sido realizados en el animal neonatal y en maduración con el objeto de esclarecer las modificaciones evolutivas en la función de las células de Leydig observadas a través del desarrollo puberal de la rata (Huhtaniemi y cols., 1981, 1982, 1983; Warren y cols., 1982, 1984). En este período se detectan importantes cambios funcionales de las células de Leydig que ocurren paralelamente al desarrollo y diferenciación histológicos del tejido intersticial (Roosen-Runge y Anderson, 1959; Lording y de Kretser, 1972; Huhtaniemi y cols., 1982).

La edad de 15 a 20 días constituye un período de transición dado que la función testicular antes de esa edad es claramente diferente que luego de la misma. Los trabajos de Huhtaniemi y cols., (1981, 1982, 1983) muestran diferencias funcionales entre el testículo neonatal y el adulto. Es así como la pérdida de receptores de LH luego del tratamiento con una alta dosis de hCG se recupera muy

rápidamente y la lesión esteroidogénica que se registra en las células de Leydig adultas estimuladas con hCG "in vitro" no se observa en el testículo del animal neonatal.

Sin embargo existe en la literatura cierta controversia con respecto a este último punto. Datos publicados por Moger (1980) indican la presencia de una refractariedad testicular en animales inmaduros de 18 días de edad y más recientemente, Cheng (1986) cita la existencia de una desensibilización muy breve de las enzimas testiculares sintetizadoras de andrógenos en el animal neonatal. Resultados de Sharpe (1976) demuestran que la unión de la hCG a sitios receptores específicos en el testículo de la rata inmadura resulta en cambios en la disponibilidad de los mismos, los cuales a su vez limitan el potencial esteroidogénico del testículo. Un año más tarde este mismo autor describe que la reducción de la capacidad esteroidogénica que surge luego de la exposición a la hCG no es atribuible a la depleción de receptores sino a la capacidad del testículo de regular localmente su capacidad de respuesta ante futuras estimulaciones hormonales (Sharpe, 1977b).

Dado que la población de células de Leydig fetales predomina en el testículo durante las dos primeras semanas

de vida y de allí en más aumenta gradualmente la población adulta (Lording y de Kretser, 1972) las observaciones mencionadas anteriormente han sido interpretadas como reflejo de las características funcionales específicas de las dos poblaciones celulares.

Ha sido demostrado que altos tenores de andrógenos son necesarios en el animal fetal y neonatal para la estabilización del conducto de Wolff y la masculinización de los genitales externos y de ciertas áreas del sistema nervioso central (Jost, 1953; Donovan, 1980). La ausencia o transitoriedad de los mecanismos inhibitorios de la producción de andrógenos (desensibilización esteroideogénica y depleción de receptores de LH y prolactina) en la rata macho inmadura proporcionan a la misma los niveles androgénicos adecuados para llevar a cabo el proceso mencionado anteriormente. Esta explicación daría sentido fisiológico a la falta de funcionalidad de los mecanismos de regulación negativa hasta después de la maduración sexual puberal.

De acuerdo a los resultados enunciados, no existe hasta el momento una información definitiva sobre los mecanismos de control responsables de los cambios evolutivos en la respuesta testicular a la hCG observados durante el desarrollo puberal de la rata.

Ha sido ampliamente demostrado que la secreción de testosterona obtenida luego de la inyección de una dosis elevada de hCG sigue un patrón bifásico. Este modelo es válido tanto en el animal adulto (Haour y Saez, 1977; Hodgson y de Kretser, 1982, 1984; Calvo y cols., 1984) como en el neonatal (Huhtaniemi y cols., 1981) y consiste en un primer pico de T sérica que se registra en las primeras horas y un segundo que ocurre entre las 48 y 72 horas posteriores a la administración de la gonadotrofina. En el adulto, la disminución de los niveles circulantes del andrógeno que se observa entre ambos picos estaría relacionada con el bloqueo de la esteroidogénesis inducida por la hCG. Esta explicación sería válida también en el caso del testículo neonatal en el que algunos autores han demostrado una refractariedad a la reestimulación con hCG. Sin embargo, Huhtaniemi (1981) sugiere que la disminución de los niveles séricos de T a las 24 horas podría atribuirse, más que a bloqueos enzimáticos, a la ausencia total de receptores estimulables por la gonadotrofina. Una vez recuperados los mismos, la hormona residual que permanece en la circulación podría inducir el pico secundario de testosterona. Nuestros resultados indican que, a todas las edades estudiadas la inyección de una alta dosis de hCG genera a las 48 horas un aumento significativo de los tenores de testosterona sérica el cual posiblemente represente el componente tardío de la mencionada secreción

bifásica. Pese a que hemos observado que el nivel basal del andrógeno es superior en los animales más maduros, la magnitud del incremento en respuesta a la hCG es similar a todas las edades.

En cuanto al fenómeno de desensibilización testicular, nuestros experimentos muestran que la depleción de receptores de LH y la esteroidogénesis no siguen un patrón uniforme a lo largo de la maduración de la gonada. Animales de 7 a 35 días de edad, pretratados con hCG "in vivo" tienen la capacidad de responder a una re-estimulación gonadotrófica "in vitro" con un aumento de la secreción androgénica igual o superior a la producción máxima que se observa durante la incubación con LH en los testículos de animales controles. Esto indicaría que las lesiones de las vías biosintéticas de andrógenos que fueron descritas en la rata neonatal e inmadura (Cheng, 1986) se hallan recuperadas a las 48 horas de la estimulación aguda con hCG. Por el contrario, los testículos de los animales de 45 días no responden a la segunda estimulación gonadotrófica dado que la producción androgénica no alcanza en dichas condiciones los niveles obtenidos luego de la estimulación máxima de los testículos controles.

Estos resultados confirman datos hallados previamente en la rata inmadura (Huhtaniemi y cols., 1981, 1982, 1983)

aunque hacen extensivo a ratas de 35 días el hecho de que posean capacidad de respuesta a una re-estimulación gonadotrófica. La refractariedad observada a los 45 días coincide con lo descrito en el animal adulto.

El nivel de receptores de LH calculado a las 48 horas de la inyección de hCG muestra variaciones con la edad. En los animales de 35 y 45 días no se detecta unión de hCG a las membranas celulares lo cual indicaría una depleción total de los sitios receptores. Esta situación cambia en las edades más tempranas. A los 7 días hay un 47% de receptores remanentes con respecto a su correspondiente control. A medida que avanza la edad se registra una disminución progresiva del porcentaje, lo cual indica que en las ratas inmaduras la recuperación de los receptores testiculares de LH luego de la inyección de hCG es mucho más rápida. Esta interpretación se halla sustentada por datos publicados por Huhtaniemi (1981) y Sharpe (1976) en ratas neonatales y puberales. Estos resultados muestran que una alta dosis de hCG causa una depleción rápida de receptores de LH con un tiempo de recuperación de 48 a 90 horas mientras que en el adulto es necesario un período de 10 a 14 días para que los receptores de LH vuelvan a niveles control.

Nuestros resultados revelan que tanto la pérdida de receptores como la lesión esteroidogénica, evaluados en el testículo "in toto", son de naturaleza más transitoria en el animal inmaduro y que la transición entre ambos comportamientos ocurre durante el desarrollo puberal del testículo. Surge entonces el siguiente interrogante: ¿por qué el intersticio de la rata inmadura tiene la capacidad de recuperarse del estado de desensibilización más rápidamente?

Con el objeto de responder a esta pregunta se realizó un estudio ontogénico de la composición celular del intersticio.

En muchas especies de mamíferos, incluyendo la rata, las células de Leydig (CL) provienen de un proceso de diferenciación de células precursoras mesenquimáticas (Hooker, 1944; Roosen-Runge y Anderson, 1959; Fawcett y Burgos, 1960; Mancini y cols., 1963; Lording y de Kretser, 1972). Pese a que ha sido demostrado que en animales inyectados con hCG, las CL pueden dividirse dando origen a otras CL (Chemes y cols., 1976a; Christensen y Peacock, 1980) bajo condiciones normales éstas se originan principalmente por diferenciación de células precursoras.

En el testículo de la rata inmadura pueden identificarse dos tipos celulares predominantes: precursores mesenquimáticos y células de Leydig diferenciadas. La primer categoría celular abarca a todas las células elongadas de los espacios intertubulares, esto es a los precursores de las CL y a aquellas células que se encuentran en proceso de transformación hacia CL diferenciadas. Estos tipos celulares carecen de los criterios morfológicos aceptados para ser considerados como CL diferenciadas. Sin embargo, datos publicados recientemente en humanos (Chemes y cols., 1985) demuestran que los fibroblastos peritubulares son esteroidogénicamente activos. Este hallazgo se halla sustentado por resultados previos los cuales indican que células mesenquimáticas peritubulares de rata en cultivo, tienen la capacidad de sintetizar testosterona a partir de un sustrato como la dehidroepiandrosterona (DHEA) (Dufau y cols., 1971).

Nuestros resultados muestran que durante la maduración testicular de la rata las proporciones relativas de precursores mesenquimáticos y CL se modifican. Los PM alcanzan valores máximos a los 7 días de vida y luego disminuyen progresivamente hasta un mínimo registrado a los 45 días de edad. Por el contrario, las CL presentan un desarrollo inverso, esto es un aumento desde el nacimiento hasta la edad adulta. Estos datos sobre número relativo de

células precursoras y diferenciadas son muy bien expresados por el índice CL/PM resultante de dividir el número de CL por el de sus precursores (figuras 25 A y B). Los valores del cociente así obtenido indican que mientras que a los 7 días hay aproximadamente una célula de Leydig por cada precursor mesenquimático, a los 45 días la relación es de 6 a 1. Esto indica que en animales más jóvenes las células precursoras son relativamente más abundantes.

Es probable que, en las ratas inmaduras, la disminución de receptores de LH de las CL sea contrarrestada por un incremento simultáneo de los mismos en las células precursoras en diferenciación. Como hemos señalado que en las edades más tempranas estas células son preponderantes frente a las CL, el desarrollo de una nueva generación de células esteroideogénicas resultante de la estimulación hormonal, hace que en el testículo total el fenómeno de depleción de receptores se recupere mucho más rápidamente en animales inmaduros. Por el contrario, este proceso transcurre a una velocidad menor en el animal adulto dado que en él la población de precursores es relativamente menos abundante. Muchos de los trabajos clásicos sobre el tema de la desensibilización testicular a la LH han sido realizados estimando las variaciones en el número de sitios receptores y enzimas esteroideogénicas en testículo total. En otros se han utilizado poblaciones de

células de Leydig, así definidas por sus características bioquímicas. Esto ha llevado en general a atribuir las variaciones observadas durante la desensibilización a una única población de células de Leydig diferenciadas. Los resultados que presentamos en esta tesis demuestran que hay varias poblaciones celulares, bien diferentes citológicamente, que responden al estímulo de la LH/hCG en forma distinta. Esto hace que cuando se examina el fenómeno de la desensibilización en testículos totales, estas diferentes respuestas se superponen dando un resultado que depende del balance entre todas ellas. Esto explica satisfactoriamente los diferentes resultados en animales inmaduros y adultos aclarando que los mismos no se deben a un cambio en los mecanismos celulares básicos implicados en la desensibilización, sino más bien al predominio, según la edad, de una u otra respuesta de acuerdo al tipo celular intersticial predominante.

La cuantificación de células intersticiales de los grupos de ratas tratados con hCG confirman esta hipótesis. 48 horas luego de la exposición a la gonadotropina se produce un cambio en la composición celular del intersticio testicular a favor de las CL diferenciadas. Esto implica que durante ese lapso de tiempo se produjo una transformación de precursores a células de Leydig como lo muestran los aumentos significativos del cociente CL/PM a

los 7, 20, 26 y 35 días de edad. Este proceso se halla además reforzado por el aumento de mitosis intersticiales en los animales más jóvenes, que dan como resultado un aumento en el número de CL. Por lo tanto, a las 48 horas de la inyección de hCG el tejido intersticial de las ratas inmaduras estaría compuesto por una mezcla de las CL pre-existentes que sufrieron el agudo impacto hormonal y por una nueva generación de células esteroidogénicas. El primer grupo celular responde a la gonadotropina con una depleción de sus receptores de LH y una lesión de la esteroidogénesis. El segundo tipo celular es el resultado de la acción trófica de la hormona inyectada y expresa una nueva generación de receptores de LH y de enzimas esteroidogénicas. Por ende el resultado final observado en nuestros experimentos proviene de un balance entre ambas poblaciones celulares. Esta interpretación coincide con datos de la literatura que muestran que la administración de hCG a ratas inmaduras genera un aumento rápido de 2 a 4 veces de las CL y los PM (Chemes y cols., 1976a; Huhtaniemi y cols., 1981) en contraste a la necesidad de un período de tiempo más prolongado en el animal adulto (Christensen y Peacock, 1980). De este modo podría explicarse que la lesión esteroidogénica se halla parcialmente neutralizada por el desarrollo de una nueva maquinaria enzimática en los fibroblastos en diferenciación. Esta sería probablemente la razón del aumento sostenido de T sérica hallado en la rata

inmadura sometida a repetidas exposiciones con hCG (Chemes y cols., 1976a).

Durante el desarrollo del testículo de la rata, se demostró la presencia de 2 fases de crecimiento de las células intersticiales: la generación fetal y la adulta (Roosen-Runge y Anderson, 1959; Lording y de Kretser, 1972). Las células fetales se diferencian entre los 15 y 16 días de vida intrauterina, alcanzando una concentración máxima en el día 19. Luego del nacimiento disminuyen gradualmente hasta desaparecer de la gonada durante la tercera semana de vida post-natal. La población adulta comienza a diferenciarse en ese momento alcanzando su máxima expresión alrededor de la pubertad y persiste a lo largo de la vida adulta.

Existe en la literatura cierta controversia si se trata de dos poblaciones celulares diferentes. Se piensa que las CL fetales degeneran o se atrofian alrededor del nacimiento y aparecen luego la CL adultas (Lording y de Kretser, 1972). Otros estudios más recientes describen la presencia de células fetales hasta el día 20 de vida y su desaparición en el testículo adulto (Mendis-Handagama y cols., 1987). Por el contrario, (Kerr y cols., 1988) postulan que dichas células no desaparecen durante la vida postnatal, sino que persisten durante el período de

diferenciación y proliferación de las células adultas, siendo una población celular diferente. Huhtaniemi y cols., 1982 propusieron que las diferencias funcionales observadas en el testículo neonatal y adulto en respuesta a la hCG, se deben a la existencia de estas dos generaciones de CL a lo largo de la maduración de la gonada. Ello implicaría que las CL adultas y fetales poseen mecanismos subcelulares distintos que les permiten reaccionar con un estado de desensibilización o no, como respuesta a la inyección aguda de hCG. Sin embargo, resulta difícil aceptar la existencia de este tipo de mecanismos que implicarían un turn-over diferente de los receptores y de las enzimas esteroidogénicas en las células fetales en relación a lo que ocurre en las adultas.

En nuestros experimentos no hemos cuantificado diferencialmente las dos poblaciones de CL, pero los datos obtenidos arrojan diferencias importantes en la composición relativa de las diversas poblaciones celulares del intersticio testicular. De acuerdo a nuestros resultados creemos que una CL diferenciada (ya sea fetal o adulta) responde a la hCG con una desensibilización. Por el contrario, en la población de fibroblastos precursores predominan los efectos tróficos de la gonadotrofina, los cuales involucran la neosíntesis de receptores de LH y de enzimas esteroidogénicas. Luego de la desensibilización

inicial, las CL diferenciadas también evidencian los efectos tróficos de la hCG como fue demostrado por Hodgson y de Kretser, 1984, quienes han propuesto la hipertrofia celular como mecanismo responsable de la carencia de un período refractario luego de una segunda inyección de la misma hormona.

Pese a que no podemos descartar completamente la interpretación de Huhtaniemi, nosotros creemos que la mejor respuesta a la hCG obtenida en la rata inmadura es debida a la población de precursores de las células de Leydig que son esteroidogénicamente competentes y con alta capacidad de respuesta a la hCG.

Este estudio también demuestra que la hCG, administrada a ratas inmaduras no genera en los túbulos seminíferos lesiones de características similares a las descritas en el animal adulto en el cual concentraciones elevadas de E_2 intratesticular podrían ser las responsables del mencionado daño. Pese a que la aromatasa se halla presente en el testículo de la rata inmadura, su localización es principalmente en las células de Sertoli, las cuales no responden a la LH/hCG (Dorrington y cols., 1978). Por el contrario, durante la pubertad comienza a aumentar la actividad de dicho complejo enzimático en las células de Leydig y se torna estimulable por la LH/hCG (Valladares y

Payne, 1979 a y b; 1981). Por lo tanto, en los animales inmaduros la falta de efecto deletéreo de la gonadotrofina sobre los túbulos seminíferos podría deberse a una capacidad limitada de esta hormona de producir suficiente cantidad de E₂ intratesticular. Esto último podría también explicar la carencia de una desensibilización esteroidogénica, proceso que, en el animal adulto posee un importante componente estrógeno-dependiente. Adicionalmente, es posible que el testículo neonatal no responda a los efectos inhibitorios del estrógeno debido a la ausencia, en esa edad, de receptores estrogénicos detectables (de Boer y cols., 1976; Abney y Melner, 1979; Huhtaniemi y cols., 1982) y a niveles elevados de α -fetoproteína que une ávidamente a este esteroide disminuyendo posiblemente su biodisponibilidad (Raynaud y cols., 1971; Nunez y cols., 1972; Uriel y cols., 1972).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados presentados en este trabajo es posible extraer las conclusiones que se enumeran a continuación:

La inyección de una única y elevada dosis de hCG genera en el testículo de la rata adulta severas lesiones de los túbulos seminíferos cuyas características son las siguientes:

- 1) - aparición precoz y evolución rápida
 - intensidad variable de acuerdo a la susceptibilidad de cada individuo
 - distribución focal y localización preferentemente subalbugínea
 - asociación de la lesión con los estadios post-espermiación (XI a XIII) del ciclo espermatogénico

- 2) A los 3 meses del tratamiento con hCG se observan secuelas de la lesión inicial bajo la forma de una cicatriz residual, lo cual indica la incompleta reversibilidad de este fenómeno en el tiempo.

- 3) El daño hallado en los túbulos seminíferos luego de la administración de hCG coexiste temporalmente con niveles séricos aumentados de E₂ y deprimidos de FSH.
- 4) La depresión de los tenores de FSH sérico no está involucrada en la producción del daño dado que la reposición de los niveles de FSH circulante a valores que superan al control, no revirtió la lesión tubular hallada luego de la inyección de hCG.
- 5) Por el contrario, el aumento de E₂ intratesticular estaría implicado en la producción de la lesión dado que mimetizando el aumento de E₂ testicular hallado luego del tratamiento con hCG, mediante la inyección intratesticular de BE₂, logramos reproducir un efecto deletéreo de similares características a las que se observan luego del tratamiento con hCG.
- 6) Descartamos la posibilidad de que la hCG ejerza una acción directa sobre los túbulos seminíferos dado que demostramos la ausencia de receptores de LH en fracciones purificadas de túbulos seminíferos pertenecientes a distintos estadios del ciclo espermatogénico.

El análisis sistemático de parámetros morfológicos y funcionales de los túbulos seminíferos y el intersticio durante la maduración testicular de la rata indica que en respuesta a la inyección aguda de hCG, existe un comportamiento diferente del testículo en maduración al del adulto.

- 1) Así como clásicamente se describe en el testículo total la pérdida de receptores de membrana para la LH como consecuencia de una estimulación gonadotrófica, nuestros datos demuestran que el porcentaje de receptores de LH remanentes a las 48 horas de la administración de hCG, disminuye progresivamente con la edad alcanzando valores no detectables en los animales de 35 y 45 días. Esto significa que a medida que avanza la edad, la recuperación de los receptores de LH es más lenta.

- 2) En animales inmaduros (de 7 a 35 días) no se observa la desensibilización testicular, evaluada por la producción androgénica "in vitro" a las 48 horas de la inyección de hCG. Por el contrario, este fenómeno es detectado en los animales de 45 días de edad y se traduce en una producción androgénica disminuida cuando los testículos pre-tratados con hCG "in vivo" son sometidos a una estimulación máxima con LHh "in vitro".

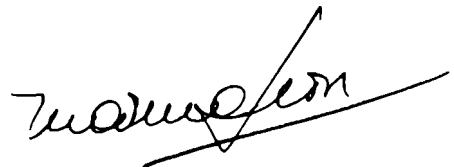
Estos resultados nos permiten concluir que la respuesta esteroidogénica a la hCG no sigue un patrón uniforme a lo largo de la maduración de la gonada. Tanto la pérdida de receptores como la lesión esteroidogénica son de naturaleza más transitoria en el animal inmaduro y la transición entre ambos comportamientos ocurre durante el desarrollo puberal del testículo.

- 3) Estas variaciones funcionales observadas a lo largo de la maduración de la rata están correlacionadas con una modificación de la composición celular intersticial la cual podría explicar las diferencias de respuesta obtenidas.

Las proporciones relativas de PM y CL halladas en cada una de las edades estudiadas indican que en los animales más jóvenes las células precursoras son relativamente más abundantes y que, por el contrario, las células de Leydig constituyen la población celular preponderante del intersticio de los animales de 45 días de edad. En los animales tratados con hCG, la gonadotropina produce un cambio en la composición celular del intersticio testicular a favor de las CL diferenciadas. Esto es el resultado de una transformación de células precursoras a CL y de un aumento de las mitosis intersticiales en los animales más jóvenes. En efecto, en las ratas inmaduras, el predominio de células precursoras en

proceso de diferenciación proporciona una nueva generación de células esteroidogénicas, resultante de la estimulación hormonal, las cuales expresan un incremento progresivo de receptores de LH y síntesis de enzimas esteroidogénicas. En consecuencia estos cambios neutralizan parcialmente el proceso de desensibilización que se observa en las células de Leydig diferenciadas y por ende el resultado final se traduce en un acortamiento en la duración del fenómeno.

- 4) La falta de efecto deletéreo de la hCG sobre los túbulos seminíferos en los animales más jóvenes estaría relacionada con la limitada capacidad de los testículos inmaduros de responder a la estimulación gonadotrófica (LH-hCG) con niveles aumentados de E₂.

A stylized handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom.A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mansour' with a long horizontal stroke extending to the right.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Abney, T.O. y Melner, M.H. Characterization of estrogen binding in the developing rat testis. Ontogeny of the testicular cytoplasmic estrogen receptor. *Steroids* 34:413, 1979.

Allen, E. Studies on cell division in the albino rat. *J. Morphol.* 31: 133, 1918.

Allen, E. Studies on degenerating sex cells in immature mammals. An analysis of degeneration in primordial and large germ cells in male albino rats aged 1-9 days. *J. Morphol.* 85:405, 1949.

Aristóteles. *Historia Animalium* (History of Animals), traducida por R. Creswell, Londres:Bohn, 1862, libro IX, capítulo 37.

Aristóteles. *Generation of Animals*. Traducido por A.L.PEEK; editado por T. E. Page, E. Capps, W. H. D. Rouse, L. A. Prost y E. H. Warmington. Londres:Heinemann, Loeb Classical Library, 1943, libro I, secc. II.

Bascom, K. Y. y Osterud, H. Quantitative studies of the testicle. II. Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. *Anat. Record* 31:159, 1925.

Beaumont, H. M. y Mandl, A. M. A quantitative study of primordial germ cells in the male rat. *J. Embryol. Exptl. Morphol.* 2:715, 1963.

Benda, C. Untersuchungen über den Bau des funktionierenden Samen kanalchens einiger Säugetiere und Folgerungen für die Spermatogenese dieser Wirbeltierklasse. *Arch. Mikroskop. Anat.* 30:49, 1887.

Berthold, A. Transplantation der Hoden. *Arch Anat. Physiol.* 16:42, 1849.

de Boer, W.; Mulder, E. y Van der Molen, H. Effects of estradiol-17 β , hypophysectomy and age on cytoplasmic estradiol-17 β receptor sites in rat testis interstitial tissue. *J. Endocrinol.* 70:397, 1976.

Burgos, M. H. y Vitale-Calpe, R. The mechanism of spermiation in the toad. *Am. J. Anat.* 120:227, 1967.

Burgos, M. H.; Vitale-Calpe, R. y Russo, J. Effect of LH in the seminiferous tubule at the subcellular level. En: Gonadotropins; Rosemberg, E. ed.: Geron X, Los Altos, Calif. 1968, p. 213.

Burgos, M. H. y Vitale-Carpe, R. Gonadotropic control of spermiation. En: Progress in Endocrinol.; Gual, C. ed.; Excerpta Medica Fdn., Amsterdam, 1969, p. 1030.

Burgos, M. H. y Cavicchia, J. C. The effect of LH and copulation on the number of spermatozoa in the rat testis. Int. J. Androl. 4:367, 1981.

Bustos-Obregón, E. On Sertoli cell number and distribution in rat testis. Arch. Biol.; Paris 81:99, 1970.

Calvo, J. C.; Radicella, J.P.; Pignataro, O.P. y Charreau, E. H. Effect of a second injection of human chorionic gonadotropin on the desensitized Leydig cells. Mol. Cell. Endocrinol. 34:31, 1984.

Catt, K. J. y Dufau, M.L. En: Hormone receptor interactions. Molecular aspects. Levey, G.S. ed.; Modern Pharmacology -Toxicology, Marcel Dekker, Inc. New York, vol. 9, 1976, p. 171.

Catt, K. J.; Harwood, J. P.; Aguilera, G. y Dufau, M. L. Hormonal regulation of peptide receptors and target cells responses. *Nature*, 280:109, 1979.

Catt, K. J.; Harwood, J. P.; Clayton, R. N.; Davies, T. F.; Chan, V.; Katikineni, M.; Nozu, K y Dufau, M. L. Regulation of peptide hormone receptors and gonadal steroidogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.* 36:557, 1980.

Cigorruga, S. B.; Dufau, M. L. y Catt, K. J. Regulation of LH receptors and steroidogenesis in gonadotropin desensitized Leydig cells. *J. Biol. Chem*, vol. 253, 12: 4297, 1978.

Cigorruga, S. B.; Sorrel, S.; Bator, J.; Catt, K. J. y Dufau, M. L. Estrogen dependence of gonadotropin induced steroidogenic lesion in rat testicular Leydig cells. *J. Clin. Invest.* 65:699, 1980.

Clayton, R. N.; Katikineni, M.; Chan, V.; Dufau, M. L. y Catt, K. J. Direct inhibition of testicular function by Gn-RH mediation by specific Gn-RH receptors in interstitial cells. *Proc. Natn. Acad. Sci.* 77:4459, 1980.

Clegg, E. J. Puberal growth in the Leydig cells and accessory reproductive organs of the rat. *J. Anat.*, London 100:369, 1966.

Clermont, Y. y Perey, B. The stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat: practical definitions in PAS and Hematoxilin-eosin stained sections. *Revue Canadienne de Biologie*, 16:451, 1957a.

Clermont, Y. y Perey, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am. J. Anat.* 100:241, 1957b.

Clermont, Y.; Leblond, C. P. y Messier, B. Durée du cycle de l'epithélium seminal du rat. *Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exp.* 48:37, 1959.

Cusan, L.; Pelletier, G.; Belanger, A.; Seguin, C.; Kelly, P. A. y Labrie, F. Inhibition of spermatogenesis during long-term treatment with hCG in the rat. *J. Androl.* 3:124, 1982.

Chemes, H. E.; Rivarola, M. A. y Bergadá, C. Effect of hCG on the interstitial cell and androgen production in the immature rat testis. *J. Reprod. Fert.* 46:279, 1976a.

Chemes, H. E.; Rivarola, M. A. y Bergadá, C. Effect of gonadotrophins and T in the seminiferous tubules of the immature rat. J. Reprod. Fert. 46:283, 1976b.

Chemes, H. E.; Gottlieb, S. E.; Pasqualini, T.; Domenichini, E.; Rivarola, M. A. y Bergadá, C. Response to acute hCG stimulation and steroidogenic potential of Leydig cell fibroblastic precursors in humans. J. Androl. 6:102, 1985.

Chen, Y. D. I. y Payne, A. H. Regulation of testicular LH receptors by homologous hormone in vitro studies on receptor occupancy and receptor loss. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74:1589, 1977.

Cheng, H. C. Acute effect of human chorionic gonadotropin on 17 α -hydroxylase and C17-20 lyase activity in neonatal or prepubertal rat testis. J. Steroid Biochem. 24:1061, 1986.

Chowdhury, A. K. y Steinberger, E. Effect of 5 α - reduced androgens on sex accessory organs. Initiation and maintenance of spermatogenesis in the rat. Biol. Reprod. 12:609, 1975.

Christensen, A. K. y Mason, N. R. Comparative ability of seminiferous tubules, of interstitial tissue of rat testis to synthesize androgens from progesterone-¹⁴C in vitro. *Endocrinology*, 76:646, 1965.

Christensen, A. K. y Peacock, K. C. Increase in Leydig cell number in testes of adult rats treated chronically with an excess of hCG. *Biol. Reprod.* 22:383, 1980.

Damber, J. E.; Widmark, A. y Bergh, A. The effect of LH on testicular microcirculation and vascular permeability. IV European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the testis. Capri, Italy, April 9-12, 1986.

Damber, J. E.; Bergh, A. y Widmark, A. Is the testicular vasculature in immature and adult rats differently regulated? V European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the testis. Brighton, U. K., April 13-16, 1988.

Donovan, B. T. Role of hormones in perinatal brain differentiation. En: *The Endocrine Function of the Brain*. Motta, M., ed.; Raven Press, New York, 1980, p. 117.

Dorrington, J. H.; Fritz, I. B. y Amstrong, D. T. Control of testicular estrogen synthesis. *Biol. Reprod.* 18:55, 1978.

Dufau, M. L.; de Kretser, D. M. y Hudson B. Steroid metabolism by isolated rat seminiferous tubules in tissue culture. *Endocrinology*, 88:825, 1971.

Dufau, M. L.; Hsueh, A. J.; Cigorruga, S.; Baukal, A. J. y Catt, K. Inhibition of Leydig cell function through hormonal regulatory mechanisms. V Annual Workshop on the Testis, Geilo, Norway. April 1978. *Endocrine approach to male contraception, Int. J. Androl., Suppl.* 2:193, 1978.

Dufau, M. L.; Cigorruga, S.; Baukal, A. J.; Sorrel, S.; Bator, J. M.; Neubauer, J. F. y Catt, K. J. Androgen biosynthesis in Leydig cells after testicular desensitization by LH-RH and hCG. *Endocrinology*, 105:1314, 1979.

Elias, H. Hennig, A. y Schwartz, D. E. Stereology: Applications to biomedical research. *Physiol. Rev.* 51(1): 158, 1971.

Fawcett, D. W. y Burgos, M. H. Studies on the fine structure of the mammalian testis. II. The human interstitial tissue. *Am. J. Anat.* 107:245, 1960.

Fawcett, D. W.; Heidger, P. M. y Leak, L. V. Lymph vascular system of the interstitial tissue of the testis as revealed by electron microscopy. *J. Reprod. Fert.* 19:109, 1969.

Fawcett, D. W. Ultrastructure and function of the Sertoli cell. En: *Handbook of Physiology, Endocrinology*, vol. 5, chapter 2. Hamilton, D. W. y Greep, R. O., eds Williams and Wilkins, Baltimore, 1975, p. 21.

Flickinger, C. J. The influence of progestin and androgen on the fine structure of the male reproductive tract of the rat. I. General effects and observations on the testis. *Anat. Record*, 187:405, 1977.

Gondos, B.; Renston, R. H. y Goldstein, D. A. Post-natal differentiation of Leydig cells in the rabbit testis. *Am. J. Anat.* 145(2):167, 1976.

Greep, R.; Fevold, H. y Hisaw, F. Effects of 2 hypophyseal gonadotropic hormones on reproductive system of male rat. *Anat. Record*, 65:261, 1936.

Greep, R. y Fevold, H. The spermatogenic and secretory function of the gonads of hypophysectomized adult rats treated with pituitary FSH and LH. *Endocrinology*, 21:611, 1937.

Hall, P. F. The effect of interstitial cell-stimulating hormone on the biosynthesis of testicular cholesterol from acetate-¹⁴C. *Biochemistry*, 2:1232, 1963.

Hall, P. F. On the stimulation of testicular steroidogenesis in the rabbit by interstitial cell-stimulating hormone. *Endocrinology*, 78:690, 1966.

Hall, P. F. y Eik-Nes, K. B. The effect of interstitial cell-stimulating hormone on the production of pregnenolone by rabbit testis in the presence of an inhibitor of 17- α -hidroxylase. *Biochem. Biophys. Acta* 86:604, 1964.

Haour, F. y Saez, J. hCG dependent regulation of gonadotropin receptor sites: negative control in testicular Leydig cells. *Mol. Cell. Endoc.* 7:17, 1977.

Haour, F.; Sanchez, P.; Gallet, D. y Saez, J. M. Désensibilisation par la gonadotrophine chorionique humaine (hCG): mise en évidence d'un contrôle négatif des récepteurs des gonadotrophines par la hCG au niveau des

cellules de Leydig du testicule. C. R. Acad. Sci. (Paris) 284(15):1429, 1977.

Hodgson, Y. M. y de Kretser, D. M. Serum T response to single injection of hCG, ovine LH and LH-RH in male rats. Int. J. Androl. 5:81, 1982.

Hodgson, Y. M. y de Kretser, D. M. Acute responses of Leydig cells to hCG; evidence for early hypertrophy of Leydig cells. Mol. Cell. Endoc. 35:75, 1984.

Hooker, Ch. W. The posnatal history and function of the interstitial cells of the testis of the bull. Amer. J. Anat. 74(1):1, 1944.

Hsueh, A. J. W., Dufau, M. L. y Catt, K. J. Regulation of LH receptors in testicular interstitial cells by gonadotropin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 72:1145, 1976.

Hsueh, A. J. W.; Dufau, M. L. y Catt, K. J. Gonadotropin - induced regulation of LH receptors and desensitization of testicular 3':5' cyclic AMP and T responses. Proc. Natl. Acad. Sci. 74(2):592, 1977.

Huckins, C. Changes in gonocytes at the time of initiation of spermatogenesis in the rat (Abstract). *Anat. Record* 145: 243, 1963.

Huhtaniemi, I. T.; Katikineni, M. y Catt, K. J. Regulation of LH receptors and steroidogenesis in the neonatal rat testis. *Endocrinology*, 109(2):588, 1981.

Huhtaniemi, I. T.; Nozu, K.; Warren, D. W.; Dufau, M. L. y Catt, K. J. Acquisition of regulatory mechanisms for gonadotropin receptors and steroidogenesis in the maturing rat testis. *Endocrinology*, 111(5):1711, 1982.

Huhtaniemi, I. T.; Warren, D. W.; Apter, D. y Catt, K. J. Absence of gonadotropin-induced desensitization of T production in the neonatal rat testis. *Mol. Cell. Endoc.* 32:81, 1983.

Jost, A. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Progr. Horm. Res.* 8:379, 1953.

Kerr, J. B. y Sharpe, R. M. Macrophage activation enhances the hCG-induced disruption of spermatogenesis. V European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the testis. Brighton, U. K., April 13-16, 1988.

Kotite, N. J.; Nayfeh, S. N. y French, F. S. FSH and androgen regulation of Sertoli cell function in the immature rat. Biol. Reprod. 18:65, 1978.

Labrie, F.; Cusan, L.; Seguin, C.; Belanger, A.; Pelletier, G.; Reeves, J.; Kelly, P. A.; Lerray, A. y Raynaud, J. P. Antifertility effects of LH-RH agonists in the male rat and inhibition of testicular steroidogenesis in man. Int. J. Fert. 25(3):157, 1980.

Leblond, C. P. y Clermont, Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin sulfuric acid" technique. Am. J. Anat. 90(2):167, 1952a.

Leblond, C. P. y Clermont, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Ann. N. Y. Acad. Sci. 55:548, 1952b.

Leydig, F. von. Lehrbuch der Histologie des Menschen und der Tiere. Frankfurt am Main, 1857.

Libertun, C. Radioinmunoanálisis. López eds. Buenos Aires, 1980.

Lording, D. W. y de Kretser, D. M. Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *J. Reprod. Fert.* 29:261, 1972.

Maddock, W. O. y Nelson, W. O. The effects of chorionic gonadotropin in adult men: increased estrogen and 17 ketosteroid excretion, gynecomastia, Leydig cell stimulation and seminiferous tubule damage. *J. Clin. Endoc. Metab.* 12(8): 985, 1952.

Maddocks, S. y Sharpe, R. M. Regulation of IFV by the seminiferous tubules. V European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the testis. Brighton, U. K., April 13-16, 1988.

Mancini, R. E.; Vilar, O.; Lavieri, J. C.; Andrada, J. A. y Heinrich, J. J. Development of Leydig cells in the normal human testis. A cytological, cytochemical and quantitative study. *Am. J. Anat.* 112(2):203, 1963.

Mendis-Handagama, S.; Risbridger, G. y de Kretser, D. Morphological analysis of the components of the neonatal and the adult rats testis interstitium. *Int. J. Androl.* 10: 525, 1987.

Moger, W. Temporal changes in testicular estradiol and testosterone concentrations, cytoplasmic estradiol binding and desensitization after human chorionic gonadotropin administration to the immature rat. *Endocrinology*, 106(2): 496, 1980.

Molinolo, A. A.; Lanari, C.; Charreau, E. H.; Sanjuan, N. y Dosne Pasqualini, C. Mouse mammary tumors induced by medroxiprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J. Nat. Cancer Inst.* 79:1341, 1987.

Niemi, M. e Ikonen, M. Histochemistry of the Leydig cells in the postnatal prepubertal testis of the rat. *Endocrinology*, 72:443, 1963.

Nozu, K.; Dufau, M. L. y Catt, K. J. Estradiol receptor-mediated regulation of steroidogenesis in gonadotropin desensitized Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 86(1):1915, 1981.

Nozu, K.; Dehejia, A.; Zawistowich, L.; Catt, K. J. y Dufau, M. L. Gonadotropin induced desensitization of Leydig cells in vivo and in vitro. Estrogen action in the testis. *Ann. N. Y. Sci.* 383:212, 1982.

Nunez, E. A.; Benassayag, C.; Engelmann, F.; Vallette, G.; Hurst, L. y Jayle, M. F. Binding of estrogens to serum

proteins of rats treated with hepatocarcinogenic compounds. *Biomedicine*, 18:515, 1972.

Parvinen, M. Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocrine Reviews*, 3(4):404, 1982.

Parvinen, M. y Ruokonen, A. Endogenous steroids in the rat seminiferous tubules. Comparison of the stages of the epithelial cycle isolated by transillumination assisted microdissection. *J. Androl.* 3(4):211, 1982.

Parvinen, M. y Vanha-Perttula, T. Identification and enzyme quantitation of the stages of the seminiferous epithelial wave in the rat. *Anat. Record*, 174:435, 1972.

Pelletier, G.: Cusan, L.; Auclair, C. Kelly, P. A.; Desy, L. y Labrie, F. Inhibition of spermatogenesis in the rat by treatment with (D-Ala⁶ Des, Gly- NH₂10) LH-RH ethylamide. *Endocrinology*, 103(2):641, 1978.

Perey, B.; Clermont, Y. y Leblond, C. P. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am. J. Anat.* 108:47, 1961.

Raynaud, J. P.; Mercier-Bodard, C. y Baulieu, E. E. Rat estradiol binding plasma protein. *Steroids*, 18:767, 1971.

Regaud, C. Etude sur la structure des tubes seminifères et sur la spermatogenèse chez les mammifères. Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exptl. 4:101-156, 231-280, 1901.

Roosen-Runge, E. C. Quantitative analysis of seminiferous tubules in the Sprague-Dawley rat 1-10 days after birth (Abstract). Am. Zool. 2:322, 1962.

Roosen-Runge, E. C. y Anderson, D. The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat. Acta Anat. 37:125, 1959.

Roosen-Runge, E. C. y Leik, J. Gonocyte degeneration in the postnatal male rat. Am. J. Anat. 122:275, 1968.

Russell, L. D. y Clermont, Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. Anat. Rec. 187:347, 1977.

Sapsford, C. S. The development of the testis of the murino ram, with special reference to the origin of the adult stem cell. Australian J. Agri. Res. 13:487, 1962.

Sertoli, E. Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano. II Morgagni 7:31, 1865.

Setchell, B. P.; Bustamante, J. C.; Galil, K. A. A.; Laurie, M. S. y Sharpe, R. M. Changes in capillary permeability in the testis after injection of hCG in normal and aspermatogenic rats. Ann. N. Y. Acad. Sci. 383:499, 1982.

Sharpe, R. M. hCG induced decrease in availability of rat testis receptors. Nature, 264:644, 1976.

Sharpe, R. M. Relationship between T, fluid content and LH receptors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 75(3):711, 1977a.

Sharpe, R. M. Gonadotropin-induced reduction in the steroidogenic responsiveness of the immature rat testis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76(3):957, 1977b.

Sharpe, R. M. Extra-pituitary actions of LHRH and its agonists. Nature, 286(5768):12, 1980.

Sharpe, R. M. y Fraser, H. M. hCG stimulation of testicular LH-RH like activity. Nature, 287:642, 1980.

Sharpe, R. M.; Fraser, H. M.; Cooper, I. y Rommerts, F. F. G. Sertoli - Leydig cell communication via an LHRH- like factor. *Nature*, 290:785, 1981.

Smith, P. E. The disabilities caused by hypophysectomy and their repair. *J. Am. Med. Assoc.* 88:158, 1927.

Smith, P. E. Hypophysectomy and a replacement therapy in the rat. *Am. J. Anat.* 45:205, 1930.

Steinberger, E.; Steinberger, A. y Ficher, M. Study of spermatogenesis and steroid metabolism in cultures of mammalian testis. *Recent Progr. Horm. Res.* 26:547, 1970.

Tsuruhara, T.; Dufau, M. L.; Cigorruga, S. y Catt, K. J. Hormonal regulation of testicular LH receptors. *J. Biol. Chem.* 252(24):9002, 1977.

Uriel, J.; De Nechaud, B. y Dupier, S. M. Estrogen binding properties of rat, mouse and man foeto-specific serum proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40:1175, 1972.

Van Vliet, J; Wensing, C. J. G.; Rommerts, F. F. G.; DE Rooy, D. G.; Saxena, P. R. y Zijlstra, F. J. Reduction of testicular blood flow and focal testicular degeneration after administration of hCG to rats. IV European Workshop

on Molecular and Cellular Endocrinology of the testis. Capri, Italy, April 9-12, 1986, p. 157.

Valladares, L. E. y Payne, A. H. Induction of testicular aromatization by LH in mature rats. *Endocrinology*, 105:431, 1979a.

Valladares, L. E. y Payne A. H. Acute stimulation of aromatization in Leydig cells by human chorionic gonadotropin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:4460, 1979b.

Valladares, L. E. y Payne, A. H. Effects of hCG and AMPc on aromatization in purified Leydig cells of immature and mature rats. *Biol. Reprod.* 25:752, 1981.

Vilar, O.; Perez del Cerro, M. I. y Manami. R. E. The Sertoli cell as a "bridge cell" between the basal membrane and the germ cells. *Exptl. Cell Res.* 27:158, 1962.

Vitale-Calpe, R. y Burgos, M. H. The mechanism of spermiation in the hamster: Ultrastructure of spontaneous spermiation. *J. Ultrast. Res.* 31:381, 1970a.

Vitale-Calpe, R. y Burgos, M. H. The mechanism of spermiation in the hamster.: The ultrastructural effects of

coitus and of LH administration. J. Ultrast. Res. 31:394, 1970b.

Von Ebner, V. Untersuchungen über den Bau der SamenKanälchen und die Entwicklung der Spermatozoiden bei den Säugtieren und beim Menschen. Leipzig: Rollet's Untersuchungen aus dem Institut für Physiologie und Histologie in Graz, 1871, p. 200.

Von Ebner, V. Die Geschlechter. En: A. Kolliker's Handbuch der Gewebelehre des Menschen. 6^{te} ed. Leipzig, 1902, vol. 3.

Von Kolliker, R. A. Beiträge zur Kenntnis der Geschlechtsverhältnisse und der Samenflüssigkeit wirbelloser Tiere. Berlin, 1841.

Von La Vallette St., G. Über die Genese der Samenkörper. Arch. Mikroskop. Anat. 12:797, 1876.

Warren, D. W.; Dufau, M. L. y Catt. K. J. Hormonal regulation of gonadotropin receptors and steroidogenesis in cultured fetal rat testes. Science. 218:375, 1982.

Warren, D. W.; Huhtaniemi, I. T.; Tapanainen, J.; Dufau, M. L. y Catt. K. J. Ontogeny of gonadotropin receptors in the fetal and neonatal rat testis. *Endocrinology*, 114(2):470, 1984.