

## Tesis de Posgrado

# Participación de la inervación monoaminérgica en la regulación de la función testicular

Campos, María Beatriz

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Campos, María Beatriz. (1991). Participación de la inervación monoaminérgica en la regulación de la función testicular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2456\\_Campos.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2456_Campos.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Campos, María Beatriz. "Participación de la inervación monoaminérgica en la regulación de la función testicular". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2456\\_Campos.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2456_Campos.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

Tesis presentada para optar al título de  
Doctora en Ciencias Químicas

**PARTICIPACION DE LA INERVACION MONOAMINERGICA  
EN LA REGULACION DE LA FUNCION TESTICULAR**

**Autora: Lic. María Beatriz Campos**

**Director: Dr. Ricardo S. Calandra**

**Co-directora: Dra. Sara R. Chiochio**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL**

**-1991-**

*Tesis.*  
*2456*  
*ej. 3*

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**PARTICIPACION DE LA INERVACION MONOAMINERGICA  
EN LA REGULACION DE LA FUNCION TESTICULAR**

**Tesis presentada para optar al título de  
Doctora en Ciencias Químicas**

**Autora: Lic. María Beatriz Campos**

**Director: Dr. Ricardo S. Calandra**

**Co-directora: Dra. Sara R. Chiocchio**

El presente trabajo de Tesis ha sido realizado en el Instituto de Biología y Medicina Experimental, Vuelta de Obligado 2490, Buenos Aires, Argentina.

A Esteban, Carolina y Santiago.

A mis padres.

A mi amiga, Mónica N. Ritta, por su calidez, su constante estímulo y su inestimable participación en la dirección de este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo S. Calandra, por haberme brindado la oportunidad de iniciarme en la investigación científica, realizando el presente trabajo bajo su dirección. Quisiera agradecerle muy especialmente el haberme otorgado la libertad de trabajar en colaboración con otros grupos de investigación.

A la Dra. Sara R. Chiocchio por su inestimable participación en la dirección de este trabajo. Por su paciencia y dedicación para transmitirme su experiencia y conocimientos y por la amistad que se generó a lo largo de estos años.

Al Dr. Eduardo Charreau por su excelente disposición, su asesoramiento y ayuda en la realización de esta Tesis. Quisiera agradecerle su comprensión y consejos que me permitieron superar las dificultades propias de este trabajo.

A la Dra. Mónica N. Ritta por su incesante y desinteresada colaboración a lo largo de estos años. Por los proyectos compartidos y por haberme brindado la posibilidad de iniciar una nueva etapa en mi carrera científica.

A la Dra. María Leiza Vitale por su invalorable ayuda en los trabajos compartidos.

A Diana Bas por su cálida amistad, colaboración y excelente apoyo técnico.

A mis compañeros de Laboratorio: Diana, Isabel, Mónica, Silvia, Paula, Olga, Debbie, Marcelo, Laura, Fernando, Susana y Corina por su colaboración y compañerismo.

A Marcelo de las Heras, Ruth Rosestein y Eduardo Choluyan, por la discusión de resultados que enriquecieron este trabajo.

A Carmen de Vicenzo e Isabel Lopez por su excelente apoyo técnico.

A María Laura Pisano y María Teresa Di Vietro por su excelente disposición y ayuda en la recopilación de material bibliográfico.

A Ricardo D. Damnotti y Marcelo Lamamí por las excelentes ilustraciones de esta Tesis, sus trabajos de fotografía y su inagotable paciencia.

Al Dr. Carlos Libertum y sus colaboradores por las determinaciones de hormonas hipofisarias.

A la Dra Alcira Aragonés, mi consejera de estudios, por su asesoraminto.

A Fernanda Fabiani por su inestimable colaboración en la impresión del presente trabajo.

Al personal del Instituto de Biología y Medicina experimental, por su eficiente colaboración, y por la cordialidad del trato diario.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado las Becas Internas que permitieron realizar esta Tesis.



Al Instituto de Biología y Medicina Experimental y al Instituto de Neurobiología, por haberme permitido disponer de todos los elementos que posibilitaron el desarrollo de este trabajo.

A Esteban, por su permanente estímulo y comprensión. Gracias, por la paciencia y por el gran esfuerzo realizado en esta última etapa, que me ayudaron infinitamente a terminar este trabajo. Gracias, a Caro y a Santi por el cariño, la dulzura y todas las satisfacciones que me dan día a día.

### Abreviatutas utilizadas

3- $\alpha$ diol	5 $\alpha$ -androstandio 3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol
3- $\beta$ HSD	3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
<sup>3</sup> H-SAM	<sup>3</sup> H-S-adenosil metionina
5-HIAA	ácido 5-hidroxiindol acético
5-HT	5-hidroxitriptamina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
6-OHDA	6-hidroxidopamina
8-OH DPAT	2-dipropilamino-8-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidro-naftaleno, HBr.
ABP	proteína ligadora de andrógenos
AC	adenilato ciclasa
Ach	acetilcolina
ACTH	hormona adenocórticotrófica
ADN	ácido desoxiribonucleico
AE	actividad específica
AMP <sub>c</sub>	adenosina-3',5'-monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
$\beta$ -end	$\beta$ -endorfina
Bmax	unión máxima
BSA	albúmina sérica bovina
SCC	sistema enzimático que cliva la cadena lateral del colesterol.
Ci	Curie
[ <sup>3</sup> H] CGP-12177	(4-(3-t-butilamino-2-hidroxiopropoxi)-[5,7- <sup>3</sup> H]benzimidazole-2-ona)
COMT	catecol-O-metil transferasa
CRF	factor liberador de corticotrofina
DA	dopamina
DS	desviación standard
E	epinefrina
ED <sub>50</sub>	dosis efectiva 50
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético

ES	error standard
FSH	hormona folículo estimulante
GABA	ácido gamma aminobutírico
GRP	péptido liberador de gastrina
hCG	gonadotrofina coriónica humana
Hepes	ácido (N-[2-hidroxietil]piperazine-N'-[2-eta- nesulfónico])
hplc	cromatografía líquida de alta presión
ISO	isoproterenol
Ka	constante de afinidad
Kd	constante de disociación
L	libre
L-DOPA	l- dihidroxifenilalanina
LH	hormona luteinizante
LHRH	hormona liberadora de gonadotrofinas
M199	medio 199
MAO	monoaminoxidasa
MCU	máxima capacidad de unión
MIS	sustancia inhibidora de la meiosis
MIX	metilisobutilxantina
MN	metanefrina
MSH	hormona melanocito estimulante
MT	metoxitiramina
NAD	nicotinamida-adenina-dinucleótido
NE	norepinefrina
NM	normetanefrina
NPY	neuropéptido Y
OPT	ortoftaldehido
PBS	buffer fosfato salino
PK	quinasa de proteína
POMC	proopiomelanocortina
PRL	prolactina
RIA	radioinmunoensayo
rpm	revoluciones por minuto
SP	sustancia P
SNC	sistema nervioso central

T	testosterona, 4-androsteno-17 $\beta$ -ol-3-ona
TBP	tetrafenilborato
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
U	unido
UI	unidades internacionales
VIP	péptido intestinal vasoactivo

## INDICE

Página

<b><u>CONSIDERACIONES GENERALES</u></b> .....	1
 <b><u>INTRODUCCION</u></b>	
<b>Morfología testicular</b> .....	4
- Compartimiento tubular.....	6
- Tejido intersticial.....	11
- Líquido intersticial.....	13
<b>El sistema nervioso autónomo. La inervación del tracto genital masculino.</b>	
- Sistema nervioso autónomo.....	15
- Catecolaminas.....	18
- Serotonina.....	20
- Inervación del tracto genital masculino.....	24
- Inervación testicular.....	26
<b>Función endócrina del testículo.</b>	
- Biosíntesis testicular de andrógenos.....	31
- Regulación de la síntesis de andrógenos por la hormona luteinizante.....	35
- Relaciones parácrinas testiculares.....	38
<b>Neurotransmisores y función testicular.</b>	
- Presencia de neurotransmisores en el testículo.....	44
- Efectos de los neurotransmisores sobre la función testicular.....	46
- Desnervación testicular.....	53
 <b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	56
 <b><u>MATERIALES Y METODOS</u></b>	
Drogas y reactivos.....	57
Animales.....	58

Procedimientos quirúrgicos.....	58
<u>Tejidos:</u>	
Aislamiento de los compartimientos testiculares para la determinación de monoaminas.....	59
Obtención de células intersticiales.....	61
Determinación del porcentaje de células con actividad de 3 $\beta$ - hidroxisteroide deshidrogenasa.....	62
Determinación de porcentaje de células viables.....	62
<u>Purificación de células de Leydig:</u>	
Purificación por metrizamida.....	63
Purificación por Percoll.....	63
<u>Determinación de monoaminas testiculares:</u>	
Determinación de monoaminas por histoquímica de fluorescencia.....	64
Técnica espectrofluorométrica para la detección de 5-HT...	65
Determinación de 5-HT por hplc.....	67
Determinación de catecolaminas por hplc.....	70
Técnica radioenzimática para la determinación de catecolaminas.....	72
<u>Determinación de la producción "in vitro" de andrógenos:</u>	
Incubación de testículo entero.....	74
Incubación de células intersticiales o células de Leydig purificadas.....	75
<u>Receptores testiculares:</u>	
Determinación de receptores de 5-HT .....	77
Determinación de receptores de LH.....	79
Determinación de receptores de FSH.....	80
Determinación de receptores de prolactina.....	80
Determinación de receptores $\beta$ adrenérgicos.....	83
 <u>Estudio morfológico del testículo</u>	
Microscopía óptica y electrónica .....	84

Determinaciones hormonales

Determinación de esteroides..... 85  
 Determinación de hormonas proteicas..... 86

Otros métodos

Determinación de proteínas..... 86  
 Análisis estadístico..... 87

**RESULTADOS**

**Inervación monoaminérgica testicular**

- Identificación de monoaminas por histoquímica de fluorescencia..... 88  
 - Contenido testicular de 5-HT ..... 91  
 - Distribución de 5-HT y catecolaminas en los distintos compartimientos testiculares aislados..... 93  
 - Presencia de 5-HT en los nervios espermáticos superiores..... 96  
 - Efecto de la desnervación sobre el contenido de 5-HT. 99

**Efecto de 5-HT sobre la producción de andrógenos "in vitro"**..... 102

**Receptores serotoninérgicos testiculares**

- Estudio de la unión de <sup>3</sup>H-5-HT a membranas testiculares..... 107  
 - Estudio de la unión de <sup>3</sup>H-5-HT a membranas de células intersticiales..... 110

**Efecto de la sección del nervio espermático superior  
sobre la esteroidogénesis testicular**

<b><u>Desnervación testicular en rata adulta:</u></b> .....	114
- Producción <u>in vitro</u> de andrógenos.....	116
- Receptores testiculares para gonadotrofinas y prolactina.....	119
- Receptores $\beta$ adrenérgicos.....	124
<b><u>Desnervación en ratas prepubescentes:</u></b> .....	128
- Producción <u>in vitro</u> de andrógenos.....	132
- Receptores testiculares para gonadotrofinas.....	132
- Receptores $\beta$ -adrenérgicos.....	135
- Ontogenia de los receptores $\beta$ -adrenérgicos en células de Leydig.....	139
- Morfología del testículo desnervado.....	139
 <b><u>DISCUSION</u></b> .....	142
<b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	177
<b><u>REFERENCIAS</u></b> .....	179



## CONSIDERACIONES GENERALES

Los atributos más sobresalientes de los seres vivos son quizá, su complejidad, su alto grado de organización y la extraordinaria capacidad de reproducirse.

Los organismos unicelulares son capaces de realizar todas las funciones necesarias para mantener la vida. La célula asimila los nutrientes del medio y lleva a cabo todas las reacciones metabólicas para adquirir energía y sintetizar nuevas moléculas. En los organismos pluricelulares, en cambio, la situación es más compleja. Las células se han diferenciado para cumplir funciones específicas y se encuentran agrupadas en tejidos, órganos y sistemas. La supervivencia de estos organismos, que deben coordinar todas esas funciones tan diversas y a su vez adaptarse constantemente a los cambios del medio ambiente, depende en gran medida de la habilidad con que se interrelacionan sus distintos componentes. La comunicación intercelular es fundamental para el desarrollo de cada célula, la organización de un tejido, el control del crecimiento y la división y para lograr la correcta coordinación de toda la actividad del organismo.

La existencia de moléculas que actúan como transmisores de información entre células ha sido sin duda el mecanismo de comunicación biológica más estudiado. La importancia y complejidad de la comunicación intercelular en los animales

superiores sugiere que una gran parte de sus genes están involucrados en tal proceso, codificando una extensa variedad de señales químicas y estructuras capaces de reconocer e interpretar los mensajes celulares.

En la mayoría de los organismos superiores, la comunicación mediada por sustancias químicas se organiza en dos grandes sistemas de información: el sistema endócrino y el sistema nervioso. Las células endócrinas y nerviosas están altamente especializadas para lograr una eficiente comunicación. Las primeras sintetizan y secretan hormonas que viajan a través de los fluidos biológicos hasta sus células efectoras donde son reconocidas y ejercen su acción. Las células nerviosas, en cambio, están adaptadas para conducir un impulso nervioso que, desde su lugar de origen, viaja como una despolarización secuencial hasta el terminal, donde desencadena un proceso que culmina con la liberación de un neurotransmisor al espacio sináptico. Estas señales químicas específicas de cada tipo neuronal estimulan la membrana de su célula efectora interactuando con receptores específicos.

Estos dos sistemas se hallan interrelacionados y esta interrelación es la base de la neuroendocrinología. Las células neurosecretoras capaces de convertir una señal nerviosa en una secreción hormonal constituyen la interfase neuroendócrina más estudiada, y han eclipsado en parte todos los demás fenómenos de interacción entre las células nervio-

sas y endócrinas.

Sin embargo, en las últimas décadas se ha reconocido que los nervios periféricos que llegan a un tejido u órgano endócrino son capaces de ejercer una función regulatoria, la que hasta entonces se consideraba exclusivamente dentro del terreno hormonal.

En el caso particular del testículo se dispone de una extensa información sobre los mecanismos de regulación hormonal que afectan sus dos funciones primordiales: la producción de espermatozoides y la síntesis de andrógenos. La posibilidad de una regulación neuroendócrina periférica a nivel testicular ha recibido sin embargo menos atención. Fue el propósito del presente trabajo contribuir a esclarecer la existencia de este fenómeno.

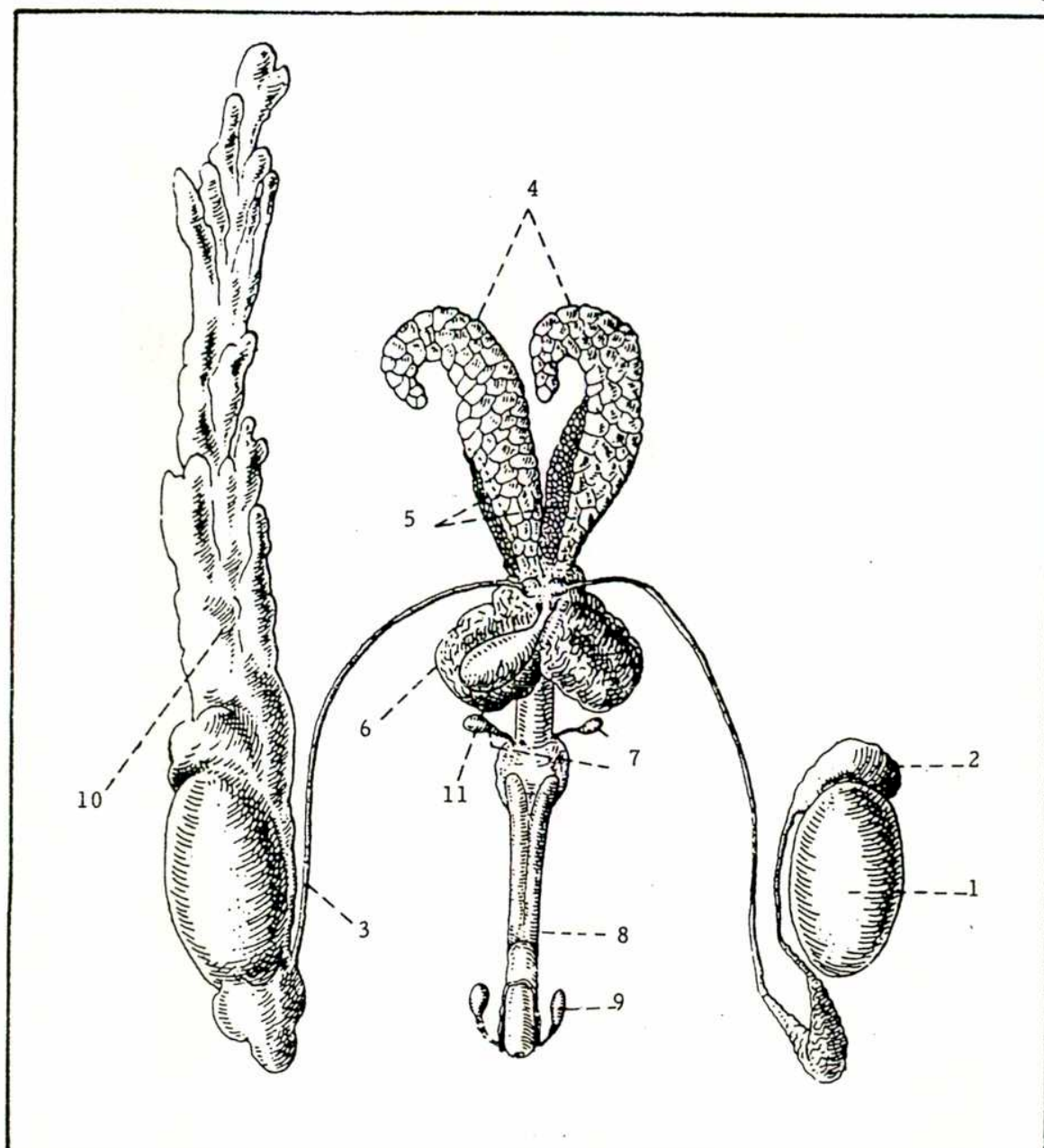
## **INTRODUCCION**

El tracto genital masculino de los mamíferos comprende un conjunto de órganos y conductos cuya principal función es la producción de espermatozoides aptos para la fecundación (fig.1). Los mismos pueden clasificarse según sus funciones en 3 grupos:

- a) los testículos, cuya función principal es la producción de espermatozoides y la síntesis de andrógenos y una serie de factores que proveen el medio adecuado para el desarrollo de la espermatogénesis.
- b) las vías eferentes, constituidas por los conductos eferentes, el epidídimo, el conducto deferente y la uretra. Este sistema está involucrado en el transporte, maduración y almacenamiento de espermatozoides.
- c) las glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, próstata, glándulas coagulantes, glándulas bulbouretrales y glándulas uretrales) cuyas secreciones constituyen la fracción principal del líquido seminal.

#### **MORFOLOGIA TESTICULAR**

El testículo de los mamíferos es un órgano ovoide que se encuentra de a pares, ubicado fuera del abdomen, en el escroto. El parénquima testicular, rodeado externamente por la cápsula testicular, está formado por dos compartimientos, uno



**Figura 1: Esquema del tracto genital masculino de la rata.**

1: testículo; 2: epidídimo; 3: conducto deferente; 4: vesículas seminales; 5: glándulas coagulantes; 6: próstata; 7: glándulas bulbouretrales; 8: pene; 9: glandula prepujal; 10: tejido adiposo; 11: vejiga.

no vascularizado compuesto por una serie de túbulos seminíferos que constituyen la unidad funcional productora de espermatozoides y un compartimiento intersticial, altamente vascularizado, que rodea los túbulos seminíferos, y contiene entre otros tipos celulares a las células de Leydig responsables de las síntesis de esteroides (fig. 2).

#### Compartimiento tubular

Los túbulos seminíferos tienen un diámetro de 200 a 250  $\mu$ m con longitudes que varían según la especie. Se ha demostrado que el testículo de rata contiene aproximadamente 30 túbulos con una longitud promedio de 12 m por cada gramo de testículo. Ambos extremos de cada túbulo se abren hacia la rete testis, una estructura que se conecta con el epidídimo a través de los conductillos eferentes.

La pared de los túbulos seminíferos esta compuesta por 4 capas. La capa más interna o membrana basal está rodeada por una capa de células mioideas probablemente responsables de los movimientos peristálticos del túbulo. La tercera capa está formada por fibras de colágeno y hacia el exterior se encuentra una capa de células endoteliales que revisten los sinusoides linfáticos del tejido intersticial. Por dentro de la membrana basal los túbulos estan revestidos por un epitelio estratificado que contiene dos tipos de células: las células

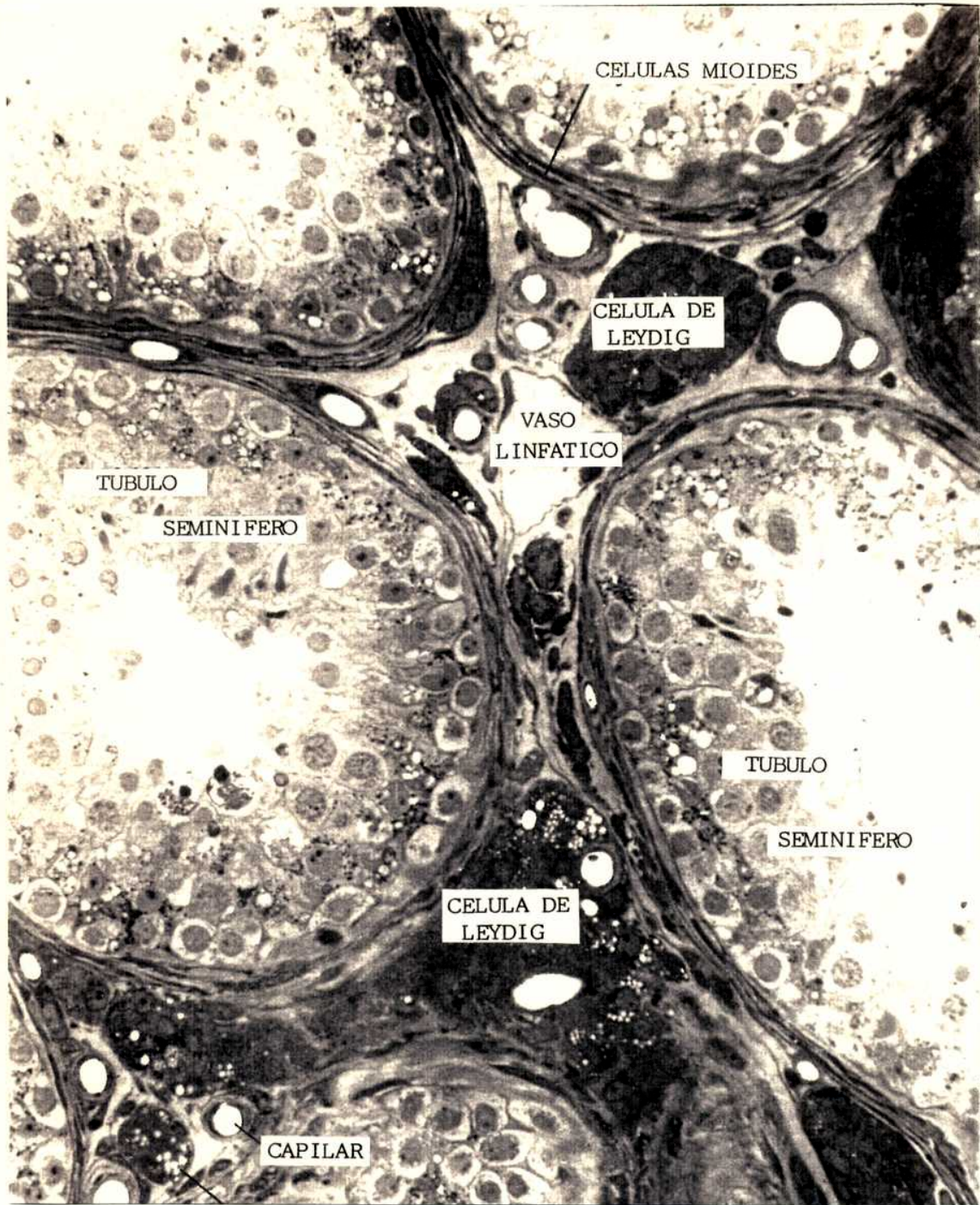
de Sertoli y las células espermatogénicas o germinales (fig. 2).

El estudio histológico de los túbulos seminíferos llevó a la descripción de la espermatogénesis como un proceso ordenado que conduce al desarrollo de espermatozoides a partir de células precursoras ubicadas en los túbulos seminíferos. El ciclo espermatogénico puede subdividirse en un número fijo de estadios (14 en la rata), cada uno de los cuales se caracteriza por una organización única de las células germinales en diferentes estadios de su desarrollo (Leblond y Clermont, 1952). En la mayoría de las especies, estas etapas se encuentran en una secuencia ordenada a lo largo del túbulo seminífero formando una onda espermatogénica. Sin embargo, esta situación no es estática, ya que un dado estadio progresa con el tiempo hacia el siguiente a medida que el complejo de células germinales madura. De esta manera, la distribución de estadios a lo largo del túbulo cambia constantemente (fig. 3).

La duración del ciclo espermatogénico es fija, siendo de 12.8 días en la rata. A su vez cada estadio tiene una duración característica y constante que puede variar desde 6 horas en el estadio III hasta tanto como 62.8 horas en el estadio VII (Clermont y col, 1959).

Una vez clasificados los distintos tipos de células germinales, se observó que las células menos maduras, las espermatogonias, se dividen para formar los espermatoцитos





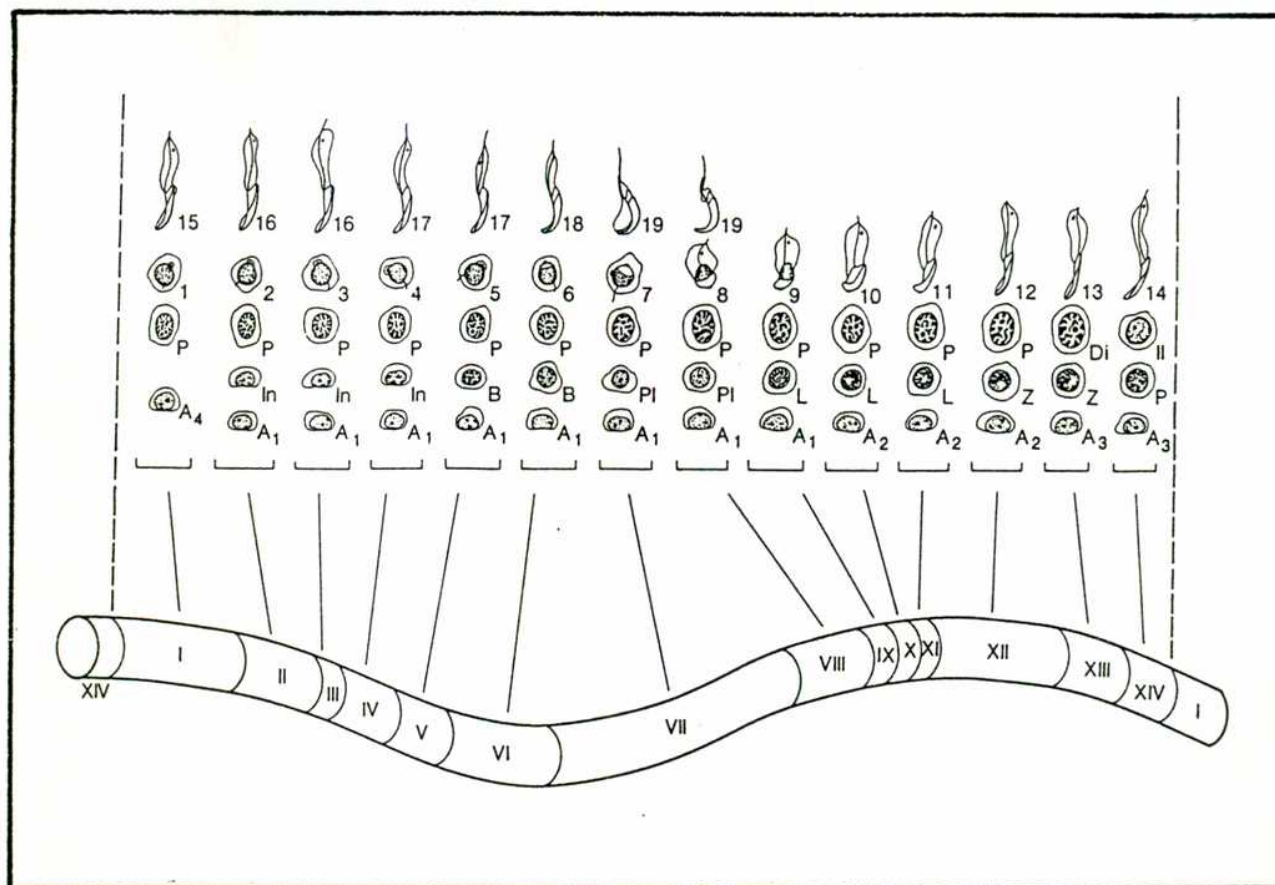
**Figura 2: Microfotografía de un corte de testículo humano.**

Se observan los túbulos seminíferos y el tejido intersticial. Aumento: 240 x.

primarios los que por un proceso de división reduccional dan origen a células haploides llamadas espermatídes. Las espermatídes sufren una compleja metamorfosis (espermiogénesis) que lleva a la formación de los espermatozoides altamente diferenciados.

Las células de Sertoli se extienden desde la membrana basal hacia el lumen tubular emitiendo proyecciones que rodean a las células germinales. Presentan un núcleo irregular próximo a la membrana basal y el citoplasma es pobre en retículo endoplasmático pero contiene numerosas mitocondrias, lisosomas y vacuolas. Las células de Sertoli se describieron originalmente como "células nodrizas" debido a que se observó que las mismas envuelven a las células germinales casi en su totalidad (Sertoli, 1965). Más tarde se comprobó que las células de Sertoli proveen lactato y piruvato, nutrientes necesarios para el metabolismo energético de las células germinales, por lo que son esenciales para el mantenimiento de la espermatogénesis (Fawcett, 1975). Por otro lado, presentan actividad fagocítica que permite la degradación de los cuerpos citoplasmáticos residuales que se desprenden de las espermatídes (Clegg y col, 1965). Es importante también destacar la alta actividad secretoria de estas células que producen y secretan proteínas tales como la proteína ligadora de andrógenos (ABP), ceruloplasmina, transferrina testicular y una proteína sulfatada. Otros factores producidos por las células





**Figura 3: El ciclo espermatogénico.**

Representación esquemática del ciclo espermatogénico en la rata que ilustra la particular asociación de los distintos tipos de células germinales en el epitelio seminífero en cada estadio del ciclo y la distribución secuencial de los estadios a lo largo de un segmento de túbulo seminífero. (A1, A2, A3 y A4 = espermatogonia tipo A; estadios del espermatocito primario: PL= preleptoteno, L= leptoteno, Z= zigoteno, P= paquiteno, Di= diploteno; II= espermatocito secundario, 1= espermátide redonda, 2-9= distintos estadios de espermátide)

de Sertoli son la inhibina, un polipéptido mitogénico y un factor inhibidor de la meiosis (Bardin y col, 1988).

En la región basal hay uniones estrechas entre células de Sertoli adyacentes, las que junto con la membrana basal y la capa de células mioides constituyen la llamada barrera hematotesticular. Dicha barrera restringe el pasaje de sustancias del sector intersticial al interior tubular y viceversa (Dym y Fawcett, 1970). De esta manera el ultrafiltrado del líquido intersticial y los productos de secreción de la célula de Sertoli determinan el ambiente en el cual se van a diferenciar los espermatozoides a partir de las células germinales.

### Tejido intersticial

El compartimiento intersticial está compuesto por una malla irregular de tejido conectivo laxo que llena los espacios entre los túbulos seminíferos y contiene a los vasos sanguíneos y linfáticos y los nervios del testículo.

Sin duda el componente celular más importante de este compartimiento es la célula de Leydig, responsable de la producción de los andrógenos, esenciales para el mantenimiento de la espermatogénesis y el trofismo de todo el tracto reproductivo y de los caracteres sexuales secundarios.

Las células de Leydig se encuentran generalmente agrupa-

das en cúmulos asociados a los vasos sanguíneos o bien cercanos a la pared de los túbulos seminíferos. La estructura de la célula de Leydig muestra características comunes a todos los vertebrados, con algunas diferencias entre especies (Christensen, 1975). Es una célula poligonal, con un diámetro de 15 - 20  $\mu\text{m}$ . Presenta un núcleo grande, esférico u ovoide y abundante citoplasma acidófilo que contiene gotas lipídicas, principalmente compuestas por ésteres de colesterol, microtúbulos y microfilamentos. La célula de Leydig posee un número moderado de mitocondrias y el complejo de Golgi está bien desarrollado y comunmente ubicado en un polo del núcleo. La organela citoplasmática más abundante es el retículo endoplasmático liso, característico de células esteroideogénicas y secretoras (fig. 4).

Hasta hace unos años la síntesis de andrógenos era considerada como la única función de la célula de Leydig. Sin embargo, actualmente se sabe que la célula de Leydig sintetiza otras sustancias bioactivas principalmente involucradas en la regulación parácrina y autócrina de la función testicular. Las células de Leydig proveen varias hormonas y factores potencialmente activos: oxitocina (Guldnaar y Pickering, 1985) péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina (POMC) tales como hormona melanocito estimulante (MSH) y  $\beta$ -endorfina (Bardin y col, 1984), prostaglandinas (Abayaskeara y col, 1988), leucotrienos (Sullivan y Cooke, 1985), activina (Lee y

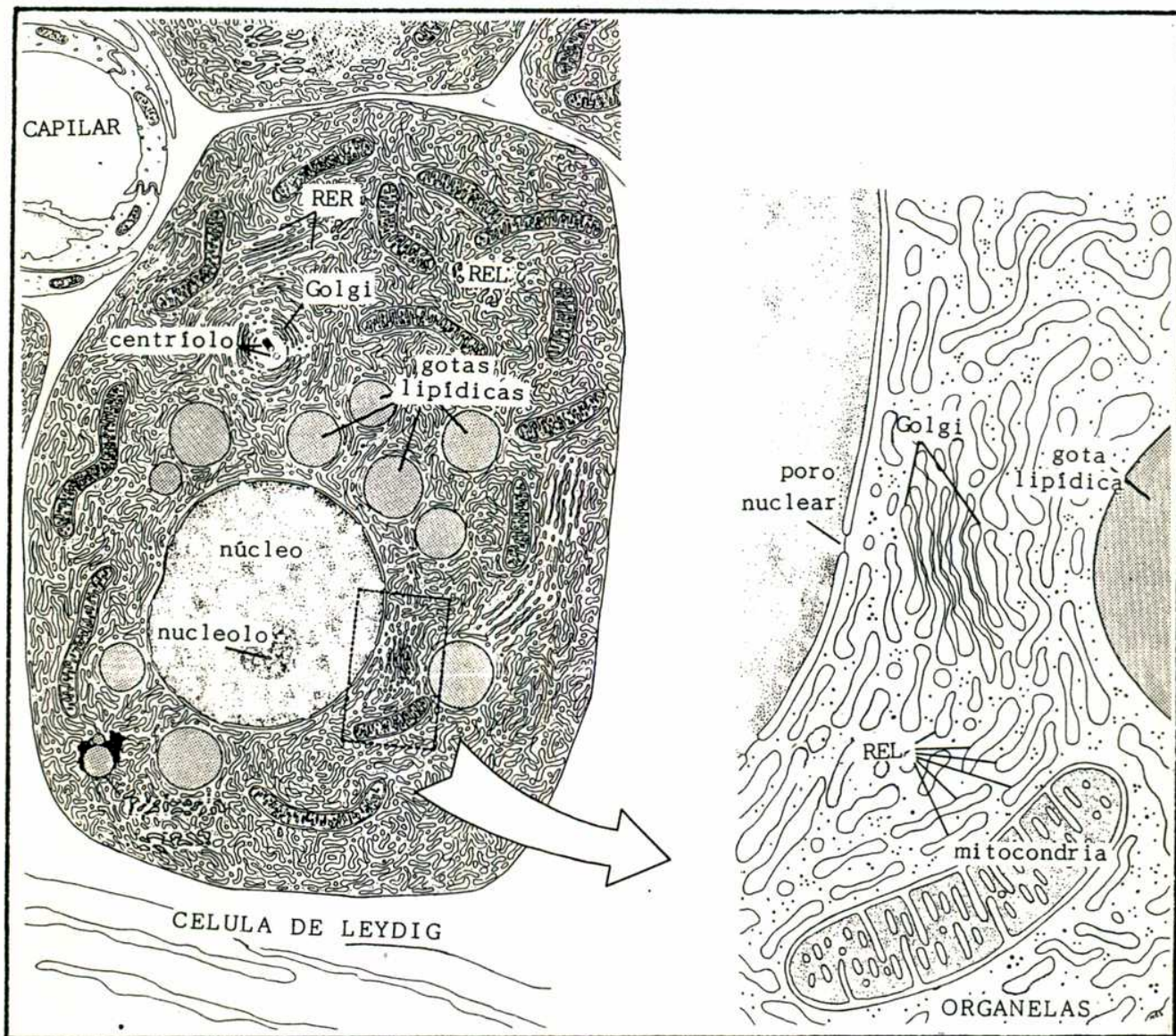
col, 1988), renina/angiotensina (Parmetier, 1983; Sharpe, 1984) y factor liberador de corticotrofina (CRF) (Thompson y col, 1987).

En el espacio intersticial también se encuentran fibroblastos, macrófagos (Niemi y col, 1986), linfocitos (Ritchie y col, 1984; Pöllänen y Maddocks, 1988) y en algunas especies mastocitos (Nistal, M. y col, 1984).

### Líquido intersticial

Los túbulos seminíferos y las células del tejido intersticial se hallan rodeados por el líquido intersticial. Todas las hormonas y los nutrientes que llegan al testículo por la circulación deben pasar de los capilares hacia el líquido intersticial para llegar luego hasta sus células efectoras. Este fluido contiene además hormonas y factores localmente producidos y es el medio a través del cual se comunican bidireccionalmente los túbulos, las células de Leydig y otras células del intersticio (Fawcett y col, 1973; Clark, 1976). Se ha observado un importante aumento en el volumen del líquido intersticial luego de la inyección de hCG (Sharpe, 1979, 1980, 1981) o LHRH (Sharpe y col, 1983), debido a un aumento en la permeabilidad de los capilares testiculares (Setchell y Sharpe, 1981). El mismo fenómeno se observó también cuando el testículo es sometido a condiciones que





**Figura 4:** Esquema de la célula de Leydig.

RER: retículo endoplasmático rugoso; REL: retículo endoplasmático liso.

afectan la función espermatogénica tales como la criptorquidia (Damber y col, 1985; Sharpe, 1983), la irradiación (Wang y col, 1983) o altas temperaturas locales (Galil, 1982).

La composición hormonal de este fluido constituye el indicador más exacto de los niveles hormonales que rodean a las células de Leydig y a los túbulos seminíferos, mientras que el volumen del mismo refleja cambios en la permeabilidad capilar (Sharpe y Cooper, 1983).

Utilizando un sistema de canulación para la recolección de líquido intersticial, Maddocks y Setchell (1988) determinaron que las concentraciones de sodio, potasio y proteínas totales en el interior del testículo son similares a las plasmáticas y el nivel de testosterona en este fluido es similar al determinado en sangre de la vena testicular.

## EL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO. LA INERVACION DEL TRACTO

### GENITAL MASCULINO

#### El sistema nervioso autónomo

El sistema nervioso autónomo ha sido tradicionalmente descrito como un sistema motor que controla las funciones viscerales. Sin embargo, este sistema no es exclusivamente eferente, ya que la mayoría de los nervios viscerales tienen también fibras sensoriales (aferentes) entremezcladas con las



fibras motoras, que llevan información desde los receptores localizados en los terminales periféricos hacia el sistema nervioso central (SNC) (Loewy, 1990).

El sistema nervioso autónomo está compuesto por dos divisiones principales: el sistema nervioso simpático y el parasimpático. Actualmente se incluye como una tercera división al sistema nervioso entérico constituido por un complejo conjunto de neuronas presentes en la pared del intestino que regulan las secreciones y la motilidad gastrointestinal.

La porción motora de los sistemas simpático y parasimpático está formada por dos conjuntos de neuronas conectadas en serie. Las neuronas preganglionares, cuyos cuerpos neuronales se encuentran en el SNC, envían sus axones a ganglios específicos del sistema nervioso periférico y hacen sinápsis con neuronas postganglionares las que a su vez inervan sus tejidos efectores.

Los ganglios parasimpáticos se localizan cerca o dentro de la pared del órgano que inervan y consecuentemente los axones de estas neuronas postganglionares son más cortos que los correspondientes a neuronas postganglionares simpáticas. Todas las fibras preganglionares utilizan como neurotransmisor a la acetilcolina (ACh), mientras que el neurotransmisor de las fibras postganglionares varía. La mayoría de las fibras simpáticas postganglionares son adrenérgicas, es decir que el

neurotransmisor es la norepinefrina (NE), y la totalidad de las neuronas parasimpáticas postganglionares utilizan Ach.

Las fibras preganglionares parasimpáticas se originan en medula espinal y salen a través de los nervios craneales o las raíces sacras ventrales. Las fibras motoras simpáticas se originan a nivel cervical, torácico y lumbar superior de la médula espinal. Los axones de estas fibras preganglionares salen a través de las raíces ventrales, del mismo segmento de la médula en que se encuentran sus cuerpos neuronales, hacia la cadena paravertebral de gánglios simpáticos. Algunos axones pasan por la cadena simpática sin hacer sinapsis y forman los nervios espláncnicos que se proyectan hacia los ganglios prevertebrales.

Aunque Ach y NE son los "clásicos" neurotransmisores del sistema nervioso autónomo, recientemente se han identificado un número importante de péptidos a los que se les atribuye una función de neuromodulador o neurotransmisor. Mediante estudios histoquímicos se ha demostrado que algunas neuronas postganglionares simpáticas contienen péptidos inmunoreactivos que coexisten en la misma neurona productora de NE (Hökfelt y col, 1977; Schulzberg y Lindh, 1988).

También se han identificado fibras serotoninérgicas en el sistema nervioso periférico de los mamíferos, especialmente en el intestino (Gershon y col, 1977; Furness y Costa, 1978).

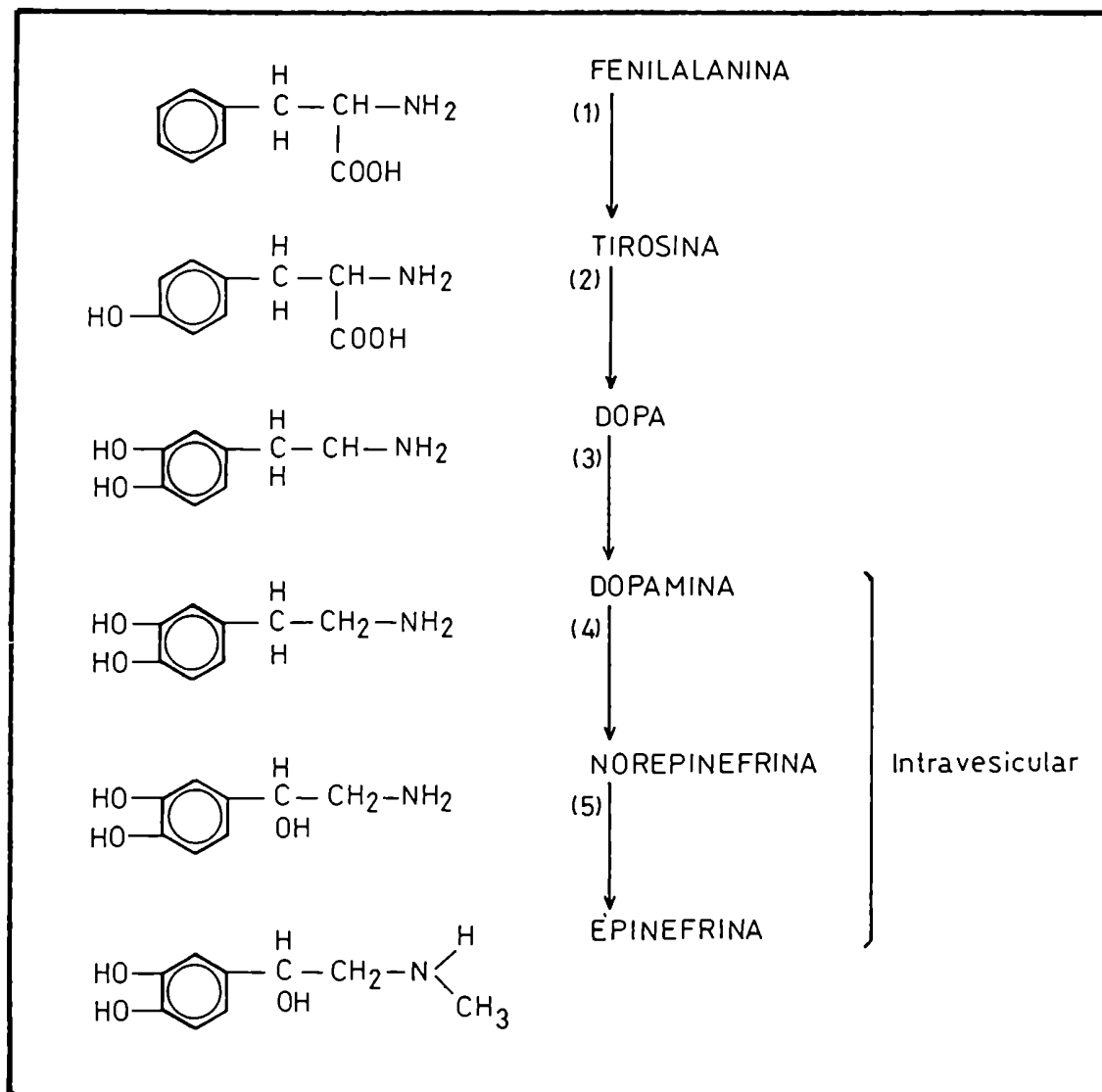
### Catecolaminas

Tanto en el sistema nervioso autónomo como en el SNC existen vías neuronales adrenérgicas que emplean como neurotransmisores a las catecolaminas. La Figura 5 muestra la biosíntesis de catecolaminas a partir de tirosina. En tejido nervioso, la síntesis de las enzimas ocurre en el cuerpo neuronal y estas migran hasta los terminales neurales por un proceso de transporte axoplasmático (Ochs y Worth, 1978).

La tirosina es hidroxilada por la tirosina hidroxilasa para formar dihidroxifenilalanina (DOPA) (Mayer 1980). Esta enzima es específica para L-tirosina y cataliza el paso limitante tanto en la síntesis central como periférica de NE (Costa y Neff 1970; Mayer 1980). La descarboxilación de L-DOPA es catalizada por la descarboxilasa de L-aminoácidos con poca especificidad de sustrato (Mayer, 1980). Por último, la dopamina se convierte en NE dentro de las vesículas por acción de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa. Una vez sintetizada la NE se almacena en vesículas sinápticas donde forma un complejo estable con ATP y proteínas específicas.

En la médula suprarrenal, a diferencia de las terminales noradrenérgicas postganglionares, la NE se metila a epinefrina (E) por acción de la feniletanolamina N-metiltransferasa (fig.5).

Las catecolaminas ejercen sus efectos biológicos a través



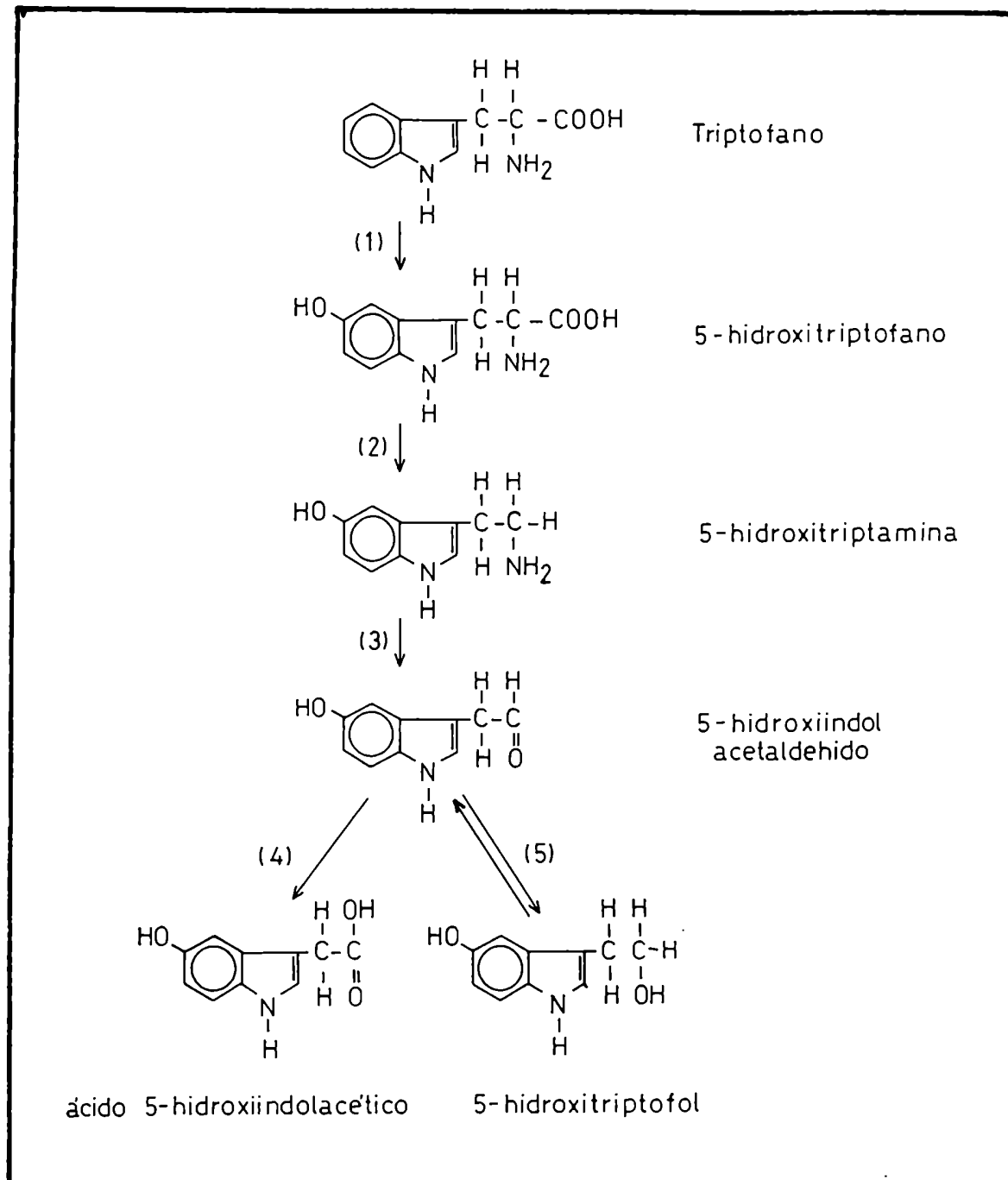
**Figura 5: Pasos enzimáticos de la biosíntesis de catecolaminas.**

(1): fenilalanina hidroxilasa; (2): tirosina hidroxilasa; (3): descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos; (4): dopamina β hidroxilasa; (5): feniletanolamina N-metiltransferasa.

de la interacción con receptores específicos de membrana. Ahlquist (1948) analizó los efectos de NE, E y diferentes agonistas en distintos efectores, encontrando que el orden de potencia de estos compuestos dependía del tejido estudiado. Estas observaciones dieron origen a la clasificación de receptores adrenérgicos en dos grupos: alfa y beta. Los receptores tipo  $\beta$  se caracterizan por el siguiente orden de potencia de agentes adrenérgicos: isoproterenol > E > NE > fenilefrina y por ser susceptibles al bloqueo específico por bajas concentraciones de propranolol. Los receptores alfa pueden definirse como aquellos que median una respuesta en la cual los agonistas adrenérgicos muestran el siguiente orden de potencia: E  $\geq$  NE > fenilefrina > isoproterenol y son específicamente bloqueadas por bajas concentraciones de fentolamina o fenoxibenzamida.

### Serotonina

La serotonina (5-HT) se sintetiza en dos etapas a partir del aminoácido triptofano (fig. 6). En las células que sintetizan 5-HT el triptofano se hidroxila para dar 5-hidroxitriptofano (5-HTP) por acción de la triptofano hidroxilasa, enzima que presenta un absoluto requerimiento de oxígeno molecular, pteridina reducida y de Fe<sup>++</sup> (Hamon y col, 1981). La segunda etapa consiste en la descarboxilación del 5-HTP



**Figura 6 : Biosíntesis y catabolismo de 5-HT.**

(1): triptofano hidroxilasa, (2): descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, (3): monoaminoxidasa, (4): aldehído dehidrogenasa, (5): aldehído reductasa.

catalizada por una descarboxilasa no específica de L-aminoácidos aromáticos que utiliza como cofactor al fosfato de piridoxal e interviene también en la síntesis de catecolaminas. La 5-HT así sintetizada se almacena en vesículas secretoras en forma de complejos no difusibles con ATP.

El catabolismo de esta monoamina ocurre a nivel mitocondrial a través de dos pasos enzimáticos: la 5-HT sufre primero desaminación oxidativa por acción de la monoamino-oxidasa (MAO) para formar 5-hidroxiindolacetaldehído el cual es rápidamente degradado por la aldehído dehidrogenasa a ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), principal metabolito de la 5-HT, y en menor proporción también se forma 5-hidroxitriptofol por acción de la aldehído reductasa (fig. 6).

Aproximadamente el 90% de la 5-HT presente en el organismo de los mamíferos se aloja en el tracto gastrointestinal principalmente en las células enterocromafines. La 5-HT también se encuentra en las plaquetas y en el SNC donde actúa como neurotransmisor inhibitorio. En los roedores y vacunos se encuentra 5-HT almacenada en los mastocitos y como se mencionara anteriormente también se han identificado fibras serotoninérgicas periféricas.

Se han descrito tres tipos de receptores serotoninérgicos: 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>3</sub>. En los últimos quince años, el desarrollo de nuevas drogas agonistas o antagonistas serotoninérgicos, más específicas y selectivas, ha permitido la

	AGONISTAS	ANTAGONISTAS
5-HT <sub>1</sub>	8-OH-DPAT (1A) 5-carboxamidotrip- tamina (1A, 1B, 1D) (+)-S- -metil-5-HT (1C)	spiperona (1A) 21-009 (1B) metiotepin mesulergina mianserina (1C)
5-HT <sub>2</sub>	(+)-S- $\alpha$ -metil-5-HT 4-bromo-2,5-dimetoxi- fenilisopropilamina	ketanserina metiotepin mesulergina spiperona
5-HT <sub>3</sub>	2- metil serotonina	ICS 205-930 (-) cocaína MDL 72222 (3A, 3B)

**Tabla 1: Clasificación de receptores serotoninérgicos**

Entre paréntesis se indica el subtipo de receptor por el cual la droga presenta mayor afinidad.



descripción de diferentes subtipos dentro de los receptores tipo 1 y 3, los cuales se encuentran tanto en el sistema nervioso central como periférico (Humphrey, 1984; Leysen, 1984; Richardson y Engel, 1986, Martin, 1990).

La Tabla 1 muestra una serie agonistas y antagonistas serotoninérgicos que, por su diferente afinidad por cada tipo o subtipo de receptor, permiten la clasificación de los mismos.

#### Inervación del tracto genital masculino

El testículo, epidídimo y glándulas sexuales accesorias reciben inervación simpática y parasimpática del sistema nervioso autónomo, y poseen también un sistema sensorial aferente. La inervación visceral eferente de estos órganos deriva de los plexos nerviosos prevertebrales que rodean a las arterias. En la rata, existen cinco plexos prevertebrales principales, los cuales se hallan interconectados. Estos son: el plexo celíaco (o solar), intermesentérico (o aórtico), mesentérico inferior, hipogástrico y plexo pélvico (fig. 7). El plexo celíaco recibe el aporte adrenérgico de los nervios espláncnicos tóraco y lumbar, mientras que los demás plexos reciben solamente nervios espláncnicos lumbares. El plexo celíaco recibe el aporte parasimpático del nervio vago. El plexo intermesentérico se encuentra ventral y ventrolateral a

la aorta y conecta al plexo celíaco con los plexos más caudales. El plexo mesentérico inferior rodea a la arteria homónima y contiene uno o más ganglios.

En el humano una red de nervios localizada después de la bifurcación de la aorta constituye el plexo hipogástrico, en cambio en la rata y otras especies se observa un único nervio simpático, el nervio hipogástrico, que comunica el plexo mesentérico inferior con el plexo pélvico. El componente parasimpático del plexo pélvico proviene de los 3 nervios pélvicos que se originan en los nervios sacros (fig.7).

En la mayoría de las especies, el plexo pélvico presenta varios ganglios dispersos que presentan múltiples interconexiones. En la rata en cambio, hay un ganglio principal, el ganglio pélvico mayor o hipogástrico, ubicado en el ligamento lateral de la vejiga al costado de la próstata. El plexo incluye varios ganglios accesorios menores. El ganglio mayor en ratas macho mide aproximadamente 4 x 2 mm y provee inervación al recto, uretra, pene, lóbulo dorsal de la próstata, vejiga y conducto deferente.

Existen también fibras sensoriales aferentes en todas las vías nerviosas descritas en los párrafos precedentes. Estas fibras viajan por el nervio pélvico, entrando a la médula a través de los nervios sacros, o bien por el nervio hipogástrico y otros plexos más proximales. Luego a través los nervios espláncnicos y los ganglios de la cadena simpática

entran a la médula espinal a través de las raíces dorsales de los nervios espinales.

Se ha observado que el control intrínseco de un número de funciones del tracto genital masculino no puede atribuirse a la inervación adrenérgica o colinérgica. La descripción de neuropéptidos en tejidos del tracto urogenital sugiere que dichas sustancias podrían estar involucradas en la regulación de la función reproductiva. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se han descrito numerosos péptidos en el tracto genital masculino los cuales habían sido originalmente aislados de cerebro o intestino (Tabla 2).

La presencia de péptidos y su significado funcional en órganos sexuales tanto masculinos como femeninos está actualmente en pleno estudio, así como también las implicancias fisiológicas de una probable inervación peptidérgica.

### Inervación testicular

La inervación del testículo ha sido estudiada tanto en humanos como en diferentes animales de experimentación. En el humano los nervios espermáticos se presentan en tres grupos: uno superior, uno intermedio y otro inferior. Los nervios espermáticos superiores provienen de los nervios intermesentéricos y del plexo renal, descienden a lo largo de la arteria testicular y terminan en el testículo. El nervio espermático

<b>Péptido</b>	<b>Localización</b>	<b>Referencia</b>
<b>VIP</b>	Parénquima testicular Pene  Tejido intersticial y  músculo liso de próstata vesícula seminal, vas deferens y epidídimo	Hakanson y col, 1982. Polak y col, 1981. Dail y col, 1983. Steers y col, 1984. Larsen y col, 1977, 1981. Gu y col, 1983. Greenberg y col, 1985.
<b>SP</b>	Pene vesícula seminal y epidídimo	Anderson y col, 1983. Gu y col, 1983. Greenberg y col, 1985.
<b>NPY</b>	Músculo liso de vas defe- rens, epidídimo y vesícula seminal.	Polak y Bloom, 1984. Lundberg y col, 1983.
<b>GRP</b>	Músculo liso del vas defe- rens y vesícula seminal	Stjernquist y col, 1983.
<b>leu-E, met-E</b>	Próstata, vas deferens y epidídimo. Vesícula seminal	Alm y col, 1981  Vaalash y col, 1980.
<b><math>\beta</math>-end.</b>	Células de Leydig, epidí- dimo, vesícula seminal y vas deferens.	Sharp y col, 1980.

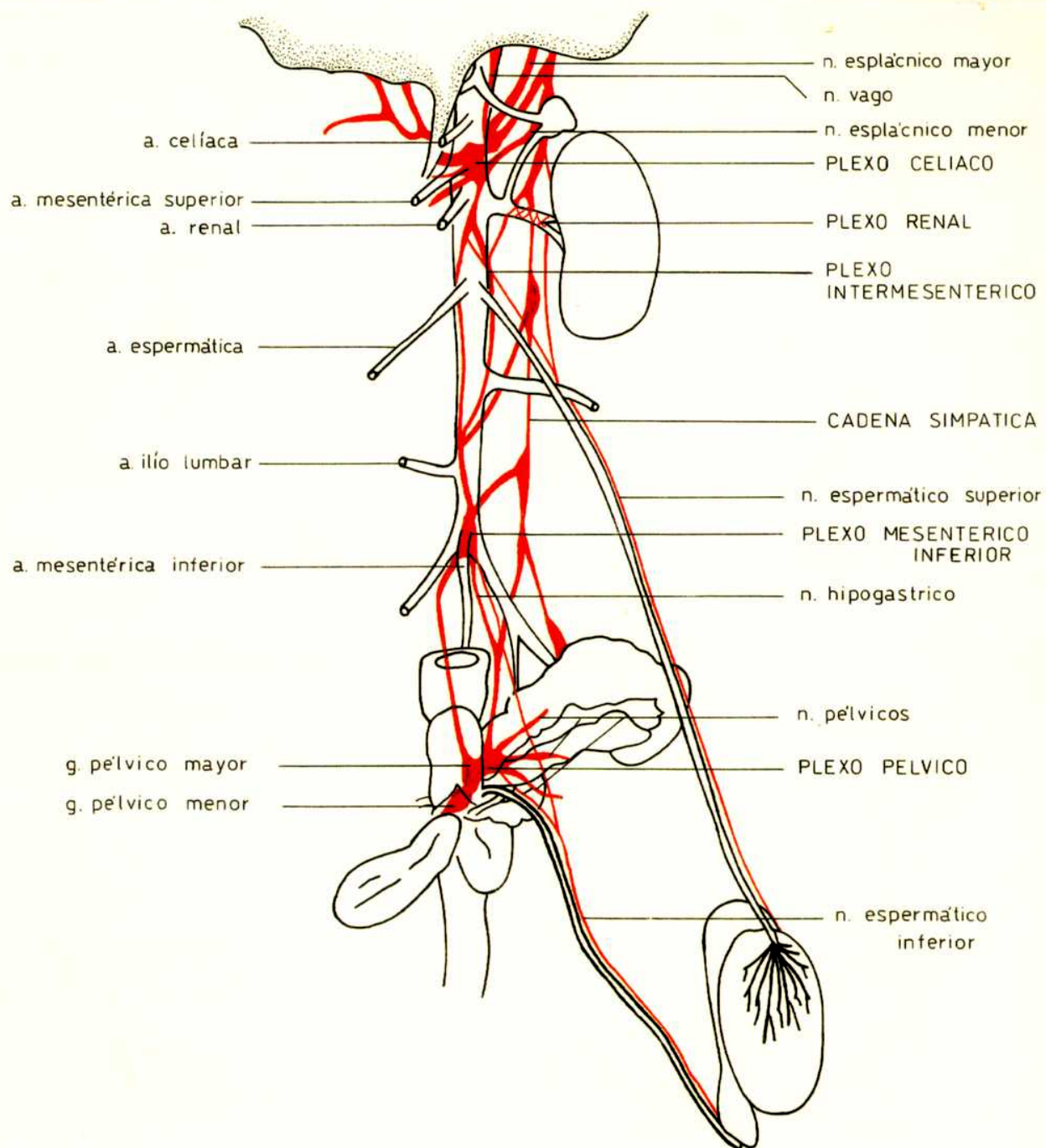
**Tabla 2:** Presencia de neuropéptidos en el tracto genital masculino.

VIP: péptido intestinal vasoactivo, SP: sustancia P, NPY: neuropéptido Y, GRP: péptido liberador de gastrina, Leu-E: leucina-encefalina, met-E: metionina-encefalina,  $\beta$ -end:  $\beta$ -endorfina.

intermedio se origina en la porción superior del plexo hipogástrico y se extiende hasta el canal inguinal interno, por donde entra al cordón espermático. Las ramas terminales de este nervio inervan el epidídimo y la porción proximal del vas deferens. El nervio espermático inferior se origina principalmente en el plexo pélvico, y en menor grado en el plexo mesentérico inferior e inerva el vas deferens, el epidídimo y también provee fibras al testículo.

La Figura 7 muestra esquemáticamente la localización y el origen de los nervios espermáticos en la rata macho. A diferencia del humano, en la rata no se encuentra el nervio espermático intermedio.

Mediante la localización de las fibras que degeneran a causa de la sección específica de cada nervio, se ha podido trazar el recorrido de las distintas vías que llegan al testículo, epidídimo y vas deferens de la rata. En 1946, mediante técnicas argentícas, Kuntz y Morris observaron que la interrupción de la vía espermática superior provoca la degeneración de gran parte de las fibras nerviosas asociadas a las arterias y venas testiculares mientras que la inervación del vas deferens y su arteria permanece intacta. Indudablemente, aquellas fibras perivasculares del testículo que no degeneraron provienen del nervio espermático inferior. Los nervios del epidídimo aparecen intactos después de dicha desnervación pero no se observan fibras remanentes en el



**Figura 7: Inervación del testículo de rata.**

El esquema muestra la disposición anatómica de la cadena simpática, los plexos prevertebrales de la rata y los nervios espermáticos que inervan el testículo. a:arteria; n: nervio.

interior del testículo.

La extirpación del plexo mesentérico inferior interrumpe la inervación del plexo pélvico excepto aquellos componentes que se originan directamente del plexo aórtico. Esta operación resulta en la degeneración de las fibras del nervio espermático inferior y permite confirmar que esta vía inferior inerva principalmente al epidídimo, el vas deferens y sus arterias, y provee algunas fibras al testículo.

En la cápsula testicular se encuentran abundantes fibras nerviosas principalmente en la túnica albugínea y vasculosa. Mediante técnicas de histofluorescencia Bell y Mc Lean (1973) describieron la existencia de un denso plexo de finas fibras catecolaminérgicas en la cápsula testicular y una densa inervación de los vasos sanguíneos en la región de la rete testis. Los estudios de tinción de acetilcolinesterasa revelaron la presencia de un moderado número de fibras colinérgicas distribuidas uniformemente en la cápsula testicular. Dichas fibras no se encontraron asociadas al recorrido de los vasos sanguíneos (Bell y McLean, 1973).

El estudio histológico de cortes de testículos normales ha demostrado la presencia de finos nervios en el mediastino testicular y entre el tejido conectivo intertubular. Estas fibras se encuentran próximas a los vasos sanguíneos, y se ha sugerido que están relacionadas al control de la irrigación testicular. No se observaron fibras que penetren la membrana

de los túbulos seminíferos ni tampoco nervios que terminen próximos a las células intersticiales. Recientemente se ha descrito en ratas (Koji y col, 1986) y en humanos (Yamamoto y col, 1987) la presencia de nervios adrenérgicos cercanos a las células mioideas que rodean a los túbulos seminíferos, los cuales regularían la contractilidad tubular y el transporte de espermatozoides hacia los conductos eferentes y epidídimo.

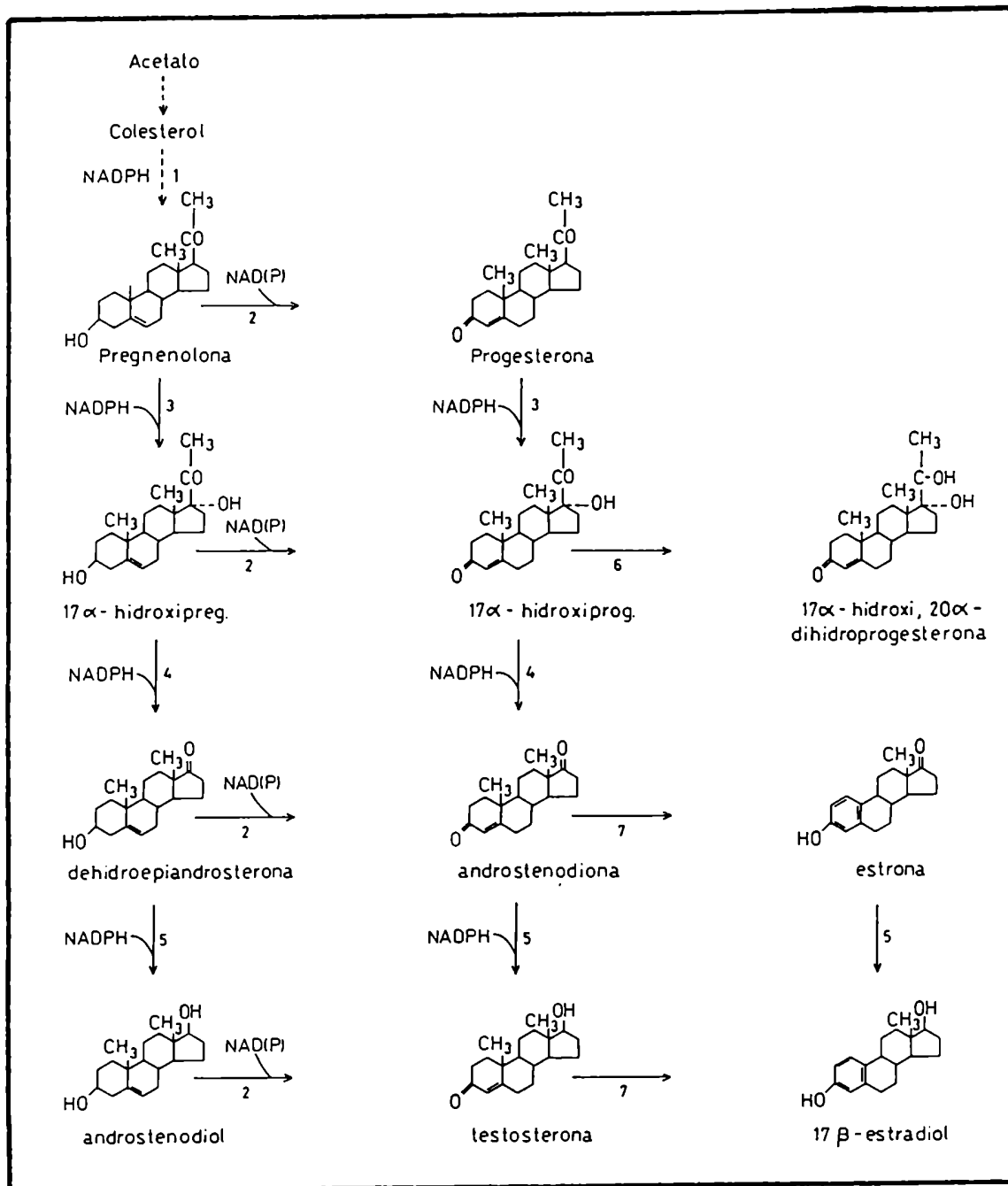
### FUNCION ENDOCRINA DEL TESTICULO

#### Biosíntesis testicular de andrógenos

La síntesis de andrógenos en las células de Leydig comienza con la movilización de ésteres de colesterol de las gotas lipídicas citoplasmáticas (Hall, 1963). En la rata un 60 % del colesterol es producido localmente por las células de Leydig y el resto es aportado por las lipoproteínas plasmáticas (Freedman y Ascoli, 1983; Chen y col, 1980). El testículo posee una hidrolasa de ésteres de colesterol, sensible al estímulo gonadotrófico (Albert y col, 1980) que, tal como ocurre en la adrenal, interviene en la movilización del colesterol (Naghshineh y col, 1978).

El camino biosintético, esquematizado en la Figura 8, comienza con la conversión de colesterol a pregnenolona catalizada por un complejo multienzimático, dependiente de





**Figura 8: Bisíntesis de esteroides testiculares.**

1: complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol; 2: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 3: 17α-hidroxilasa; 4: 17,20-liasa; 5: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 6: 20α-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 7: complejo de la aromatasa.

citocromo P-450, que rompe la cadena lateral del colesterol (SCC), ubicado en la membrana interna mitocondrial (Shikita y Hall, 1973).

La pregnenolona formada pasa al compartimiento microsomal, donde es sustrato de un complejo enzimático de membrana (17-20 liasa) semejante al SCC (Nakajim y Hall, 1981) que convierte los esteroides de 21 átomos de carbono en andrógenos de 19 carbonos. Esta conversión ocurre en dos pasos, primero una  $17\alpha$ -hidroxilación seguida por la ruptura de la unión C 17-20 para dar androstendiona o dehidroepiandrosterona según se trate del camino  $\Delta 4$  o  $\Delta 5$  (Sweet y col, 1985).

Estos dos sistemas enzimáticos comparten el mismo mecanismo para lograr el clivaje de los enlaces C-C pero difieren en su localización y en el número de pasos requeridos. El sistema 17-20 liasa requiere de solo dos pasos ya que el sustrato ya está oxigenado en la posición 20 mientras que el sistema SCC requiere de dos hidroxilaciones contiguas para luego escindir la cadena lateral.

En el siguiente paso, la enzima microsomal 17- $\beta$  hidroxioesteroide deshidrogenasa cataliza la interconversión de androstenediona al andrógeno más importante, testosterona. Esta enzima es activada por producto (Oshima y Ochi, 1973), reversible y posee dos sitios activos (Samuels y col, 1975).

En el compartimiento microsomal también se encuentra el sistema enzimático 3- $\beta$  - hidroxioesteroide deshidrogenasa-

isomerasa ( $3\beta$ -HSD) que convierte los anillos A y B de la pregnenolona a una estructura  $\Delta^4$ -3 ceto: la progesterona. Otro posible sustrato de este complejo enzimático es la dehidroepiandrosterona que pasa a androstenediona. Luego, la conversión de pregnenolona a androstenediona en la fracción microsomal puede ocurrir por dos caminos, dependiendo del orden en que actúen los sistemas  $3\beta$ -HSD y 17-20 liasa. Cuando la  $3\beta$ -HSD actúa primero sobre la pregnenolona y en segundo término el sistema 17-20 liasa convierte la progesterona en androstendiona, se habla del camino de la progesterona o camino  $\Delta_4$ ; cuando se invierte el orden de las reacciones se está en presencia del camino  $\Delta_5$ , o camino de la dehidroepiandrosterona.

La elección del camino esteroidogénico no está librada al azar. Se ha descrito que la rata usa casi exclusivamente el camino  $\Delta_4$  (Samuels, 1960) mientras que en el cerdo (Ruokonen y Vihko, 1974) conejo y perro (Hall y col, 1964) se utiliza el camino  $\Delta_5$  en distintas proporciones. Teóricamente la preferencia de un camino sobre otro puede deberse a la afinidad relativa de cada enzima por sus distintos sustratos o a la disposición de las enzimas en las membranas.

El testículo de animales inmaduros y púberes sintetiza, además de testosterona, varios metabolitos  $5\alpha$ -reducidos, siendo el  $3\alpha$ -androstenediol ( $3\alpha$ -diol) el más abundante (Podestá y Rivarola, 1974). El testículo prepuberal se

caracteriza por poseer una gran actividad de las enzimas  $5\alpha$ -reductasa y  $3\alpha$ -HSD (Van der Molen y col, 1975; Oshima y col, 1970) mientras que el  $3\beta$ - androstenediol es más abundante en testículo de ratas adultas que prepubescentes.

Los perfiles de variación de las concentraciones plasmáticas (ng/ml) y testicular (ng/testículo) de testosterona son semejantes. Se observan niveles bajos y estables desde el nacimiento hasta la 4<sup>ta</sup>. semana de vida, a partir de ese momento y hasta aproximadamente la 9<sup>na</sup>. semana se verifica un rápido e importante incremento en la concentración de testosterona. En cambio, la concentración plasmática de dihidrotestosterona,  $3\alpha$ - y  $3\beta$ -androstenediol alcanza un máximo sostenido entre la 5<sup>ta</sup>. y la 9<sup>na</sup>. semana y luego decrece marcadamente (Corpéchet y col, 1981).

#### Regulación de la síntesis de andrógenos por la hormona luteinizante

La regulación fisiológica más importante de la síntesis de andrógenos testiculares es ejercida por la adenohipófisis a través de la secreción pulsátil de hormona luteinizante (LH). El efecto de la LH sobre la célula de Leydig ha sido ampliamente utilizado como modelo para el estudio del mecanismo de acción de las hormonas proteicas sobre sus órganos efectores.

En los últimos años, se ha demostrado que la mayoría de las las células utilizan un número limitado de mecanismos moleculares que involucran a las proteínas. Cuando una célula responde a un estímulo lo hace mediante alteración de las propiedades o la velocidad de síntesis de proteínas preexistentes o iniciando la síntesis de nuevas proteínas. Los mensajeros intracelulares y los cambios que ellos producen en las proteínas intracelulares modifican las funciones de varios componentes celulares, los cuales, a su vez, proveen la respuesta al estímulo original.

En el caso particular de la célula de Leydig el mecanismo desencadenado por la unión de la LH a sus receptores específicos de membrana ha sido extensamente estudiado. El primer efecto de la LH sobre estas células consiste en la activación de la adenilato ciclasa (AC), (dependiente de GTP y Mg) ocasionando un aumento en la síntesis de  $AMP_c$  (Dufau y col. 1973), considerado el principal segundo mensajero de esta hormona. El  $AMP_c$  resultante se une a la subunidad regulatoria de una quinasa de proteína (PK) causando la liberación de una subunidad catalítica activa. Así, la PK activada cataliza la fosforilación de proteínas intracelulares que intervienen en la síntesis de esteroides (Podestá y col, 1976). Una de las proteínas afectadas por este tipo de modificación postraduccional es la hidrolasa de ésteres de colesterol cuya actividad aumenta por fosforilación. Esta hidrolasa activada libera

colesterol el cual es transportado a las mitocondrias por un mecanismo que involucra microfilamentos. Este mecanismo se detiene al degradarse el AMP<sub>c</sub> por acción de una fosfodiesterasa.

Los primeros estudios sobre la acción de la LH demostraban que la estimulación de la esteroidogénesis por esta hormona ocurría a nivel del complejo SCC (Hall, 1963; Hall y Eik Nes, 1963). Sin embargo a medida que se fueron describiendo mecanismos de transporte intracelular como fenómenos biológicos regulables, se llegó a la conclusión de que la LH es capaz de estimular el transporte de colesterol a la membrana interna mitocondrial (Hall y col, 1979).

La estimulación de la esteroidogénesis por LH en células de Leydig es reproducida por activadores de la adenilato ciclasa y por análogos del AMPc, y es además potenciada por inhibidores de la fosfodiesterasa. Estas evidencias experimentales permitieron postular al AMPc como segundo mensajero en la acción de la LH. Sin embargo, no se puede descartar la existencia de mensajeros alternativos.

Si bien la función del camino de la adenil ciclasa-quinasa de proteínas en la estimulación de la esteroidogénesis en células de Leydig está bien establecida, no puede excluirse la existencia de otras respuesta rápidas, particularmente a nivel de la membrana plasmáticas. Procesos tales como cambios en el flujo iónico transmembrana y en la distribución de calcio y

alteraciones en el metabolismo y recambio de fosfolípidos, podrían ser parte de los mecanismos desencadenados por la LH en su célula efectora.

Además de la LH, la prolactina (PRL) y probablemente la ACTH también determinan el estado funcional de la células de Leydig (Bartke, 1971; Liptrap y Raeside, 1975; Juniewicz y Johnson, 1981, 1983; Bartke y col, 1985; Calandra y col. 1982).

El compartimiento tubular se encuentra también bajo control hipofisario ya que la hormona folículo estimulante (FSH), junto con los andrógenos sintetizados en el intersticio, constituyen los principales factores regulatorios del epitelio seminífero.

### Relaciones parácrinas testiculares

Si bien la función testicular se halla básicamente regulada por la LH y la FSH, que ejercen su efecto trófico mediante la interacción con sitios receptores específicos en las células de Leydig y Sertoli respectivamente, la intensidad y duración de las respuestas a las gonadotrofinas están moduladas por complejas interacciones parácrinas y autócrinas.

Los diferentes tipos celulares del testículo se regulan mutuamente mediante factores difusibles que pasan de un compartimiento a otro. La Figura 9 intenta esquematizar los

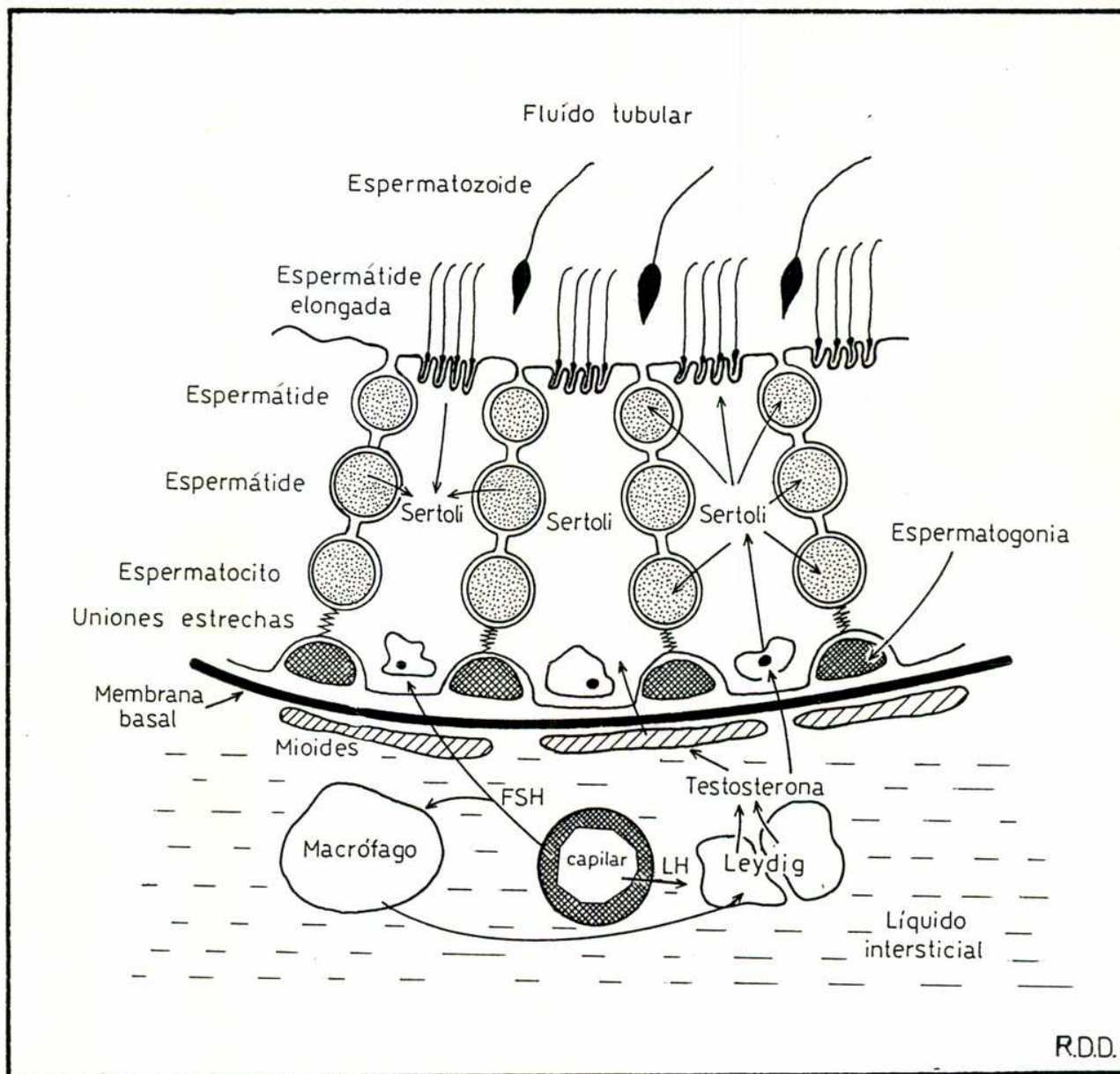
conocimientos actuales acerca de la regulación parácrina testicular.

Si bien la testosterona es el factor más importante que mantiene el normal funcionamiento tubular, los péptidos derivados de la POMC también podrían estar involucrados en esta comunicación parácrina (Dave y col, 1985). Inicialmente se pensó que los estrógenos producidos por las células de Sertoli eran el vínculo entre los túbulos y el intersticio (di Zerega y Sherins, 1981). La actividad aromatasa en Sertoli parecería estar restringida al periodo prepuberal y una vez alcanzada la maduración sexual la principal fuente de estrógenos sería la célula de Leydig (Payne y Valladares, 1980).

Las células de Leydig poseen receptores para LHRH y se han aislado péptidos testiculares producidos por las células de Sertoli similares al factor liberador. Se han descrito efectos tanto estimulatorios como inhibitorios de la LHRH y sus agonistas sobre la microcirculación testicular (Damber y col, 1985), los receptores de LH y la esteroidogénesis (Sharpe y col, 1982).

Existen evidencias de que el desarrollo normal del ciclo espermatogénico depende de la coordinación tanto temporal como espacial de las células de Leydig, las cuales adecuan su actividad endócrina a los requisitos de cada fase espermatogénica de los túbulos seminíferos más próximos o adyacentes (Aoki y Fawcett, 1978; Parvinen, 1982; Bergh, 1982, 1983;





**Figura 9: Relaciones parácrinas testiculares.**

Representación esquemática de un segmento de túbulo seminífero en estadio VII y el espacio intersticial adyacente que ilustra las interacciones parácrinas del testículo. (Ver el texto)

Sharpe y col, 1983; Parvinen y col, 1984; Syed y col, 1985). Esta divergencia funcional entre distintos grupos de células de Leydig requiere de una transferencia recíproca de información altamente localizada entre las células de Leydig y los túbulos seminíferos (Wilton y de Kretser, 1984).

Los andrógenos sintetizados en el sector intersticial son esenciales para el normal funcionamiento de las células de Sertoli y la espermatogénesis en todos los mamíferos. (Steinberger, 1971). La dependencia androgénica del ciclo espermato-génico está asociada con cambios morfológicos y funcionales de las células de Leydig peritubulares. Se observó que dichas células son más grandes cuando están próximas a una porción de túbulo en los estadios VII y VIII y muy pequeñas en los estadios IX a XII (Bergh, 1982). Dado que el tamaño de las células de Leydig está directamente relacionado con su capacidad esteroidogénica, estas observaciones indican que el estadio del ciclo espermato-génico determina, mediante la liberación de uno o más factores, la actividad de las células de Leydig. Asimismo se describió que las células de Leydig perivasculares son las más pequeñas y su tamaño no presenta variaciones cíclicas como las observadas para las células de ubicación peritubular (Bergh, 1982).

Los receptores de andrógenos testiculares se localizan en los núcleos de las células de Leydig (Hanson y col, 1976) y en las células de Sertoli (Tindall y col, 1977; Mulder y col,

1975), pero no están presentes en las células germinales (Grootegoed y col, 1977). Así, se ha propuesto que el efecto de los andrógenos sobre la espermatogénesis está mediado por su interacción con las células de Sertoli.

La normal actividad de las células de Sertoli es un requisito absoluto para la multiplicación y maduración de las células germinales, las cuales, a su vez, regulan cíclicamente el funcionamiento de las células de Sertoli de modo de obtener los requerimientos especiales de cada estadio del ciclo espermatogénico. Dicha interacción bidireccional está mediada por contactos directos célula-célula o bien por factores parácrinos difusibles. La actividad funcional de las células de Sertoli es claramente dependiente del ciclo espermatogénico. En los estadios VII y VIII se observa la máxima actividad secretoria de ABP (Ritzen y col, 1982), y activador de plasminógeno (Lacroix y col, 1981; Vihko y col, 1984). Estos estadios se caracterizan también por presentar la máxima actividad de fosfodiesterasa (Parvinen, 1982), mínima unión de  $^{125}\text{I}$ -FSH y también una disminuida producción de  $\text{AMP}_c$  en respuesta a FSH (Parvinen, 1982). Se ha descrito también la secreción cíclica de otros factores tubulares tales como: un inhibidor de fosfatasa de alto peso molecular (Boitani y col, 1981), transferrina, ceruloplasmina (Wright y col, 1981) y otros péptidos aún no identificados.

Mediante técnicas de cocultivo se ha demostrado que la célula de Sertoli estimula en las células germinales la síntesis de ADN y ARN. Aún no se conocen los factores responsables de esta estimulación, pero se han descrito varios factores que podrían mediar dicha regulación: MIS (sustancia inductora de meiosis) (Parvinen y col ,1982), polipéptidos mitogénico (Bellve, 1984), factores de crecimiento y sustancias del tipo de la somatomedina (Tres y col, 1986). Por otro lado se observó que las células germinales inhiben la síntesis de ARN y ADN en células de Sertoli (Rivarola y col, 1986).

Los macrófagos testiculares secretan un factor capaz de aumentar la producción de testosterona en células de Leydig, aún en presencia de una dosis máxima de LH. Se ha observado que los macrófagos son sensibles al estímulo de la FSH, y el agregado de esta hormona a cultivos de macrófagos testiculares potencia la secreción de dicho factor (Yee y Hutson, 1985).

## NEUROTRANSMISORES Y FUNCION TESTICULAR

### Presencia de neurotransmisores en el testículo

La descripción histoquímica de fibras nerviosas en el testículo llevó, años más tarde, a la cuantificación bioquímica de catecolaminas, así como también de otros neurotransmisores.

En el año 1968 Korman y Pentilla demostraron por técnicas espectrofluorométricas la presencia de 5-HT en testículo y epidídimo de ratas adultas. Observaron también, que luego de la administración de dosis farmacológicas de 5-HT (100 mg/kg) la misma se concentra en el sector intersticial.

Unos años más tarde, Zieher y col (1971) estudiaron la presencia de diversas aminas biógenas (5-HT, DA, NE e histamina) en el testículo de rata de distintas edades y analizaron su localización histoquímica mediante técnicas de fluorescencia inducida por formaldehído. Describieron altas concentraciones de todas las aminas en ratas neonatas, las cuales disminuyen rápidamente con el crecimiento. Describieron además la presencia de fluorescencia específica en las células intersticiales y en la pared de los túbulos seminíferos, atribuyéndola a la presencia de 5-HT y DA respectivamente. La fluorescencia observada en animales neonatos disminuía en ani-

males púberes y adultos, lo cual les llevó a sugerir una posible relación entre la concentración de aminas biógenas y el estado de maduración gonadal. Sin embargo, otro grupo de investigadores, intentando confirmar y profundizar este tema obtuvo resultados notablemente diferentes. Lombard-des Gouttes y col. (1974) describieron concentraciones menores de aminas testiculares y no encontraron variaciones de las mismas en los primeros 14 días de vida del animal. Probablemente las altas concentraciones descritas previamente en animales neonatos pueda atribuirse a la contaminación con mastocitos presentes en el tejido adyacente al testículo, durante la disección de la gonada. Los estudios histoquímicos realizados por Lombard-des Gouttes y col. (1974) indican que la fluorescencia observada en las paredes de los túbulos seminíferos es inespecífica. En el sector intersticial observaron fluorescencia tanto específica como inespecífica. Describieron la presencia de células aisladas conteniendo gránulos con fluorescencia amarilla cuyo máximo de emisión (510 nm) coincide con el de 5-HT, lo que les permitió suponer la presencia de mastocitos en animales de 20 días de edad.

En relación a la participación de otros neurotransmisores en la función reproductiva del macho, puede citarse la reciente descripción de la presencia de ácido gama-aminobutírico (GABA) en parénquima testicular de rata (Ritta y col, 1987). Se encontró que los niveles intratesticulares de GABA

son máximos en la etapa prepuberal y presentan variaciones en respuesta a la administración de LHRH, gonadotrofinas y testosterona (Campos y col, 1989).

### Los neurotransmisores y la función testicular

En los últimos años se ha descrito que un gran número de factores endógenos, entre ellos varios neurotransmisores, afectan la esteroidogénesis testicular. Es importante mencionar los antecedentes bibliográficos que sugieren la existencia de un mecanismo de regulación neural de la biosíntesis de andrógenos testiculares.

Varios grupos de investigación han estudiado la influencia de las catecolaminas sobre distintos aspectos de la función testicular. La administración in vivo de E se ha asociado generalmente con una disminución en la concentración plasmática de testosterona tanto en humanos (Levin y col, 1967) como en ratas (Damber y Janson, 1978 ; Gotz y col, 1983; Stahl y col, 1984). Sin embargo, Eik-Nes (1969) describió que la infusión del agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol por la arteria testicular en perros, provoca un aumento en la concentración plasmática de testosterona.

La administración de altas dosis de E y NE sistémica o local produce una profunda vasoconstricción de la arteria testicular de ratas (Free y Jaffe, 1972), en cambio al

utilizar dosis menores se obtuvieron resultados inconsistentes. En otros estudios similares en los que se registraron variaciones en el flujo sanguíneo mediante un detector de flujo Doppler (Damber y col, 1982) se observó una disminución significativa en el flujo sanguíneo testicular luego de la inyección de 10 ug de NE o E en la arteria de la cola de la rata. Sin embargo con dosis menores (1 y 0.1 ug) no se obtuvieron variaciones significativas en el flujo sanguíneo. Estos mismos autores sugieren que la función testicular no estaría afectada de manera importante por variaciones en el flujo sanguíneo dado que se requirieron altas dosis de catecolaminas para modificar el mismo. De acuerdo con estos resultados la disminución en los niveles plasmáticos de testosterona inducida por catecolaminas (Levin y col, 1967, Damber y Janson , 1978) o por estrés (Bliss y col, 1972) no podría asociarse directamente a eventuales cambios en el flujo sanguíneo testicular.

Los estudios in vitro demuestran que las catecolaminas tienen un efecto estimulador sobre la producción testicular de andrógenos en distintas especies (Cooke y col, 1982; Anakwe y col, 1985; Mayerhofer y col, 1989). Se ha observado una pequeña estimulación de la producción de de andrógenos por testículos enteros decapsulados de ratas y ratones (Moger y col, 1982; Anakwe y Moger, 1984a). El efecto estimulador de las catecolaminas sobre la producción de androgenos es mayor



en cultivos primarios de células de Leydig (Cooke y col, 1982; Moger y col, 1982; Moger y Murphy 1983). Al coincubar isoproterenol con bajas dosis de LH el efecto estimuladorio es aditivo, en cambio, en presencia de una dosis máxima de LH el isoproterenol es incapaz de superar el estímulo de la gonadotrofina. Esta observación está de acuerdo con el hecho que la LH y el isoproterenol estimulan la producción de andrógenos en células de Leydig a través del mismo mecanismo: la formación de AMP<sub>c</sub>.

Se observó que el efecto estimuladorio de las catecolaminas se anula en presencia del antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol lo que sugería la presencia de receptores  $\beta$ -adrenérgicos testiculares (Anakwe y Moger 1984b; Poyet y Labrie 1983). Trabajando con células de Leydig aisladas y purificadas Anakwe y col. (1985) describieron y caracterizaron receptores  $\beta$  adrenérgicos de tipo 2 que median la estimulación de la esteroidogénesis en rata y ratón.

Se ha estudiado también el efecto de drogas adrenérgicas en el sector tubular. El isoproterenol estimula la aromatización de testosterona en cultivos de células de Sertoli de ratas (Verhoeven, 1980). Heindel y col (1981) describieron la presencia de receptores  $\beta_1$  en cultivos de células de Sertoli. Sin embargo, estudios de unión con <sup>125</sup>I-pindolol demostraron que los receptores  $\beta$  no están presentes en células de Sertoli frescas ni en preparaciones de membranas de túbulo seminife-

ros. A lo largo del cultivo las células de Sertoli adquieren receptores adrenérgicos y responden a los correspondientes agonistas, y dicha aparición de receptores en cultivos se bloquea en presencia de cicloheximida (Kierzenbaum y col, 1985).

Las primeras evidencias de que la 5-HT podría afectar la función testicular surgieron en los años 50 cuando se observó que la administración exógena de dicha indolamina provocaba una notable reducción en el peso testicular (Salgado y Green, 1955). Más tarde, Bocabella y col (1962) realizaron un análisis detallado del efecto de 5-HT sobre la histología testicular, observando que la administración diaria de 20 mg/kg de 5-HT a ratas adultas provocaba una caída significativa en el peso testicular, al quinto día de tratamiento. En ese momento ya se encontraban lesiones importantes a nivel de los túbulos seminíferos mientras que el sector intersticial no presentaba cambios morfológicos evidentes. En los túbulos se observó la aparición de espermátides gigantes multinucleadas y espermatoцитos primarios picnóticos. A partir de los 15 días de dicho tratamiento la mayoría de los túbulos contenían solamente células de Sertoli y espermatogonias, otros habían perdido todos sus tipos celulares, mientras que los restantes mantenían su epitelio germinal normal. El número de espermatozoides epididimarios disminuyó notablemente luego de 15 días de tratamiento y habían perdido su motilidad. Estas lesiones

observadas fueron atribuidas a la isquemia testicular provocada por 5-HT ya que la administración simultánea de un vasodilatador prevenía dichos cambios morfológicos. Estos resultados indicaban que el lecho vascular del testículo es otro compartimiento vascular afectado por 5-HT. Se ha demostrado que 5-HT tiene efectos constrictores en la irrigación renal y pulmonar, mientras que en otros sistemas su efecto es variable.

Kormano y col. (1968) administrando crónicamente dosis menores de 5-HT observaron daños semejantes en los túbulos seminíferos. Más tarde, Liu y Kinson (1973) estudiaron el efecto de un implante subcutáneo de 10 mg de 5-HT. Coincidiendo con las observaciones anteriores, los implantes de 5-HT causaron una disminución en el diámetro tubular y destrucción progresiva del epitelio germinal. Estos autores describieron una destrucción del tejido intersticial que rodea a los túbulos seminíferos dañados, y una disminución significativa en los niveles circulantes de andrógenos, sin embargo tales lesiones de las células endócrinas intersticiales no se reflejaban en la concentración de testosterona en la vena testicular.

La disminución en los niveles plasmáticos de testosterona que se observa luego de la administración de 5-HT ha sido generalmente atribuida a la supresión de gonadotrofinas (Reiter y Fraschi, 1969; Kamberi y col, 1971). Sin embargo,

Kalla (1979) demostró que el tratamiento por 4 días con 30 mg/kg/día de ratas adultas hipofisectomizadas y suplementadas con gonadotrofinas, induce una caída importante en la concentración plasmática e intratesticular de testosterona. Los resultados obtenidos en este modelo experimental sugieren la existencia de un efecto directo de 5-HT sobre la producción de andrógenos, o sobre la acción de gonadotrofinas sobre el testículo, no mediado por modificaciones en las gonadotrofinas hipofisarias o factores liberadores hipotalámicos.

Los antecedentes bibliográficos mencionados sugieren que 5-HT podría estar involucrada en la modulación de la esteroidogénesis testicular. Sin embargo, los modelos experimentales en los que se administra 5-HT in vivo no permiten discernir si los efectos observados se deben a: 1) alteraciones en la secreción de gonadotrofinas, 2) alteración del flujo sanguíneo testicular o 3) un efecto directo sobre la producción de andrógenos por las células de Leydig.

Esta última posibilidad fue considerada por Vermes y col. (1979) quienes estudiaron el efecto de varios neurotransmisores sobre el eje hipotálamo-hipófiso-testicular utilizando un sistema in vitro de incubaciones celulares. Estos autores describieron un efecto inhibitorio de 5-HT (10 ug/ml) sobre la producción de testosterona por células intersticiales. Por otro lado, Ellis (1972) aportó una explicación bioquímica a este efecto inhibitorio, demostrando que el agregado de 5-HT

a homogenatos o microsomas testiculares inhibe las actividades de las enzimas  $17\alpha$ -hidroxilasa, C17-20 liasa y  $17\alpha$ -reductasa.

Como se mencionara anteriormente, el GABA es otro neurotransmisor presente en el tejido testicular. Estudios in vitro demostraron que el GABA estimula la producción de andrógenos por testículos enteros (Ritta y col, 1987) o células intersticiales aisladas (Ritta y col, 1991) mediante su interacción con receptores de membrana tipo A y tipo B, los cuales coexisten en la célula de Leydig (Ritta y col. 1991).

La posible participación del sistema nervioso parasimpático en el control de la actividad testicular ha sido escasamente estudiada. Kanson y col (1985) estudiaron el efecto de diversas drogas colinérgicas sobre la producción de andrógenos, utilizando cultivos primarios de células testiculares provenientes de ratas adultas hipofisectomizadas. Observaron que los agonistas colinérgicos nicotínicos, pero no los muscarínicos, provocan una disminución en la biosíntesis de andrógenos estimulada por hCG, a través de una inhibición selectiva de la enzima  $17\alpha$ -hidroxilasa. Estos resultados sugieren que la Ach podría estar involucrada en la regulación de la esteroidogénesis testicular.

### Desnervación testicular

La mayoría de los órganos endócrinos reciben inervación del sistema nervioso autónomo y la participación de estos nervios en el control de la producción de hormonas ha despertado gran interés. La desnervación tanto quirúrgica como química ha sido una herramienta experimental utilizada para analizar en qué medida la inervación testicular participa de los mecanismos regulatorios gonadales. Varios grupos han estudiado el efecto de la desnervación testicular, obteniendo en general resultados contradictorios, los cuales parecerían depender en parte, de la especie utilizada.

Se ha descrito que la sección de los nervios que llegan al testículo provoca degeneración y reducción en el epitelio germinal en perros (Kuntz, 1919; Marconi, 1923), cobayos (Coujard, 1952) y gatos (King y Langworthy, 1940). En trabajos más recientes (Nagai y col, 1982) se observó que tales lesiones ocasionadas por desnervación solo se observan si dicha operación se realiza en animales jóvenes y que pasada esa edad crítica la desnervación no causa reducción en el peso ni daño a nivel de los túbulos seminíferos. Sugieren también que la inervación simpática participaría en el crecimiento testicular, y en especial en el desarrollo de los túbulos seminíferos. En cambio, la sección de las principales vías de inervación testicular en cerdos de 15 días de edad, no afectó

el desarrollo de la gonada (Noordhuizen-Stassen y Wensing, 1983). Se observó también que la desnervación testicular de carneros adultos no alteró la calidad del semen analizado 6 semanas después de realizada la cirugía (Martin y col, 1984).

Las primeras evidencias de que la inervación testicular modularía la producción de andrógenos fueron aportadas por Frankel y Ryan (1981) quienes encontraron que la desnervación testicular bloquea parcialmente el aumento de testosterona plasmática inducido por estrés. La sección bilateral del nervio espermático superior no afecta los niveles basales de testosterona plasmática, el peso testicular, la espermatogénesis ni el comportamiento sexual de la rata (Frankel y Ryan, 1981). Unos años más tarde se demostró que la vasectomía, que involucra la sección del nervio espermático inferior, bloquea parcialmente el aumento en la concentración de testosterona en la vena testicular de ratas hemicastradas (Frankel y col, 1984). La administración del antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol, inhibe significativamente la concentración de testosterona tanto en vena testicular como en el líquido intersticial de ratas unilateralmente orquidectomizadas (Moger y Anakwe, 1986). Estos resultados indican que la respuesta testicular a la hemicastración resultaría en parte de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica de la esteroidogénesis testicular y estaría bajo control nervioso.

La actividad endócrina de otros tejidos también se

encuentra sujeta al control nervioso. Existen evidencias de que la inervación ovárica participa activamente en la respuesta compensatoria a la hemiovariectomía (Burden and Lawrence, 1977; Curry y col, 1984; Gerendai y col. 1978; Gerendai, 1980; Burden y col, 1986), el proceso de ovulación, el desarrollo folicular (Curry y col, 1985; Burden, 1978) y la secreción de esteroides (Aguado y Ojeda, 1984; Weiss y col, 1982). Luego de la adrenalectomía unilateral los mecanismos compensatorios se encuentran también mediados por un reflejo neural más que por hormonas pituitarias (Dallman y col, 1976; Dallman y col, 1977; Kleitman y Holzwarth, 1985).

Experimentos de desnervación indican que el crecimiento y la actividad secretoria de la tiroides están influenciadas por la inervación que recibe la glándula (Romeo y col, 1988; Romeo y col, 1985; Cardinali y Romeo, 1990), y una situación similar ha sido descrita para la producción de calcitonina y hormona paratiroidea (Heath, 1980; Cardinali y Ladizesky, 1985). Otro ejemplo de la participación de la inervación autónoma en el control de la producción de hormonas es el caso del páncreas donde la estimulación nerviosa provoca el aumento de la secreción de glucagon e insulina (Miller, 1981; Marre y col, 1982; Bobbioni y col, 1983) no sólo a través de clásicos mecanismos simpáticos y parasimpáticos sino también mediante la liberación de neuropéptidos (Ahren y col, 1986; Dunning y Taborsky).



## **OBJETIVOS**

El propósito de este trabajo de Tesis fue contribuir a esclarecer la existencia de un mecanismo de regulación neural de la función testicular de la rata.

Se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinar la localización de catecolaminas y serotonina en el testículo de rata y su concentración en los distintos compartimientos testiculares.
- Analizar el efecto de serotonina sobre la producción de andrógenos y la presencia de receptores serotoninérgicos testiculares.
- Estudiar la ontogenia del receptor  $\beta$ -adrenérgico en células de Leydig.
- Investigar si la sección del nervio espermático superior determina cambios en:
  - . el contenido de monoaminas testiculares,
  - . los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en células de Leydig,
  - . los niveles plasmáticos de andrógenos y hormonas hipofisarias,
  - . la producción in vitro de andrógenos en condiciones basales y en respuesta al estímulo de hCG,
  - . los receptores testiculares de gonadotrofinas y prolactina,
  - . la morfología testicular.

## **MATERIALES Y METODOS**

**DROGAS Y REACTIVOS**

[1 $\alpha$ -2 $\alpha$ -<sup>3</sup>H(N)]-testosterone (AE 55,2 Ci/mmol), 5 $\alpha$ -[1,2-<sup>3</sup>H(N)]-androstane-3,17 $\beta$ -diol (AE 30.1 Ci/mmol), 5-[1,2-<sup>3</sup>H(N)]-hydroxitriptamina creatinina sulfato (AE 25-30 Ci/mmol) y S-[metil-<sup>3</sup>H]-adenosil-L-metionina (AE 14.9 Ci/mmol) fueron adquiridos a New England Nuclear Co. (Boston, MA, EEUU). (-)-[<sup>3</sup>H]CGP-12177 ((-)-4-(3-t-butilamino-2-hidroxipropoxi)-[5,7-<sup>3</sup>H] benzimidazol-2-ona) (AE 51 Ci/mmol) fue adquirido a Amersham, (Buckinghamshire, Inglaterra). Las soluciones empleadas en las técnicas de cromatografía líquida de alta presión (hplc) se prepararon con agua grado hplc provista por Sintorgan (Buenos Aires). La gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Endocorión) y la FSH (Eleagol), utilizadas en la determinación de receptores para gonadotrofinas fueron gentilmente cedidas por Laboratorios Elea (Buenos Aires). La hCG (APL) utilizada en los experimentos in vitro fue provista por Laboratorios Ayerst (Princeton, NJ, EEUU). El antagonista serotoninérgico ketanserina fue generosamente provisto por Laboratorios Janssen (Buenos Aires). Las preparaciones de células intersticiales se obtuvieron utilizando colagenasa tipo I provista por Worthington Biochemical (Freehold, NY, EEUU) y la metrizamida utilizada en la purificación de células de Leydig por Nyegaard & Co, (Oslo, Norue-

ga). En la determinación radioenzimática de catecolaminas se utilizaron placas Linear K, Whatman. Las incubaciones celulares se realizaron en Medio 199 de Gibco (Grand Island NY, EEUU). La alúmina utilizada fue provista por Bioanalytical Systems Inc. (Indiana, EEUU).

Todos los restantes reactivos y drogas utilizados fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EEUU). Los solventes utilizados fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Rep. Federal Alemana) o Sintorgan (Buenos Aires).

#### ANIMALES

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, provistos por el criadero del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Los animales fueron mantenidos a temperatura constante de 22 °C, con períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y recibieron una dieta balanceada y agua ad libitum.

#### PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS

1. Sección del nervio espermático superior: Las ratas fueron anestesiadas con eter y desnervadas uni o bilateralmente según se indica en cada experimento. Con la ayuda de una lupa de disección (Zeiss) se separaron los nervios espermáticos supe-

riores de la arteria testicular y se seccionó una porción de por lo menos 10 mm de los mismos. En los casos en que se realizó desnervación bilateral, otro grupo de ratas fue sometido a operación simulada y utilizadas como grupo control, mientras que en animales unilateralmente desnervados se tomó como control el testículo contralateral.

2. Se prepararon lotes de ratas adultas con desnervación unilateral a las cuales se les seccionó únicamente la rama nerviosa que se origina en el plexo renal. En este caso, el testículo contralateral se utilizó como control.

#### TEJIDOS:

##### Aislamiento de los compartimientos testiculares para la determinación de monoaminas

El estudio de la distribución intratesticular de monoaminas se realizó en ratas adultas. El día del experimento las ratas se anestesiaron con eter y se perfundieron por vía cardíaca con solución salina (Na Cl 0.9%) conteniendo 10  $\mu$ M de pargilina. Este inhibidor de la enzima monoamino oxidasa se agregó a la solución de perfusión para evitar la degradación enzimática de las catecolaminas y la 5-HT intratesticulares durante la preparación de las muestras.

El aislamiento de los diferentes compartimientos testiculares se realizó manteniendo los tejidos entre 0 y 4 °C para evitar la degradación de las monoaminas. La cápsula testicular se aisló del parénquima, cortó en pequeños trozos y se homogeneizó en ácido perclórico (PCA) 0.1 M, utilizando homogeneizadores vidrio - vidrio. El parénquima testicular se colocó en una cápsula de Petri con solución salina fría y mediante dispersión mecánica bajo lupa se aislaron los túbulos seminíferos del tejido intersticial.

El líquido intersticial se recolectó a partir de testículos individuales siguiendo la técnica descrita por Sharpe (1983). Se hizo una incisión de aproximadamente 4 mm en el polo inferior del testículo, se lo colocó en un tubo de poliestireno, dejándolo luego durante 20 horas a 4°C para permitir que el líquido percole dentro del tubo.

Los homogenatos obtenidos a partir de las cápsulas, túbulos seminíferos y células intersticiales se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos, y los sobrenadantes se filtraron a través de microfiltros de nitrocelulosa mediante una centrifugación de 10 minutos a 10.000 rpm. En los extractos perclóricos así obtenidos se determinó la concentración de 5-HT por hplc y la concentración de catecolaminas por la técnica radioenzimática.

### Obtención de células intersticiales

Para la obtención de células intersticiales se utilizó la técnica descrita por Mendelson y col (1975). Los testículos decapsulados, colocados en tubos Falcon de plástico (hasta 6 testículos por tubo) fueron suspendidos en Medio 199 (M199) en una relación de 1 g de testículo por ml de medio conteniendo 0.3 mg/ml de colagenasa. La incubación se realizó a 34 °C, durante 10-12 minutos en un incubador tipo Dubnoff con agitación constante. Finalizada la incubación, la acción de la colagenasa se detuvo por dilución con M199 (8 ml por ml de incubación). Con el objeto de dispersar mejor el tejido, los tubos se agitaron en forma rotatoria, durante 3 minutos, dejándolos reposar otros 3 minutos. Cuando los túbulos hubieron decantado, se filtró el sobrenadante a través de una malla de nylon (Nitex), recogién dose el filtrado en otro tubo de plástico. La resuspensión y agitación rotatoria se repitieron una vez más, y el filtrado se juntó con el anterior. Las células intersticiales obtenidas se centrifugaron a 700 x g durante 10 minutos.

Para eliminar los glóbulos rojos presentes en este preparado se resuspendieron las células en una solución isotónica de Tris-NH<sub>4</sub>Cl (1.7 y 140 mM respectivamente) e incubaron durante 10 minutos a 34 °C con agitación constante. La lisis de los glóbulos rojos se detuvo por dilución con



M199, y la células se centrifugaron nuevamente a 700 x g durante 10 minutos (Radicella, 1986).

**Determinación del porcentaje de células con actividad de 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.**

La técnica histoquímica que detecta la actividad 3 $\beta$ -HSD (Levy y col, 1959) permitió evaluar el porcentaje de células esteroideogénicas en las suspensiones celulares obtenidas por colagenización. Un ml de suspensión celular se incubó con 1 ml de NAD (8 mg/ml), 1ml de p-nitro azul de tetrazolium (2 mg/ml) y 0,1 ml de dehidroepiandrosterona (1 mg/ml), durante 1 hora en un baño a 37 °C con agitación constante y en atmósfera de carbógeno (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Finalizada la incubación, se evaluó microscópicamente la presencia de depósitos oscuros en las células con actividad de 3 $\beta$ -HSD, que provienen de la reducción del p-nitro azul de tetrazolium a azul de formazán.

**Determinación del porcentaje de células viables**

El porcentaje de células viables presentes en cada preparación se determinó mediante el test de exclusión de azul tripan. A 100 ul de suspensión celular en M199 se le agregaron 500 ul de una solución 0.4% de azul tripan y 400 ul de M199 conteniendo 0.1 % albúmina sérica bovina (BSA). Las células

permanecieron 5 minutos a temperatura ambiente en presencia de azul tripan antes de su observación microscópica. El porcentaje de células teñidas (muertas) se determinó utilizando una cámara de Neubauer.

### Purificación de células de Leydig

Las células de Leydig se purificaron utilizando dos técnicas diferentes:

#### 1) Purificación por metrizamida:

Las células intersticiales se resuspendieron en 4 ml de M199 conteniendo 30 ug/ml de ADNasa, se ubicaron sobre una capa de 8 ml de Metrizamida al 11% y centrifugaron a 3.300 x g durante 10 minutos (Radicella, 1986). El precipitado así obtenido contenía entre un 95 - 98% de células de Leydig, de acuerdo con la técnica histoquímica que detecta la actividad de 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

#### 2) Purificación por Percoll:

En este caso la purificación se realizó por centrifugación de la suspensión de células intersticiales libres de glóbulos rojos, a través de 2 bandas de Percoll de 90 y 40%, según describe Khun y Velten (1982). El gradiente discontinuo se centrifugó a 1100 x g durante 15 minutos. La fracción de células de Leydig se ubicó en la interfase de las dos bandas de Percoll y entre 92 y 95% de estas células mostraron

actividad de 3 $\beta$ -HSD. Dichas células fueron aspiradas, diluidas con M199 y centrifugadas a 700 x g durante 10 minutos.

#### DETERMINACION DE MONOAMINAS TESTICULARES

##### Determinación de monoaminas por histoquímica de fluorescencia

Para la determinación histoquímica de monoaminas se siguió la técnica descrita por de la Torre y Surgeon (1976) basada en la reacción del ácido glioxílico con las monoaminas del tejido para dar un derivado fluorescente.

Las ratas se anestesiaron con eter y se disecaron los testículos, colocándose trozos de los mismos dentro de un crióstato a -25 °C hasta su total congelamiento. Se prepararon cortes de 16  $\mu$  de espesor y se recogieron en porta objetos previamente enfriados. Cada corte se sumergió en una solución 0.2 M de sacarosa, 0.23 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1% ácido glioxílico, pH7.4, durante 3 segundos dejándose secar bajo una corriente de aire frío. Los cortes se pasaron a una estufa a  $80 \pm 1$  °C donde permanecieron exactamente 5 minutos y luego se montaron para su observación microscópica.

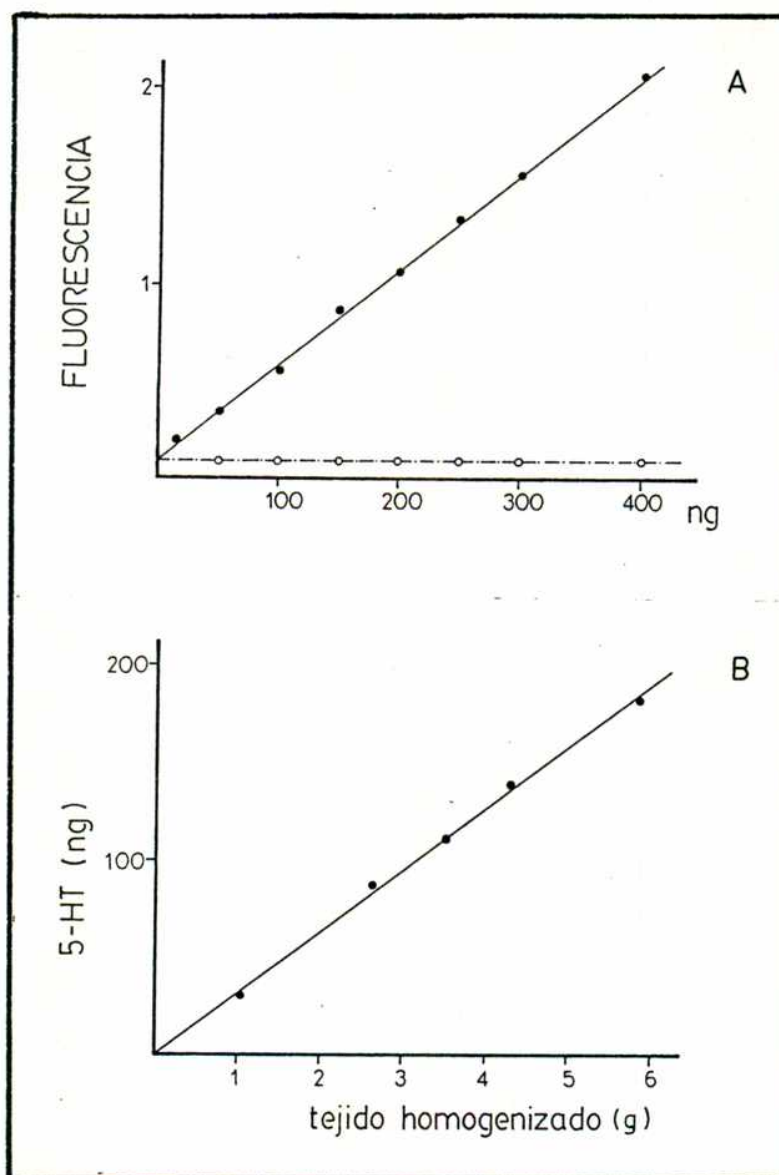
Los cortes fueron observados y fotografiados en un microscopio de fluorescencia Zeiss, utilizando un filtro de excitación ultravioleta de banda amplia (emisión máxima: 425 nm, excitación máxima: 355 nm).

### Técnica espectrofluorométrica para la detección de 5-HT

Para la determinación del contenido de 5-HT en testículos enteros, se utilizó la técnica espectrofluorométrica descrita por Curzon y Green (1970). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los testículos colocándolos en cápsulas de vidrio sobre hielo. El tejido se pesó y procesó inmediatamente o bien se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la determinación.

Las siguientes soluciones se prepararon el mismo día del experimento: 0.004% o-ftalaldehído (OPT) en HCl 10 N y 0.1% cisteína en HCl 0.1 N. Los testículos descapsulados se homogeneizaron en 10 volúmenes de n-butanol acidificado y frío, utilizando un homogeneizador Ultraturrax. Luego de centrifugar el homogenato por 5 min a 3000 rpm, a 2.5 ml del sobrenadante se le agregaron 5 ml de n-heptano y 0.4 ml de HCl 0.1 N conteniendo 0.1% cisteína, las fases se agitaron vigorosamente para lograr la extracción y luego se separaron por centrifugación.

Para la determinación de 5-HT se tomaron alícuotas de 0.2 ml de la fase acuosa a los cuales se les agregó 1.4 ml de OPT. Los tubos se mantuvieron en un baño a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. y una vez fríos la fluorescencia se cuantificó utilizando un espectrofluorómetro Aminco-Bowman. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 360 y 470  $\mu\text{m}$  respectivamente. Los



**Figura 10: Determinación espectrofluorométrica de 5-HT.**

**A:** Curva de calibración. ●: 5-HT, ○: triptofano.

**B:** Curva de tejido.

blancos de reacción se prepararon haciendo reaccionar 1.4 ml de solución OPT con 0.2 ml de cisteína 0.1% en HCl 0.1 N.

La relación entre fluorescencia y cantidad de 5-HT presente resultó lineal entre 10 y 400 ng, obteniéndose duplicados que no diferían en más de un 1% del promedio. El punto de la curva conteniendo 25 ng de 5-HT dio una lectura que resultó el doble de la correspondiente al blanco de reacción. Se observó además, que el triptofano, precursor de la 5-HT, no interfería en esta determinación (fig. 10 A). Por otro lado, se verificó que la cantidad de 5-HT testicular determinada por este método espectrofluorométrico resultó ser lineal con la cantidad de tejido utilizado para la extracción y posterior reacción (fig. 10 B) en el rango de 1 - 6 g.

#### Determinación de 5-HT por HPLC

El contenido de 5-HT en cada compartimiento testicular aislado se determinó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta presión (hplc) y detección electroquímica. El método seguido fue el descrito por Koch y Kissinger (1973), con algunas modificaciones que permitieron aumentar la sensibilidad y la resolución de los metabolitos.

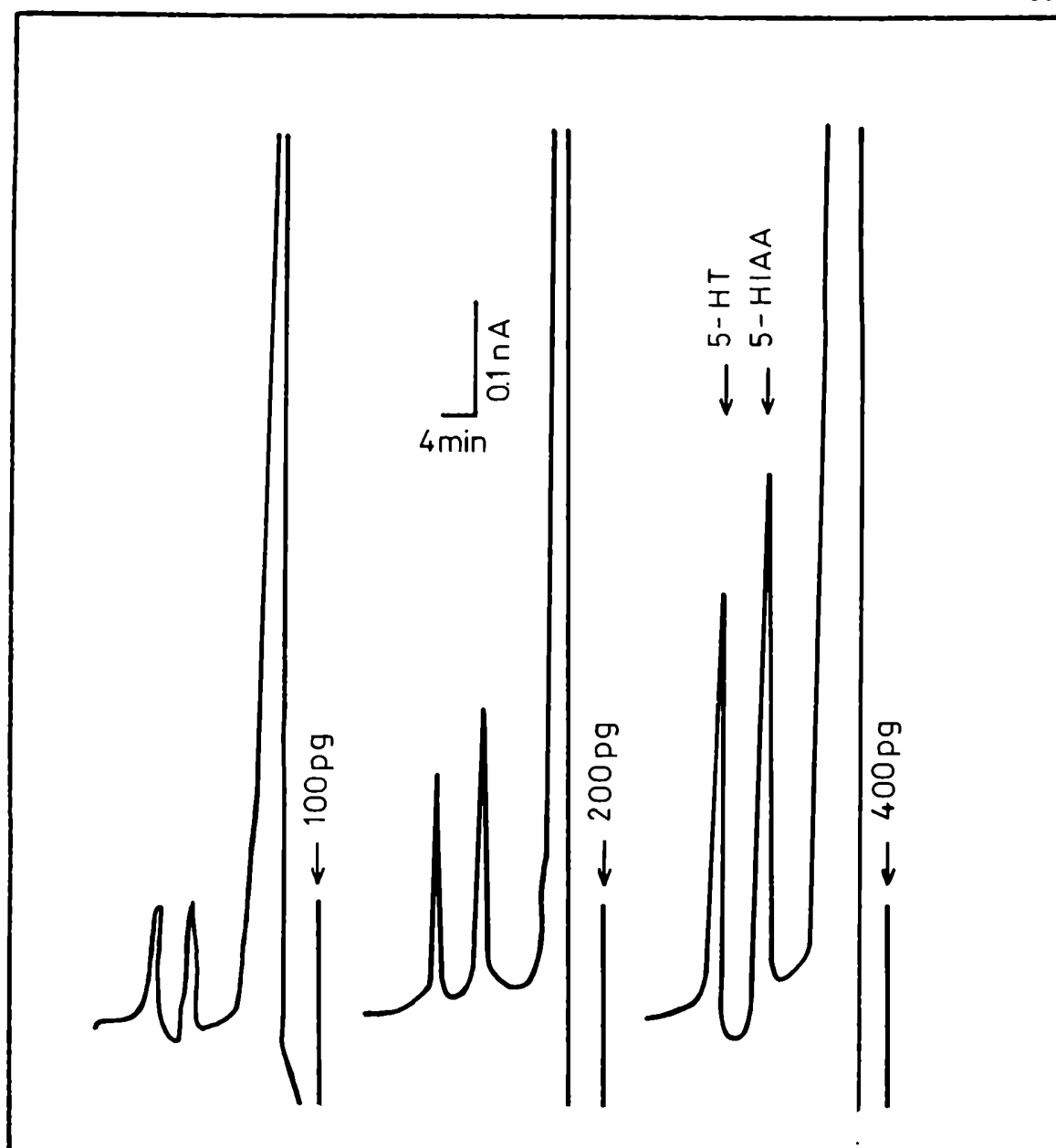
Las mediciones se realizaron en un cromatógrafo de Bioanalytical Systems (West Lafayette, IN., EEUU) equipado con una válvula de inyección de 6 puertas (Rheodyne) con un loop

de 50  $\mu$ l, una columna de fase reversa (uBondapak  $C_{18}$ ), con tamaño de partícula 10  $\mu$ m, y dimensiones de la columna 30 x 3,9 mm. Se utilizó un detector amperométrico (LC-4 Bioanalytical System) con un electrodo de pasta de carbón (CP-0) al que se le aplicó un potencial de 0.6 V versus un electrodo de Ag/AgCl como referencia.

La fase móvil utilizada fue un buffer AcOH/AcONH<sub>4</sub> 0.5 M pH 5.1 que contiene 4,8 % de metanol (calidad hplc). Esta fase móvil se impulsó mediante una bomba de un solo pistón (Altex modelo 110 A) con un flujo de 1 ml/ minuto (1300 psi) y se recicló.

En estas condiciones experimentales los tiempos de retención de obtenidos fueron: 5-HT: 14,8 min y 5-HIAA: 10,8 min (fig 11). En este sistema las catecolaminas y sus metabolitos se eluyen en el volúmen muerto y el triptofano no se detecta al potencial escogido. La sensibilidad alcanzada es de alrededor de 20 pg, dependiendo del electrodo de trabajo. A fin de asegurar una buena sensibilidad y reproducibilidad se pulió el electrodo repetidas veces a lo largo de su uso.

Con las alturas de los picos correspondientes a los patrones se construye una curva de calibración. La concentración de 5-HT en las muestras se calcula a partir de la altura del pico utilizando la curva de calibración.



**Figura 11** : Cromatogramas obtenidos con soluciones standard conteniendo cantidades crecientes de 5-hidroxitriptamina (5-HT) y ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA).

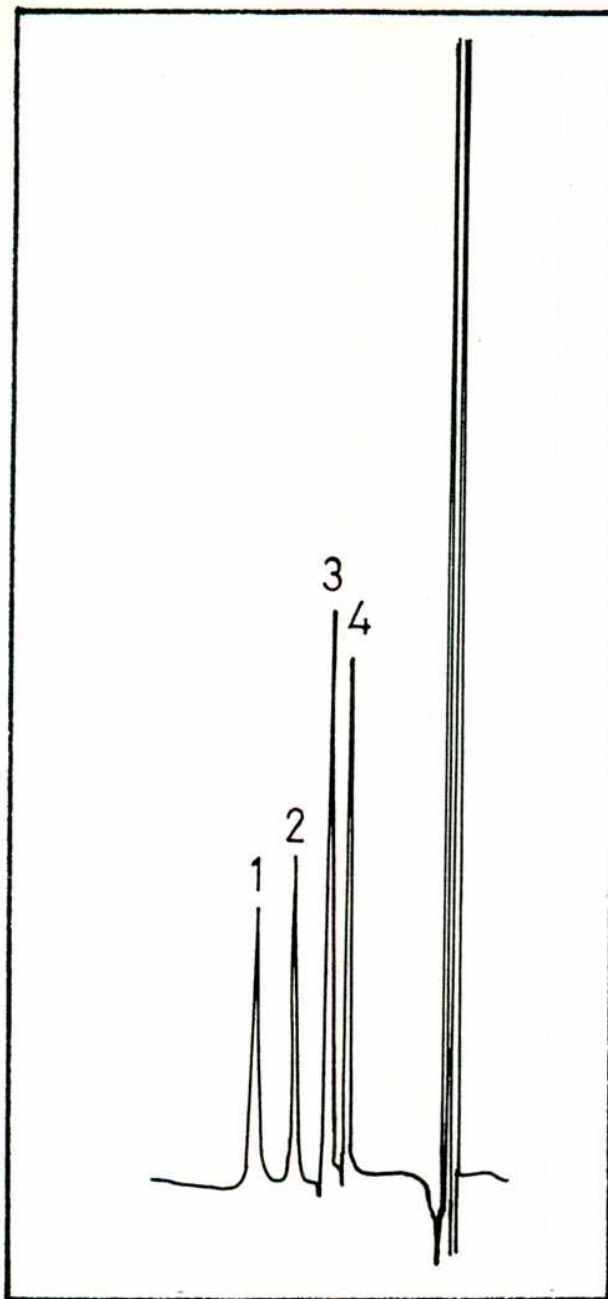


### Determinación de catecolaminas por HPLC

El contenido de NE en cápsulas de testículos controles y desnervados se determinó mediante la técnica de hplc. El tejido fue homogeinizado en PCA 0.2 N, bisulfito de sodio 0.3%, EDTA 0.5% junto con 5 ng de standard interno 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA). El homogenato se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C, descartándose el precipitado. A una alícuota de 500 ul de sobrenadante se le agregaron 1 ml de buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 8.6 y 5 mg de alúmina y agitó vigorosamente durante 2 minutos. La alúmina se separó por centrifugación a 12.000 x g durante 5 minutos y se lavó dos veces con agua tridestilada. Posteriormente las catecolaminas se eluyeron en ácido fosfórico 0.1 M, y la alúmina se eliminó por centrifugación. El extracto se filtró a través de filtros Milipore, guardándose el filtrado a -70 °C hasta la determinación en el sistema hplc.

Se utilizó el mismo equipo descrito para la medición de 5-HT. La fase móvil usada fue 0.1 M acetato de sodio, 0.02 M ácido cítrico, 100 mg/l EDTA, 0.5 mM octil sulfato de sodio, 8% metanol, pH 4.2. Las soluciones standard de NE, DA y DHBA se prepararon el día de la medición de las muestras en ácido fosfórico 0.1 M. El potencial de oxidación aplicado fue de 0.7 V.

Los cromatogramas se obtuvieron sobre un registrador



**Figura 12:** Cromatograma obtenido con soluciones standard de catecolaminas.

1: dopamina; 2: 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA); 3: epinefrina; 4: norepinefrina.

gráfico y la altura de los picos se comparó con las alturas de los picos correspondientes a las soluciones standard (fig.12).

### Técnica radioenzimática para la determinación de catecolaminas

El contenido de catecolaminas en cada compartimiento testicular aislado se determinó utilizando el método radioenzimático originalmente descrito por Da Prada y Zürcher (1976) y modificado por Chiochio y col. (1984). El ensayo se basa en la metilación de las catecolaminas por la enzima catecol-O-metil transferasa (COMT) en presencia de  $^3\text{H}$ -S-adenosilmetionina ( $^3\text{H}$ -SAM). Los productos O-metilados radiactivos se transforman luego en complejos menos polares mediante el agregado de tetrafenilborato (TPB), son extraídos en éter y luego separados por cromatografía en capa delgada.

Para cada serie de determinaciones se prepararon 2 blancos de reacción :1) conteniendo 100 ul de PCA 0.3 % a lo largo de todo el procedimiento y 2) conteniendo 100 ul del extracto perclórico, que se procesa obviando el agregado de COMT.

Las muestras (100 ul de extractos perclóricos) se colocaron en tubos Eppendorf. Para la preparación de los standards internos y externos se agregaron 50 ul de una solución conteniendo una masa adecuada de cada una de las aminas disueltas en 0.1N HCl (0.1 - 1 ng) a 100 ul de la

muestra o a 100 ul de PCA 0.3 N, respectivamente. Se agregaron 50 ul de HCl 0.01N tanto a las muestras como a los blancos.

La reacción se inició con el agregado de 100 ul de la siguiente preparación: 0.1 mg ditiotreitól, 50 ul de buffer Tris-HCl 2 M pH 9.6, 20ul de 25mM MgCl<sub>2</sub>, 25 ul de COMT y 2 ul de <sup>3</sup>H-SAM (0.27 nmoles). Los tubos se taparon y la mezcla de reacción se incubó durante 60 min a 35°C en un baño con agitación constante.

Finalizada la incubación la reacción se detuvo colocando los tubos en hielo y agregando 150 ul de buffer borato 1 M pH8.0. Se agregaron luego 50ul de una solución acuosa de TBP (1,5% p/v) y 50 ul de una solución carrier conteniendo 0.5 mg/ml de los tres derivados metilados no marcados en HCL 0.01 N. Los productos 3-O-metilados [metoxitiramina (MT), metanefrina (MN) y normetanefrina (NM)] se extrajeron de la solución (pH 8.2) en 10 ml de eter dietílico mediante agitación por 5 min. Las fases se separaron por centrifugación a baja velocidad, y 9.7 ml de la fase eterea se transfirieron a otra serie de tubos conteniendo 0.5 ml de HCl 0.1N. Despues de la agitación y posterior centrifugación se aspiró y descartó la fase orgánica y la fase acuosa se evaporó bajo vacio en un baño a 20°C. El residuo fue tomado en 80 ul de una solución conteniendo metanol y 0.001N HCl. Cada muestra se sembró en una placa linear K, Whatman. La cromatografía se desarrolló durante aproximadamente 30 min en cubas mantenidas en oscuri-

dad con el siguiente solvente: cloroformo: etanol: etilamina 70% (16:3:2). Las placas se dejaron secar bajo una corriente de aire frío y se identificaron las bandas correspondientes a los derivados metilados por irradiación con luz UV de longitud de onda 254nm. La banda corespondiente a MT tritiada se eluyó en 1 ml de HCl 0.5 N y se cuantificó su radiactividad. En cambio la MN y NM fueron fueron previamente oxidadas a ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico. Para ello, se rasparon de la placa las bandas correspondientes a MN y NM transfiriéndolas a otra serie de tubos. Los derivados metilados se eluyeron dos veces en 1 ml de NH<sub>3</sub> 2N. Al eluido se le agregaron 0.25 ml de NaIO<sub>4</sub> 3% y luego de una incubación a 35 °C durante 10 min, se colocaron en hielo, y agregaron 0.5 ml de ácido acético y 10 ml de toluol. Los tubos se agitaron y centrifugaron y la fase orgánica fue transferida a viales de conteo para la cuantificación de su radiactividad.

#### DETERMINACION DE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE ANDROGENOS

##### Incubación de testículo entero:

La capacidad esteroideogénica de los testículos de ratas controles o desnervadas se estudió "in vitro" tanto en condiciones basales como de estimulación con hCG, siguiendo las técnicas utilizadas en el Laboratorio (Suescun y col, 1985).

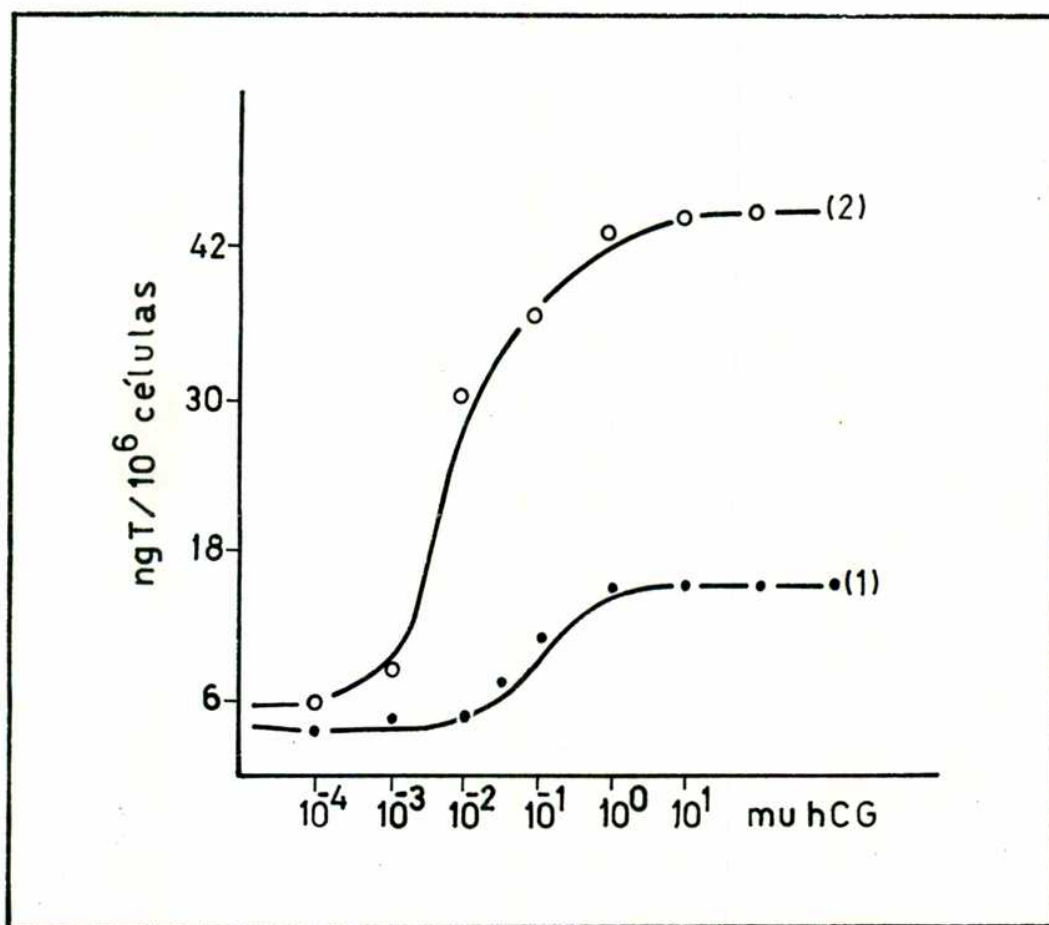
Los testículos descapsulados se colocaron en viales de plástico conteniendo 3 ml de M199, 0.1 mM MIX y 0.1% BSA y fueron incubados en condiciones basales, bajo atmosfera de carbógeno, a 34°C, durante 2 horas. Luego de esta primera incubación, los testículos se lavaron en M199, y fueron colocados en 3 ml de medio fresco conteniendo 100 mUI de hCG, 0.1 mM MIX y 0.1% BSA, donde se incubaron por 2 horas más en las mismas condiciones de la primera incubación.

Finalizada cada incubación el medio se transfirió a tubos de Kahn y centrifugó a 1.500 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se guardó a -20 °C para la posterior determinación de andrógenos.

#### Incubación de células intersticiales o células de Leydig purificadas

Las células intersticiales o células de Leydig se incubaron en un volumen final de 1 ml de M199 con 0.1 mM de MIX, 0.1% BSA y suplementado con distintas hormonas o reactivos según se detalla para cada experimento. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 3 horas a 34 °C en un incubador tipo Dubnoff, en atmosfera de carbógeno.

Finalizada la incubación, se descartaron las células por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos y el medio sobrenadante se guardó a -20 °C para la posterior deter-



**Figura 13:** Producción de testosterona suspensiones celulares en respuesta a hCG.

(1): suspensión de células intersticiales crudas, (2): suspensión de células de Leydig purificadas.

minación de esteroides. Cada tubo contenía  $10^6$  células intersticiales o bien  $1 - 3 \times 10^5$  células de Leydig purificadas.

Con el propósito de evaluar la capacidad esteroidogénica de las preparaciones celulares se estudió su respuesta a concentraciones crecientes de hCG (fig.13). La producción basal de testosterona fue superior en la preparación de células purificadas que en las suspensiones de células intersticiales crudas, y respondieron con mayor intensidad al estímulo de hCG.

#### **DETERMINACION DE RECEPTORES TESTICULARES**

##### **Determinación de receptores de 5-HT**

Para la determinación de sitios de unión para 5-HT se utilizaron membranas obtenidas a partir de testículos descapsulados o células intersticiales aisladas. Los testículos enteros fueron homogenizados en 5 volúmenes de sacarosa 0.32 M, pH 7.4, mientras que las células obtenidas por colagenización se sonicaron en la misma solución de sacarosa. Los pasos siguientes fueron comunes a ambas preparaciones.

Los homogenatos se centrifugaron a  $1000 \times g$  durante 10 min., separándose de esta manera los núcleos y células



enteras. El sobrenadante fue posteriormente centrifugado a 48.000 x g durante 15 min. y el precipitado obtenido lavado dos veces con buffer Tris 50 mM, pH 7.4. Entre los dos lavados las membranas se resuspendieron e incubaron a 37°C durante 10 minutos para permitir que la monoaminooxidasa degrade la 5-HT endógena. El precipitado final fue resuspendido en un volumen adecuado de buffer Tris (Tris 50 mM, pargilina 10 uM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM, ácido ascórbico 0.05%, pH 7.4)

El ensayo de unión se llevó a cabo en tubos de Kahn de vidrio conteniendo 25 ul de buffer Tris con o sin 5-HT (in-específico y unión total respectivamente), 25 ul de <sup>3</sup>H-5-HT (AE 25 - 30 Ci/mmol) en concentraciones finales de 0.2 a 20 nM y 200 ul de la preparación de membranas. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos y la reacción de asociación se detuvo por filtración rápida al vacío utilizando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B. Seguidamente los filtros se lavaron tres veces con 4 ml de buffer frío. Una vez secos los filtros se transfirieron a viales de vidrio conteniendo 10 ml de tritón-tolueno centellante (30:60) y la radiactividad extraída durante 20 horas se cuantificó en un contador de centelleo líquido con una eficiencia aproximada del 60%.

### Determinación de receptores de LH

La determinación de los receptores testiculares para LH se realizó siguiendo la técnica descrita por Charreau y col. (1978). Los testículos descapsulados se homogenizaron individualmente en buffer fosfato salino (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4 ) en una relación de 4 ml por g de tejido. Los homogenatos se centrifugaron a 20.000 x g durante 30 minutos en una centrifuga refrigerada. El precipitado obtenido fue resuspendido en 9 volúmenes de PBS, filtrado a través de una malla de nylon y utilizado como fuente de receptores.

Alicuotas de 100 ul de fracción receptora fueron incubadas con concentraciones crecientes de <sup>125</sup>I-LH ( 5000 - 200.000 cpm, AE: 10 -30 uCi/ug) en tubos de Kahn de plástico durante 20 horas a temperatura ambiente, en un volumen final de 250 ul. La unión inespecífica se determinó en incubaciones paralelas conteniendo 100 UI de hCG.

Finalizada la incubación, las membranas se diluyeron con 2.5 ml de PBS frío y se centrifugaron a 3.500 rpm durante 30 minutos aspirándose luego el sobrenadante. La radiactividad presente en los precipitados se determinó en un contador gamma automático (Beckman Auto-Gamma 4000), con una eficiencia de conteo del 74%.

### Determinación de receptores de FSH

Para la determinación de receptores testiculares para FSH se utilizó el procedimiento descrito por Chiauzzi y col. (1982). Los testículos descapsulados se homogenizaron en Buffer Tris 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.4 y las membranas se obtuvieron tal como se describió anteriormente. El precipitado obtenido se resuspendió en 3 volúmenes de buffer Tris-MgCl<sub>2</sub>. Se realizaron experimentos de saturación en los que se incubaron alícuotas de 100 ul de membranas con 50 ul de <sup>125</sup>I-FSH (300.000 cpm, AE: 26.4 uCi/ug) a temperatura ambiente por 20 horas. La unión inespecífica se determinó en presencia de 10 UI de FSH no marcada. Finalizada la incubación la separación de la hormona unida y libre se realizó tal como se describió para la unión de <sup>125</sup>I-LH.

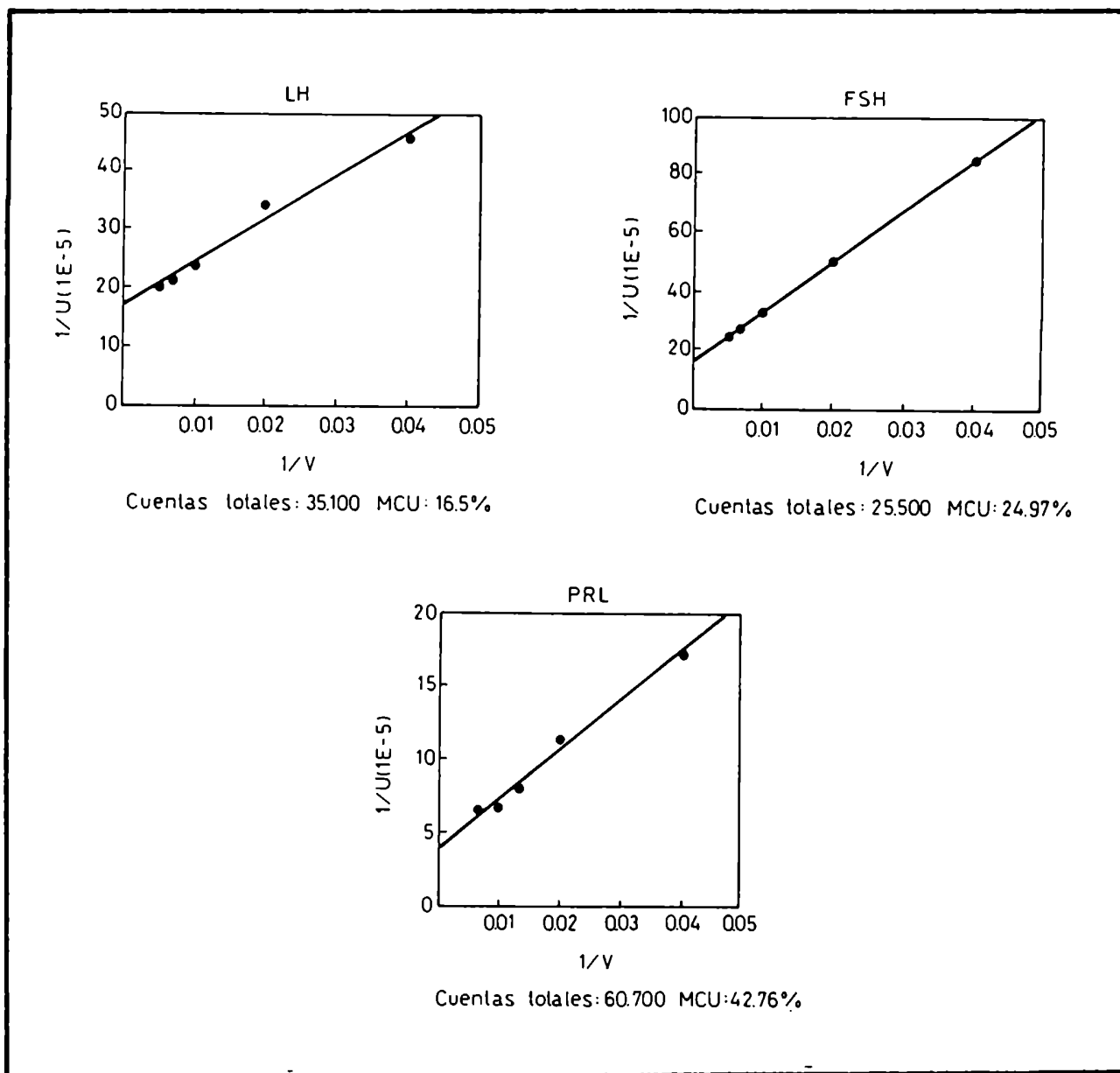
### Determinación de receptores de prolactina

Los receptores testiculares para prolactina se determinaron en las mismas preparaciones de membranas utilizadas para receptor de LH, siguiendo el protocolo experimental descrito por Charreau y col. (1977a). En estas determinaciones se utilizó <sup>125</sup>I-PRL con una actividad específica de 20-50 uCi/ug y

la unión inespecífica se determinó en presencia de 10 ug de prolactina ovina (NIADDK-o PRL-17).

Para determinar el número de sitios receptores y el valor de la constante de afinidad ( $K_a$ ) los datos de los experimentos de saturación se analizaron según el métodos de Scatchard (1949). Para ello se utilizaron programas de computación para una Hewlett Packard HP86, desarrollados en el IByME (Calvo, 1982).

Con el objeto de establecer la máxima capacidad de unión (MCU) de la preparación de hormona radiactiva utilizada, se incubaron diferentes alícuotas de la preparación de membranas (25 -200 ul) de hormona marcada. La unión inespecífica se obtuvo tal como se describió anteriormente. A partir de la ordenada al origen de un gráfico de  $1/(\text{radiactividad específicamente unida})$  versus  $1/(\text{volumen de membranas})$  es posible determinar la fracción de hormona marcada que se uniría a una concentración infinita de receptor (MCU). La Figura 14 muestra los gráficos correspondientes al análisis de MCU para LH, FSH y PRL iodadas .



**Figura 14:** Gráficos  $1/U$  vs  $1/vol$  para el cálculo de máxima capacidad de unión de hormonas proteicas iodadas.

### Determinación de Receptores $\beta$ adrenérgicos:

Los receptores  $\beta$  adrenérgicos se determinaron en suspensiones de células de Leydig purificadas a través de un colchón de metrizamida. El ligando radioactivo utilizado fue el antagonista  $\beta$  adrenérgico [ $^3\text{H}$ ] CGP-12177, (4-(3-t-butilamino-2-hidroxipropoxi)-[5,7- $^3\text{H}$ ] benzimidazole-2-ona) y se siguió la técnica descrita por Anakwe y Moger (1985). El CGP-12177 es un compuesto hidrofílico incapaz de atravesar la membrana y penetrar al interior celular (Hertel y Staehelin, 1983). Esto permite la caracterización de receptores  $\beta$  adrenérgicos en células intactas sin necesidad de utilizar preparaciones de membranas.

Las células de Leydig purificadas se resuspendieron en buffer Hepes (10 mM HEPES, 5 mM glucosa, 145 mM NaCl, 5 mM KCl y 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4) y se incubaron a 34°C durante 60 minutos con concentraciones crecientes de [ $^3\text{H}$ ]-CGP. La unión inespecífica se determinó en presencia de 10  $\mu\text{M}$  dl-propranolol. Finalizada la incubación la reacción se detuvo por dilución con 4 ml de buffer Tris-HCl 170 mM, pH 7,4 y centrifugación a 800 x g durante 10 min. a 4°C. Los "pellets" resultantes se lavaron dos veces con 4,5 ml de buffer Tris-HCl frío y permanecieron durante 16 horas en Protosol para permitir su disolución. Se agregaron luego 10 ml de líquido centellante y la radiactividad unida se cuantificó en un contador de centelleo Beckman.

ESTUDIO HISTOLOGICO DEL TESTICULO: microscopía óptica y electrónica.

Se estudió la morfología testicular en ratas controles y sometidas a desnervación testicular.

Los animales anestesiados con Nembutal (ip, 35 mg/kg) se canularon a través de la aorta abdominal, a la altura de la arteria renal. Se perfundió solución salina para eliminar la sangre circulante y luego solución fijadora (1% paraformaldehído, 4% glutaraldehído, 0.1M cacodilato de sodio, pH 7.2) a una velocidad de 2 ml/ min. Los testículos se disecaron y del polo superior se cortaron bloques pequeños que permanecieron por 2 horas más en el mismo fijador y luego se lavaron 3 veces por 30 min con buffer cacodilato 0.1 M, pH 7.2. Los tejidos se postfijaron en 2% OsO<sub>4</sub> en buffer cacodilato 0.1 M, por 2 horas. Previo lavado en H<sub>2</sub>O se procedió a la deshidratación e inclusión de los tejidos en Epon. Los cortes semifinos se colorearon con azul de toluidina y se analizaron en un microscopio óptico Zeiss, mientras que los cortes ultrafinos se analizaron en un microscopio electrónico, Siemens.

## DETERMINACIONES HORMONALES

### Determinación de andrógenos

Para las determinaciones de andrógenos séricos se colectó sangre truncanal la cual fue centrifugada 10 min a 2000 rpm luego de haber permanecido a temperatura ambiente para la formación del coagulo. Los sueros obtenidos se mantuvieron a -20 C hasta el momento del ensayo.

La determinación de la concentración sérica de testosterona y  $3\alpha$ -diol se realizó según el método utilizado y validado en el laboratorio (Suescun y col, 1985). Alíquotas de 200 ul de los sueros se extrajeron dos veces con 2 ml de éter etílico; los extractos etéreos se evaporaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno, y los residuos se resuspendieron en 800 ul de buffer conteniendo: 40 mM  $\text{HNaPO}_4$ , 35 mM  $\text{H}_2\text{NaPO}_4$ , 0.15 mM NaCl, 0.1 % gelatina y 0.1% azida sódica, pH 7.4. Las determinaciones de las concentraciones de andrógenos en dichas suspensiones se realizó por radioinmunoensayo (RIA), expresándose los resultados en ng/ml. El límite inferior de detección fue de 12.5 pg y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron menores del 12%.

La testosterona y  $3\alpha$ -diol producidos y liberados al medio de incubación se determinaron directamente por RIA, sin previa extracción.



### Determinación de hormonas proteicas

Las concentraciones séricas de LH, FSH y PRL se determinaron por RIA, utilizando una técnica de doble anticuerpo (Lacau de Mengido y col, 1989). Las incubaciones con el primer anticuerpo se realizaron a 4°C durante 24 horas. Se agregó posteriormente la hormona marcada y, luego de 24 horas, el segundo anticuerpo. La hormona libre se separó por centrifugación y aspiración de los sobrenadantes, y se determinó la radiactividad de los precipitados. Los resultados se expresan en ng/ml con respecto a los standards LH RP-2, FSH RP2 y PRL RP3 del NIAMDD Rat Pituitary Distribution Program (EEUU). Los coeficientes de variación intra- e inter ensayo fueron 8.0% y 13.2%; 7.0% y 13.4% y 7.2 y 12.8% para FSH, PRL y LH respectivamente.

### OTROS METODOS

#### Determinación de proteínas

Se realizó por el método de Lowry y col. (1951), utilizando BSA como standard.

### Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se analizaron por el test de Student en el caso de 2 grupos de muestras independientes, y por análisis de varianza y test de Duncan en el caso de más de 2 grupos (Li, 1964).

En el análisis de muestras dependientes se utilizó el test "t" de Student para muestras pareadas.

## RESULTADOS

### INERVACION MONOAMINERGICA TESTICULAR

Con el fin de determinar la distribución y los niveles de monoaminas en el testículo de rata se estudió la localización de las mismas por técnicas histoquímicas y el contenido de monoaminas en cada compartimiento testicular aislado.

Como primera aproximación se examinó la localización de fibras monoaminérgicas testiculares mediante una técnica de histofluorescencia, utilizando animales en diferentes estadios de maduración sexual. Luego en otra serie de experimentos se estudió el contenido de 5-HT en cápsula aislada y parénquima testicular por el método espectrofluorométrico descrito por Curzon y Green (1970). Utilizando una técnica mas sensible, hplc, se analizó la distribución de 5-HT en los siguientes compartimientos aislados de testículos de rata adulta: cápsula, células intersticiales, líquido intersticial y túbulos seminíferos. El contenido de catecolaminas se determinó en los mismos compartimientos aislados utilizando un método radioenzimático (Chiocchio y col, 1984).

#### Identificación de monoaminas por histoquímica de fluorescencia

En el testículo de ratas de 15 días se observaron grupos de células con moderada fluorescencia homogénea verde en los espacios intertubulares (fig. 15 A). En testículos de animales de 40 días se

A



B



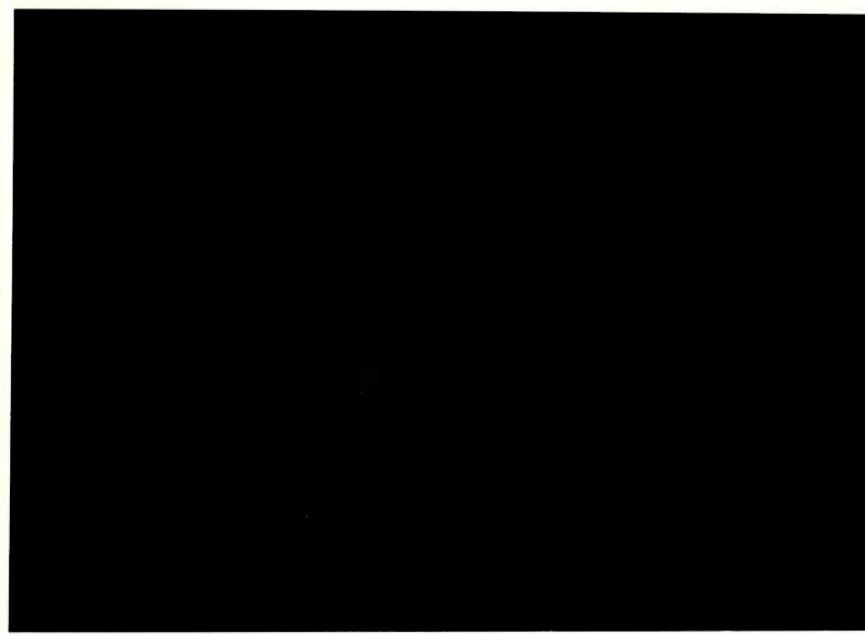
**Figura 15:** Microfotografías de testículos de rata tratados con el método de fluorescencia inducida por ácido glioxílico.

(A) Rata de 15 días: Se observan agrupaciones de células con moderada fluorescencia en los espacios intertubulares. Aumento: 200 x.  
(B) Rata de 40 días: Células intersticiales con gránulos fluorescentes muy intensos. Aumento: 1250 x.

A



B



**Figura 16:** Microfotografías de testículos de rata de 60 días tratados con el método de fluorescencia inducida por ácido glioxílico.

(A): Se observan numerosas fibras fluorescentes en la cápsula testicular. Aumento: 500 x.

(B): Células con gránulos fluorescentes localizadas debajo de la cápsula testicular. Aumento: 1250 x.

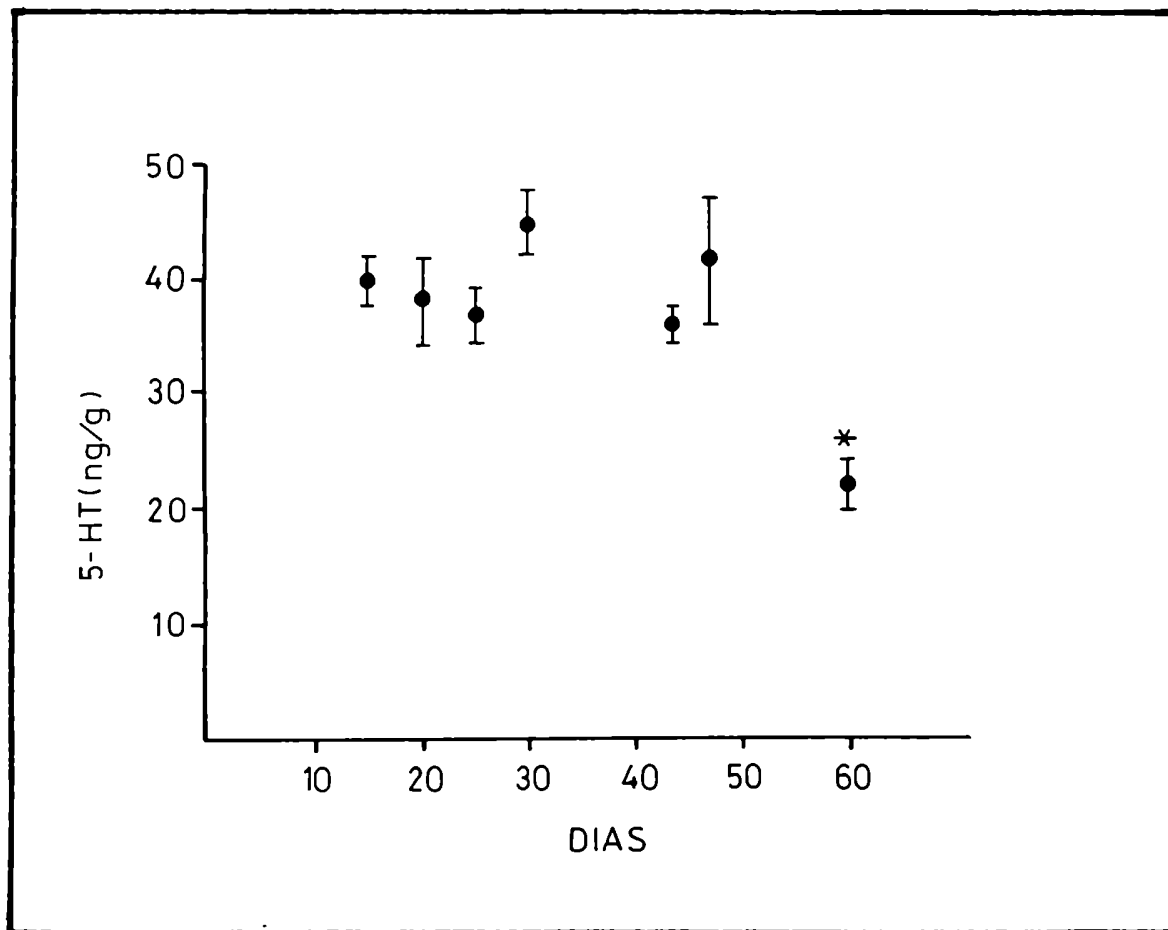
observaron gránulos fluorescentes muy intensos solamente en algunas células intersticiales (fig.15 B).

A los 60 días de edad no se encontraron células fluorescentes en el parénquima testicular. Se observó la presencia de finas fibras fluorescentes recorriendo la cápsula testicular (fig. 16 A). Esta inervación capsular se visualizó también en animales inmaduros. En el parénquima del testículo de la rata adulta se encontraron fibras principalmente alrededor de los vasos sanguíneos que llegan al polo superior del testículo. La mayoría de estas fibras acompañaban el recorrido de los vasos sólo en la zona periférica del testículo y desaparecían a medida que los vasos se internaban en el órgano. No se observaron fibras que penetraran dentro de los túbulos seminíferos ni contactaran con células intersticiales ni aún en la zona cercana a la cápsula. En la membrana basal de los túbulos seminíferos se observaron pequeños cuerpos con fluorescencia amarilla que resultó ser inespecífica, ya que también estaba presente en los controles de la reacción.

Ocasionalmente se hallaron células con gránulos fluorescente muy intensos debajo de la cápsula testicular (fig.16 B).

#### Contenido testicular de 5-HT

Se determinaron los niveles de 5-HT en testículos enteros decapsulados de ratas de distintas edades. Como muestra la



**Figura 17:** Ontogenia del contenido de 5-HT en parénquima testicular

Cada punto representa el promedio  $\pm$  ES de 6 determinaciones individuales. Para cada determinación correspondiente a ratas entre 15 y 30 días se homogenizaron conjuntamente los testículos de 2 o más animales. Las restantes muestras provenían cada una de un único animal.

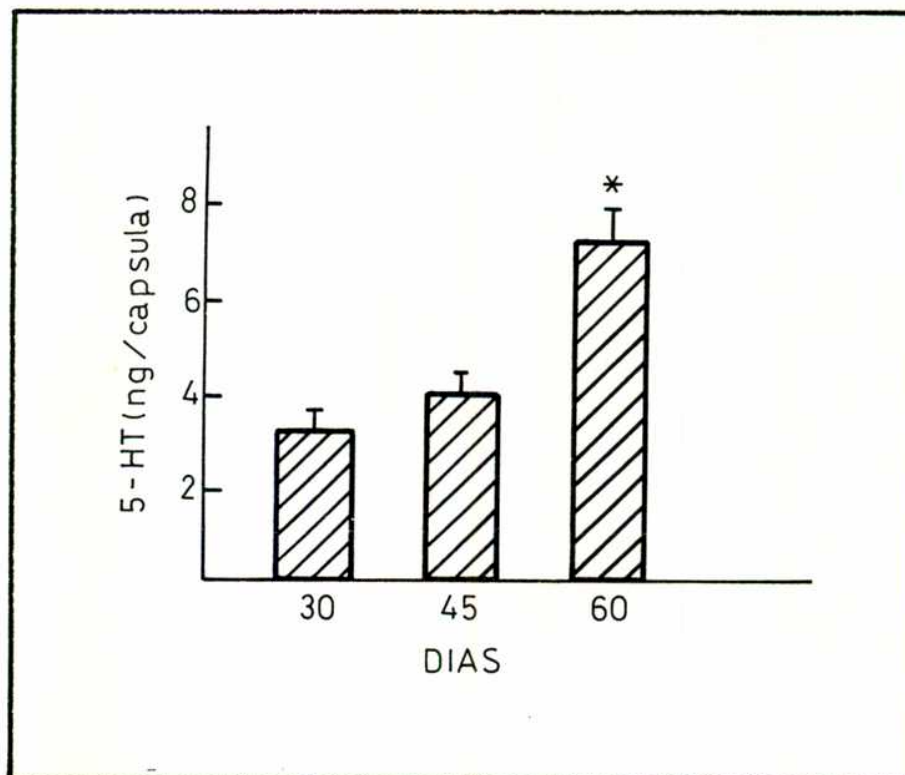


Figura 17 la concentración de 5-HT expresada como ng/g no presenta variaciones significativas entre los 15 y 45 días de edad y disminuye significativamente a los 60 días.

Para la determinación espectrofluorométrica de 5-HT el tejido debe homogeneizarse en n-butanol. Al intentar por esta técnica estudiar el contenido de 5-HT en cápsula aislada, resultó imposible lograr la total homogeneización de este tejido en el mencionado solvente. Luego se determinó el contenido de 5-HT por hplc cápsulas aisladas de animales de diferentes edades. Como muestra la Figura 18 se observaron valores comparables en cápsulas de rata púber y prepúber, mientras que en los animales adultos el contenido de 5-HT es significativamente mayor que en animales de 30 o 45 días ( $p < 0.005$ ).

#### Distribución de 5-HT y catecolaminas en los distintos compartimientos testiculares aislados.

Se estudió el contenido de 5-HT en los distintos compartimientos de rata adulta. Como se muestra en la Tabla 3 esta monoamina está presente no solo en la cápsula testicular sino también en preparaciones de células intersticiales aisladas y en líquido intersticial. En cuanto al sector tubular, este no presenta niveles detectables de 5-HT.



**Figura 18:** Contenido de 5-HT en cápsula testicular aislada.

Los valores representan el promedio  $\pm$  ES de 5 determinaciones individuales. \*  $p < 0,005$  comparado con 30 y con 45 días.

	5-HT	
<b>Cápsula</b> (pmol/cápsula)	40.5 ± 1.9	(10)
<b>Células intersticiales</b> (fmol/10 <sup>6</sup> células)	327.0 ± 23	(5)
<b>Fluido intersticial</b> (pmol/ml)	132 ± 1.6	(5)
<b>Túbulos seminíferos</b> (pmol/mg prot)	ND	(5)

**Tabla 3:** Contenido de 5-HT en los distintos compartimientos testiculares de rata adulta.

Los valores representan el promedio ± ES para el número de determinaciones individuales que se indica entre paréntesis. ND, no detectable

En el líquido intersticial se encontró una concentración de 5-HT en el orden 100 nM y se observó también la presencia de su metabolito, el 5-HIAA.

Como se muestra en la Tabla 4, la cápsula testicular y el líquido intersticial contienen NE y DA ; mientras que en las preparaciones de células intersticiales sólo se halló NE. El sector tubular, en cambio, no presentó niveles detectables de catecolaminas (Tabla 4).

Los valores plasmáticos de monoaminas se muestran en la Tabla 5. Comparando las concentraciones de 5-HT, NE y DA presentes en el líquido intersticial con los respectivos valores plasmáticos se observó que estas son significativamente mayores en el líquido intersticial ( $p < 0.005$ ).

Estudiando la distribución de la 5-HT testicular se encontró una alta concentración de esta indolamina en la cápsula testicular donde se observaron abundantes fibras fluorescentes monoaminérgicas. Estos resultados plantearon la posibilidad de que la 5-HT llegue al testículo a través de nervios.

#### **Presencia de 5-HT en los nervios espermáticos superiores.**

Para estudiar el posible origen neural de la 5-HT testicular se comenzó por analizar en cada una de las ramas que componen el nervio espermático superior, el contenido de monoaminas. Como

	NE	E	DA
<b>Cápsula</b> (pmol/cápsula)	39.1 ± 5.2	ND	0.8 ± 0.1
<b>Cél. intersticiales</b> (fmol/10 <sup>6</sup> cél.)	43.5 ± 9.5	ND	ND
<b>Líquido intersticial</b> (pmol/ml)	46.8 ± 6.6	ND	5.1 ± 0.2
<b>Túbulos seminíferos</b> (pmol/mg prot)	ND	ND	ND

**Tabla 4:** Contenido de catecolaminas en los distintos compartimientos testiculares de rata adulta.

Los valores representan el promedio ± ES de 5 determinaciones individuales. ND: no detectable. Cél: células.

	pmol/ml
NE	24.8 ± 6.5
DA	1.5 ± 0.2
E	51.9 ± 2.7
5-HT	22.7 ± 2.0

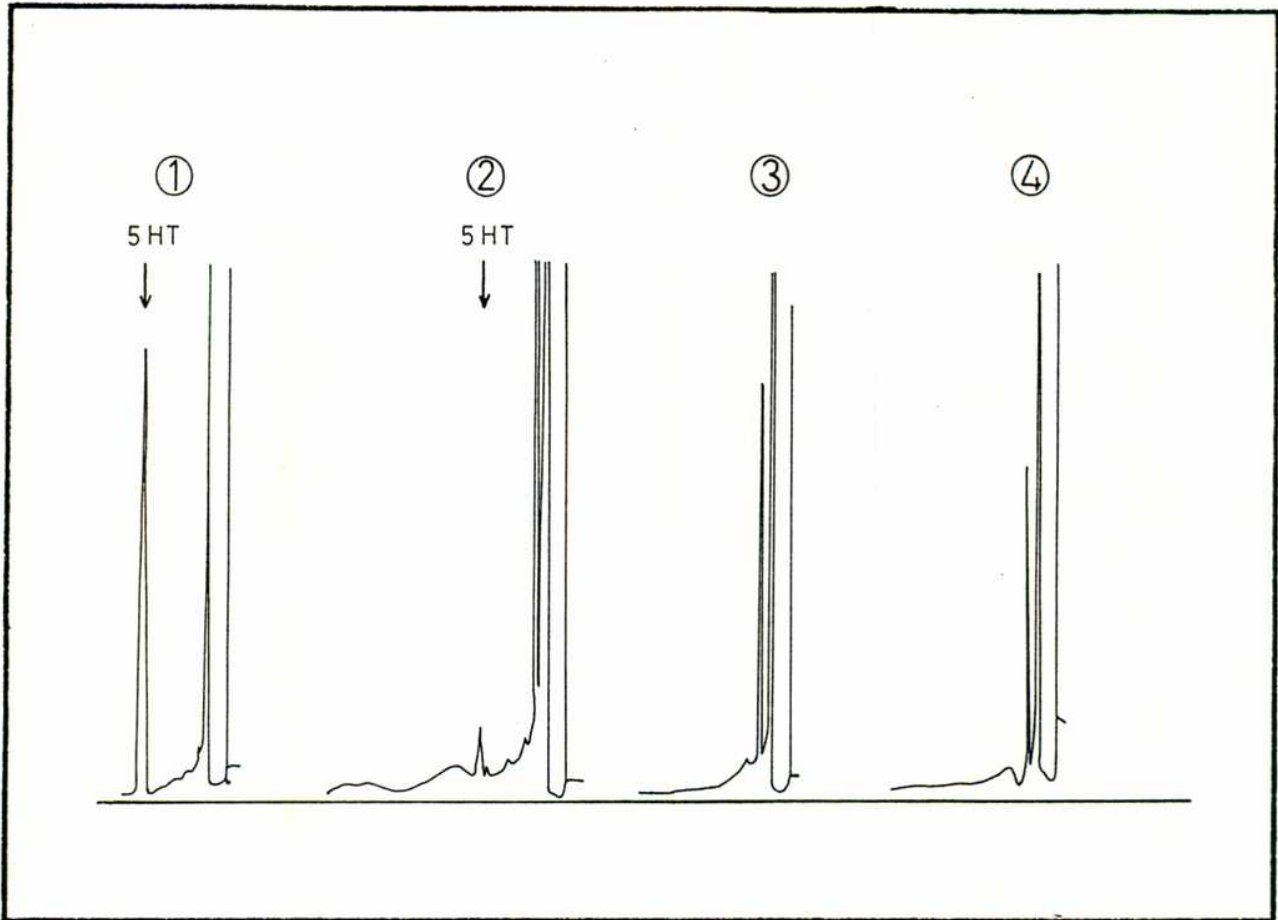
**Tabla 5:** Valores plasmáticos de monoaminas. Los valores representan el promedio ± ES para 5 determinaciones individuales.

muestran los correspondientes cromatogramas (fig. 19), la 5-HT está únicamente presente en las fibras nerviosas que se originan en el plexo renal, las cuales también contienen catecolaminas. Dichas fibras se unen luego a las ramas catecolaminérgicas, siguiendo el recorrido de la arteria testicular y alcanzan al testículo por el polo superior.

#### Efecto de la desnervación sobre el contenido de 5-HT.

A lotes de ratas adultas se les seccionó unilateralmente la rama nerviosa que se origina en el plexo renal (fig 7), evaluándose, una semana más tarde, el efecto de esta desnervación específica sobre el contenido testicular de 5-HT.

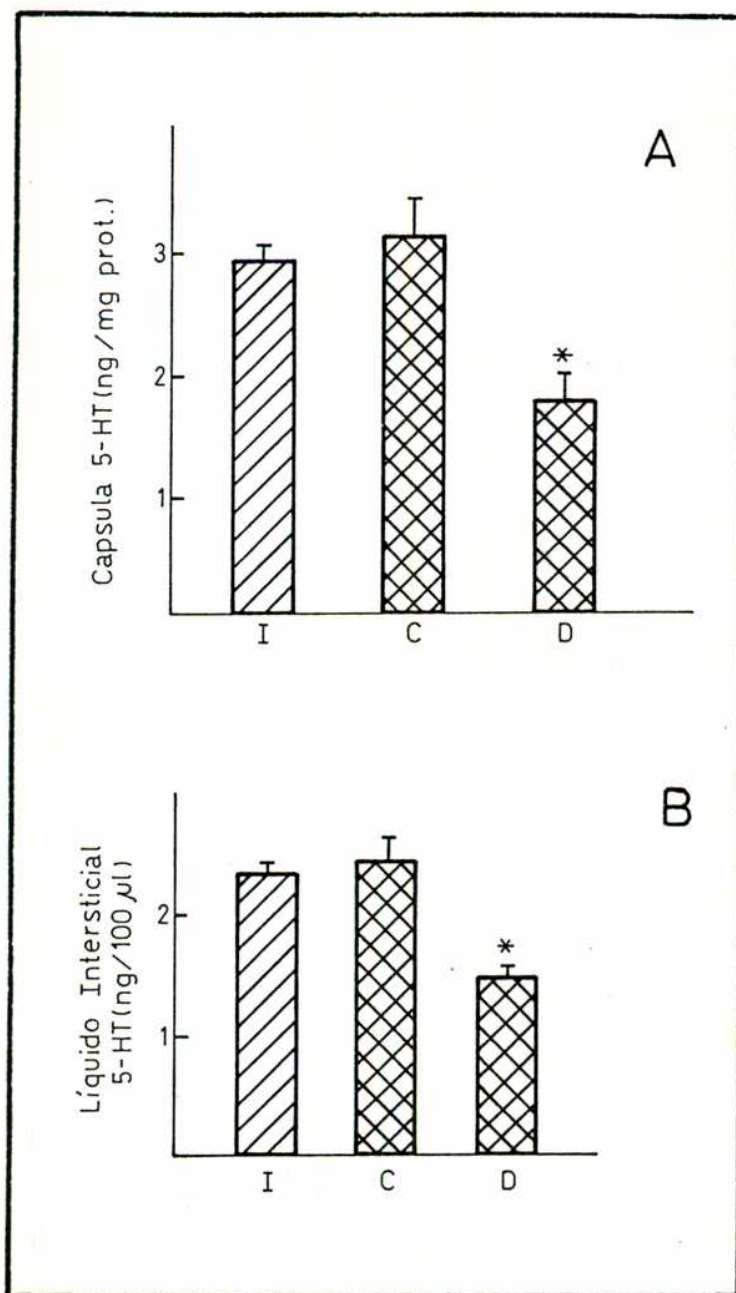
Como muestra la Figura 20 la desnervación realizada determinó una disminución significativa en el contenido de 5-HT en cápsula y líquido intersticial del testículo ipsilateral, indicando que las fibras que se originan en el plexo renal podrían proveer 5-HT al testículo. Los niveles de 5-HT en el testículo contralateral a la desnervación no se modificaron respecto de los valores hallados en animales intactos.



**Figura 19:** Cromatogramas correspondientes a los nervios espermáticos superiores.

(1) standard de 5-HT; (2) nervio originado en el plexo renal; (3) y (4) nervios originados en el plexo intermesentérico.





**Figura 20:** Efecto de la sección de la rama del nervio espermático superior que se origina en el plexo renal sobre el contenido de 5-HT en cápsula testicular (A) y líquido intersticial (B).

I: testículos de animales intactos; D: testículo desnervado, C: testículo control, contralateral a la desnervación. Los valores representan el promedio  $\pm$  ES de 5 determinaciones

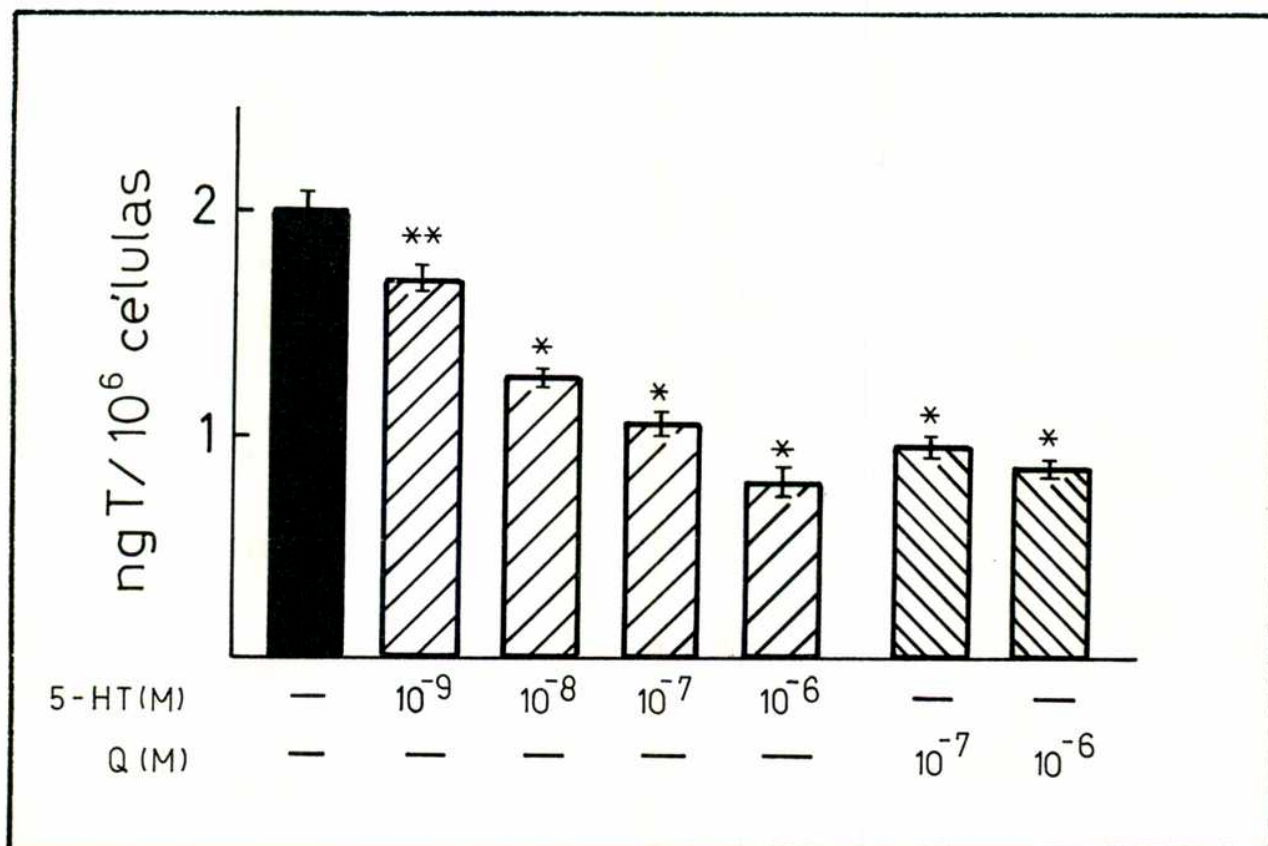
\*  $p < 0.01$ .

EFEECTO DE 5-HT SOBRE LA PRODUCCION DE ANDROGENOS in vitro.

Se incubaron suspensiones de células intersticiales o células de Leydig purificadas en presencia de concentraciones crecientes de 5-HT. La Figura 21 muestra el efecto de la 5-HT sobre la producción basal de testosterona por suspensiones de células intersticiales de ratas adultas. Se observó un efecto inhibitorio, dosis dependiente, que resultó significativo a partir de  $10^{-9}$  M ( $p < 0.025$ ). El agonista serotoninérgico quipazine inhibió la producción de andrógenos de manera similar a 5-HT.

Utilizando preparaciones de células de Leydig purificadas se confirmó el efecto inhibitorio de la 5-HT sobre la producción basal de testosterona (fig. 22). Por otro lado, en este mismo sistema se observó que la 5-HT inhibe de manera dosis dependiente la producción del andrógeno estimulada por 10 mU de hCG (fig. 20).

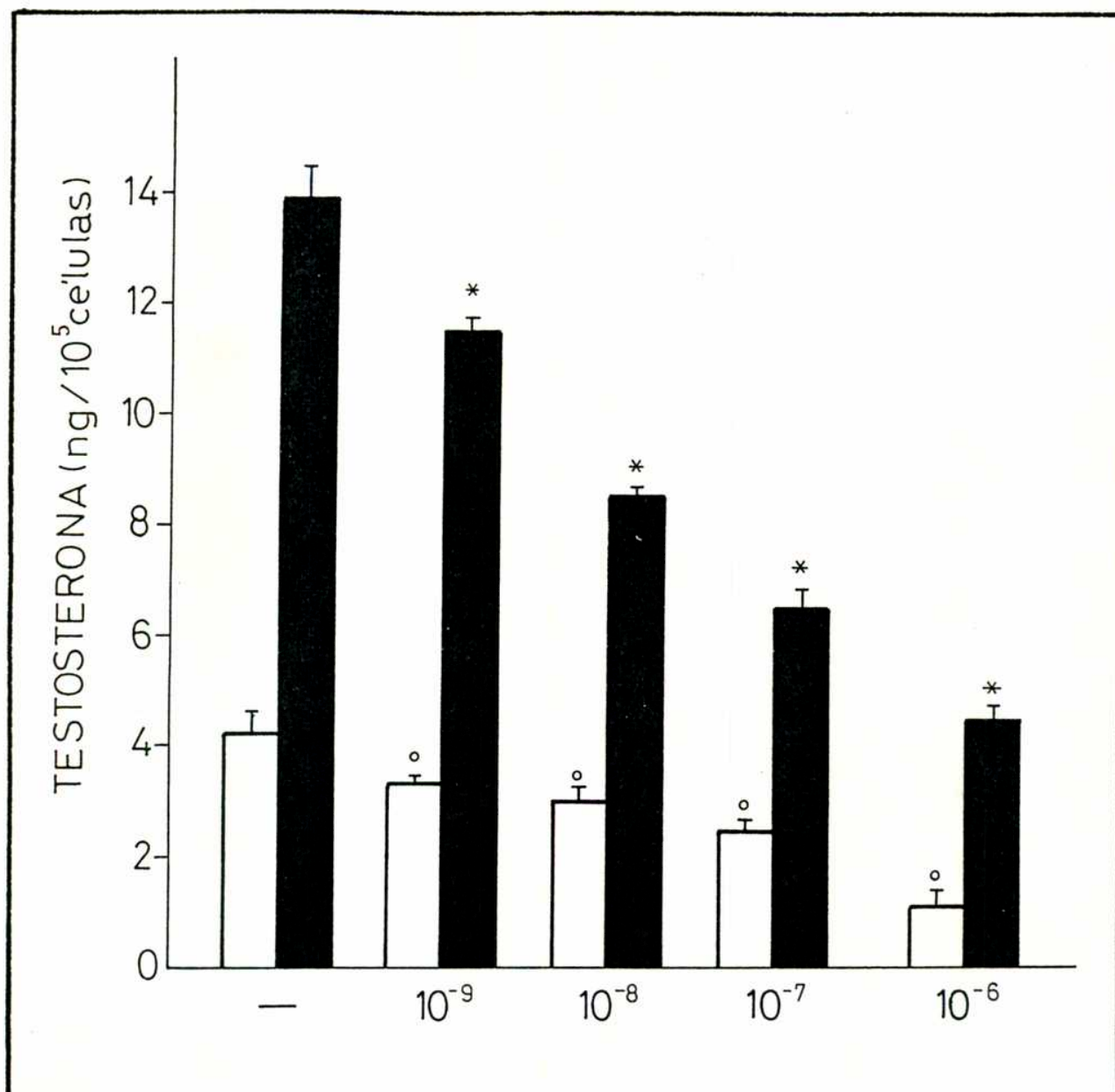
En el caso de incubar las células de Leydig con  $10^{-7}$  M de 5-HT y cantidades crecientes de gonadotrofina, se observó que la presencia de la indolamina determina una caída en la producción de andrógenos estimulada por hCG (fig. 23). Con dosis supramáximas de gonadotrofinas no se alcanzó la misma respuesta que en los controles, sugiriendo la existencia de una lesión en el camino biosintético de esteroides.



**Figura 21:** Efecto de 5-HT y quipazine (Q) sobre la producción de testosterona "in vitro" por suspensiones de células intersticiales aisladas.

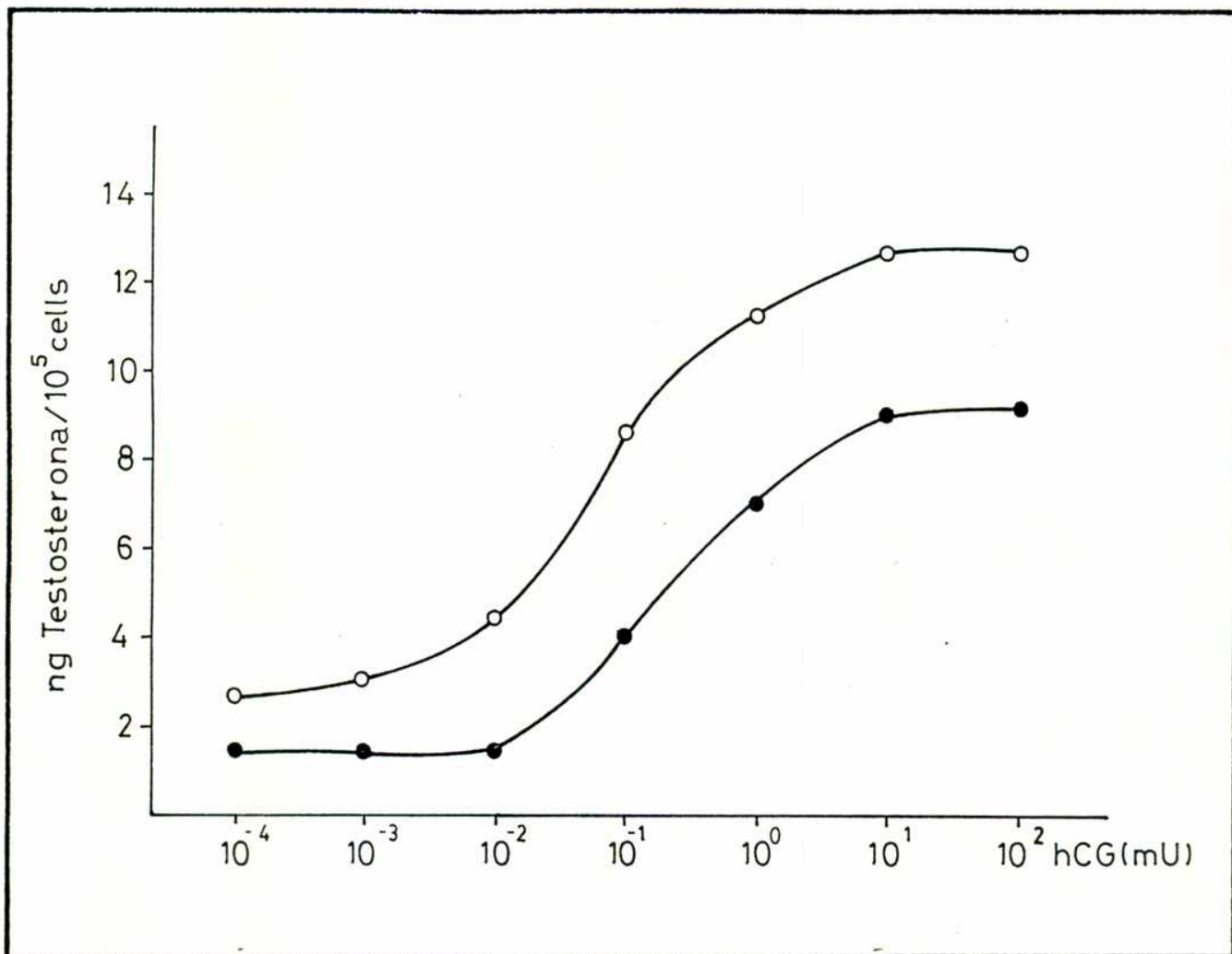
Los valores corresponden al promedio  $\pm$  ES de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo.

\*\*  $p < 0.025$  y \*  $P < 0.005$  respecto del valor basal.



**Figura 22:** Efecto de 5-HT sobre la producción de testosterona basal y estimulada por hCG, por suspensiones de células de Leydig purificadas.

Los valores corresponden al promedio  $\pm$  ES de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo. <sup>o</sup>  $p < 0.01$  y \*  $p < 0.001$  respecto de la producción en ausencia de 5-HT.



**Figura 23:** Efecto de 5-HT sobre la producción de testosterona por células de Leydig estimuladas por dosis crecientes de hCG.

Los valores representan el promedio de incubaciones realizadas por triplicado, de un experimento representativo. o: control, ●: 5-HT, 10<sup>-7</sup> M.

<u>% células viables</u>	
<u>Tiempo 0</u>	93
<u>1h 30 min.</u>	
Control	88
5-HT $10^{-5}$ M	87
<u>3 horas</u>	
Control	80
5-HT $10^{-8}$	87
5-HT $10^{-7}$	82
5-HT $10^{-6}$	86

**Tabla 6:** Porcentaje de células viables a distintos tiempos de incubación en presencia de 5-HT.

Los valores representan el porcentaje promedio de células viables obtenido para 4 determinaciones individuales. No se observan diferencias significativas dentro de un mismo tiempo de incubación.

Se estudió si la presencia de 5-HT en el medio afectaba el porcentaje de células viables a lo largo de la incubación. Como se muestra en la Tabla 6 la presencia de 5-HT no modificó el porcentaje de células vivas en la suspensión a distintos tiempos de incubación. La leve disminución en el porcentaje de células viables que se observa a lo largo de la incubación es de la misma magnitud en presencia o ausencia de 5-HT. Estos resultados permiten descartar un efecto letal de 5-HT sobre las células intersticiales.

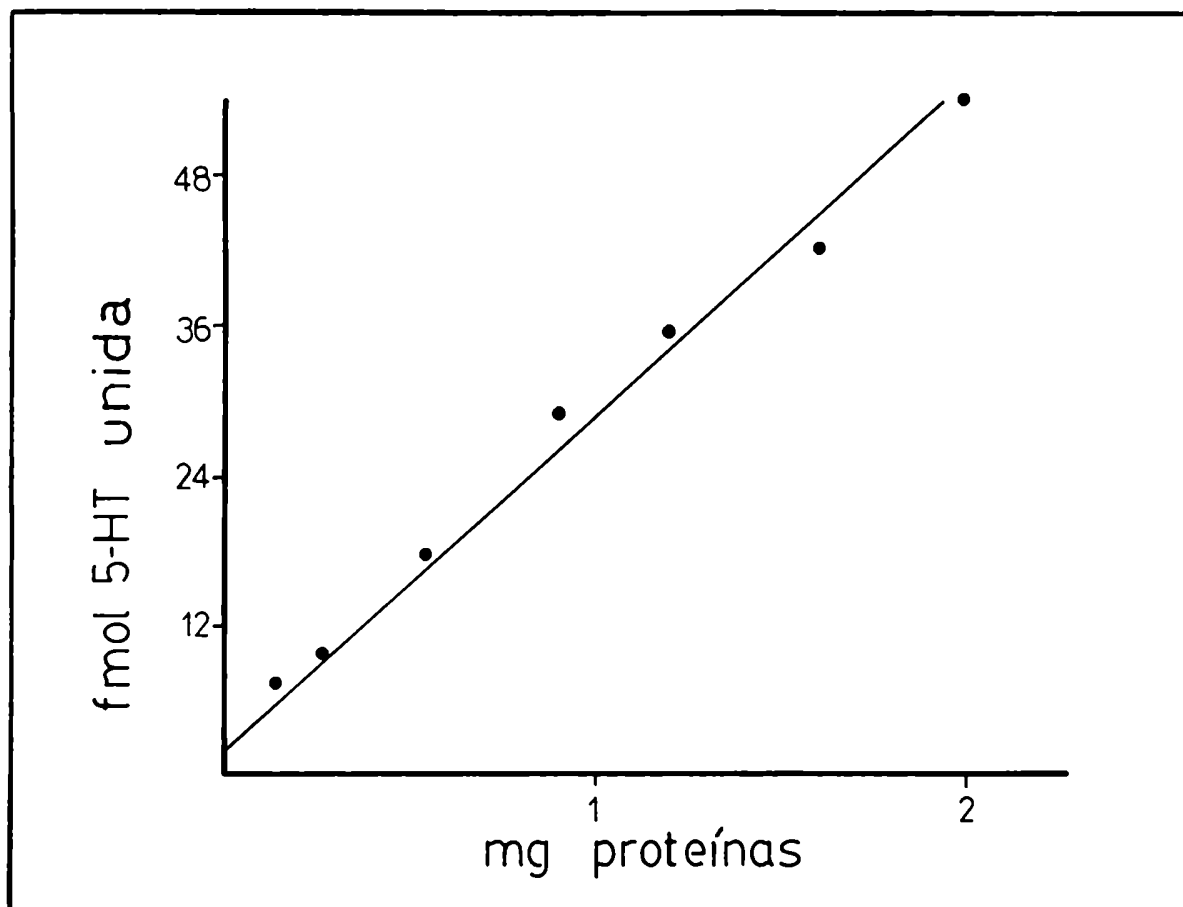
### RECEPTORES SEROTONINERGICOS TESTICULARES

#### Estudio de la unión de $^3\text{H}$ -5-HT a membranas testiculares

Para determinar si el efecto inhibitorio de la 5-HT sobre la producción in vitro de andrógenos esta mediado por sitios receptores específicos, se estudió la asociación de  $^3\text{H}$ -5-HT a preparaciones de membranas testiculares.

Como muestra la Figura 24, la cantidad de  $^3\text{H}$ -5-HT específicamente unida resultó lineal con la concentración de proteínas presentes en la incubación (0.1 a 2 mg). Luego se determinó el tiempo de asociación de la  $^3\text{H}$ -5-HT a sus sitios de unión, observándose que a los 30 minutos de incubación a 22°C se alcanzó el equilibrio. El valor de  $^3\text{H}$ -5-HT específicamente unida se mantuvo constante hasta los 90 minutos de incubación. A tiempos mayores se observó una disminución en la unión específica probablemente debido a la degra-

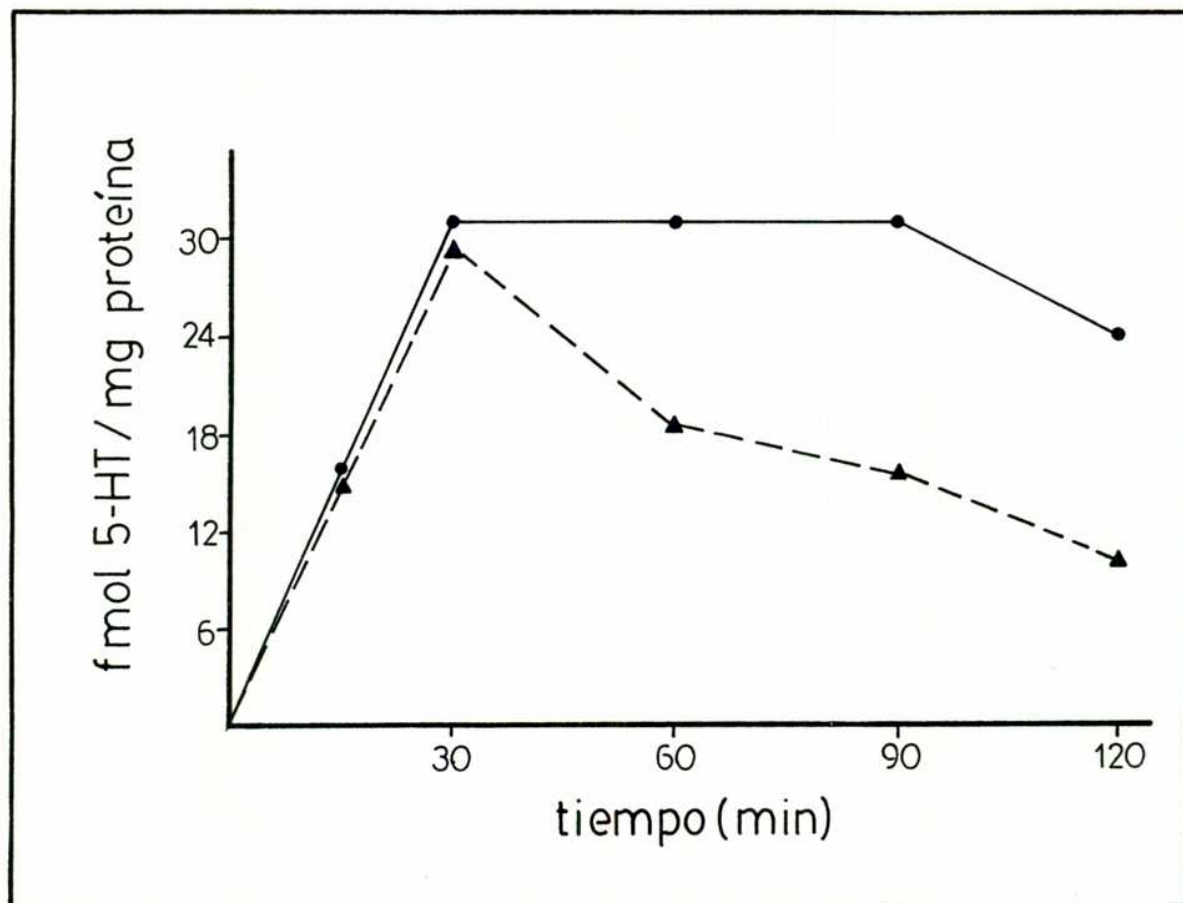




**Figura 24:** Unión de  $^3\text{H}$ -5-HT a membranas testiculares: linealidad con la cantidad de proteína.

Los valores representan la unión específica observada al incubar por triplicado concentraciones crecientes de membranas testiculares con  $^3\text{H}$ -5-HT.





**Figura 25:** Unión de  $^3\text{H}$ -5-HT a membranas testiculares: curva de tiempo.

Los valores representan la unión específica observada al incubar membranas testiculares por distintos tiempos en presencia de 3 nM  $^3\text{H}$ -5-HT. ● : incubación en presencia de 0.05% Acido ascórbico; ▲ : incubación en ausencia de ácido ascórbico.

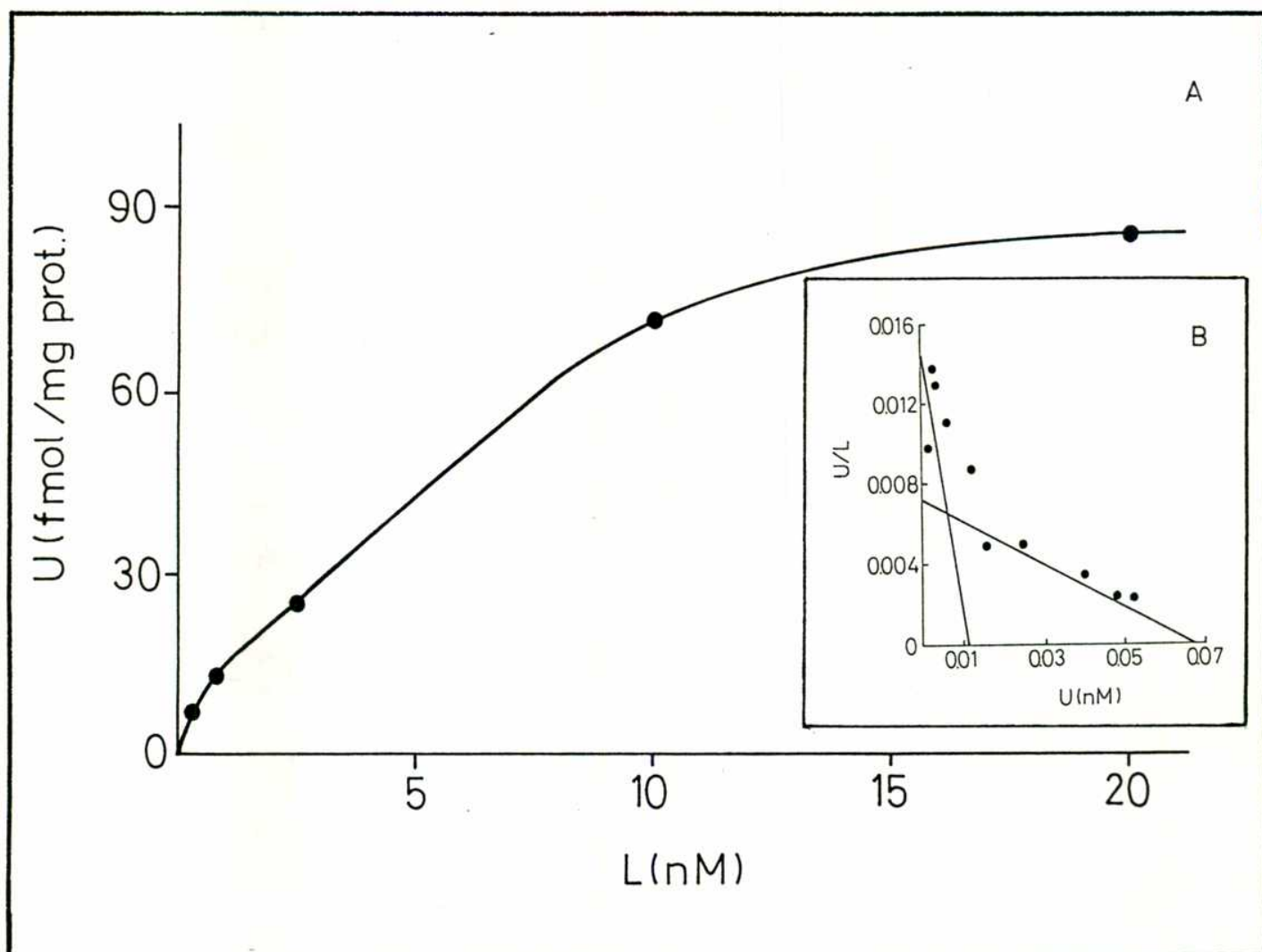
dación del ligando radiactivo que es fotosensible y fácilmente oxidable. El buffer de incubación contenía 0.05% (P/V) de ácido ascórbico, sin el cual el proceso de degradación se evidencia más rápidamente y no se observó la meseta en la curva de asociación (fig. 25).

Para estudiar la saturabilidad de la unión, las membranas se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de 3H-5-HT, determinándose la unión inespecífica en incubaciones paralelas conteniendo 1000 excesos de 5-HT no radiactiva.

El análisis de los datos según el método de Scatchard (fig. 26) mostró la existencia de dos poblaciones diferentes de sitios de unión para  $^3\text{H}$ -5-HT en membranas de testículo total. El sitio de mayor afinidad presentó una  $K_d$  de  $1.03 \pm 0.40$  nM y una capacidad de  $13.11 \pm 0.92$  fmol/mg de proteína, mientras que el segundo sitio se caracteriza por tener una menor afinidad ( $K_d$   $17.16 \pm 1.12$  nM) y una mayor capacidad ( $78.17 \pm 5.40$  fmol/mg proteína).

#### Estudio de la unión de $^3\text{H}$ -5-HT a membranas de células intersticiales

Teniendo en cuenta el efecto inhibitorio de 5-HT sobre la producción de andrógenos se decidió estudiar la posible localización de estos sitios de unión en las células esteroideogénicas. Para ello, se prepararon membranas a partir de células intersticia-



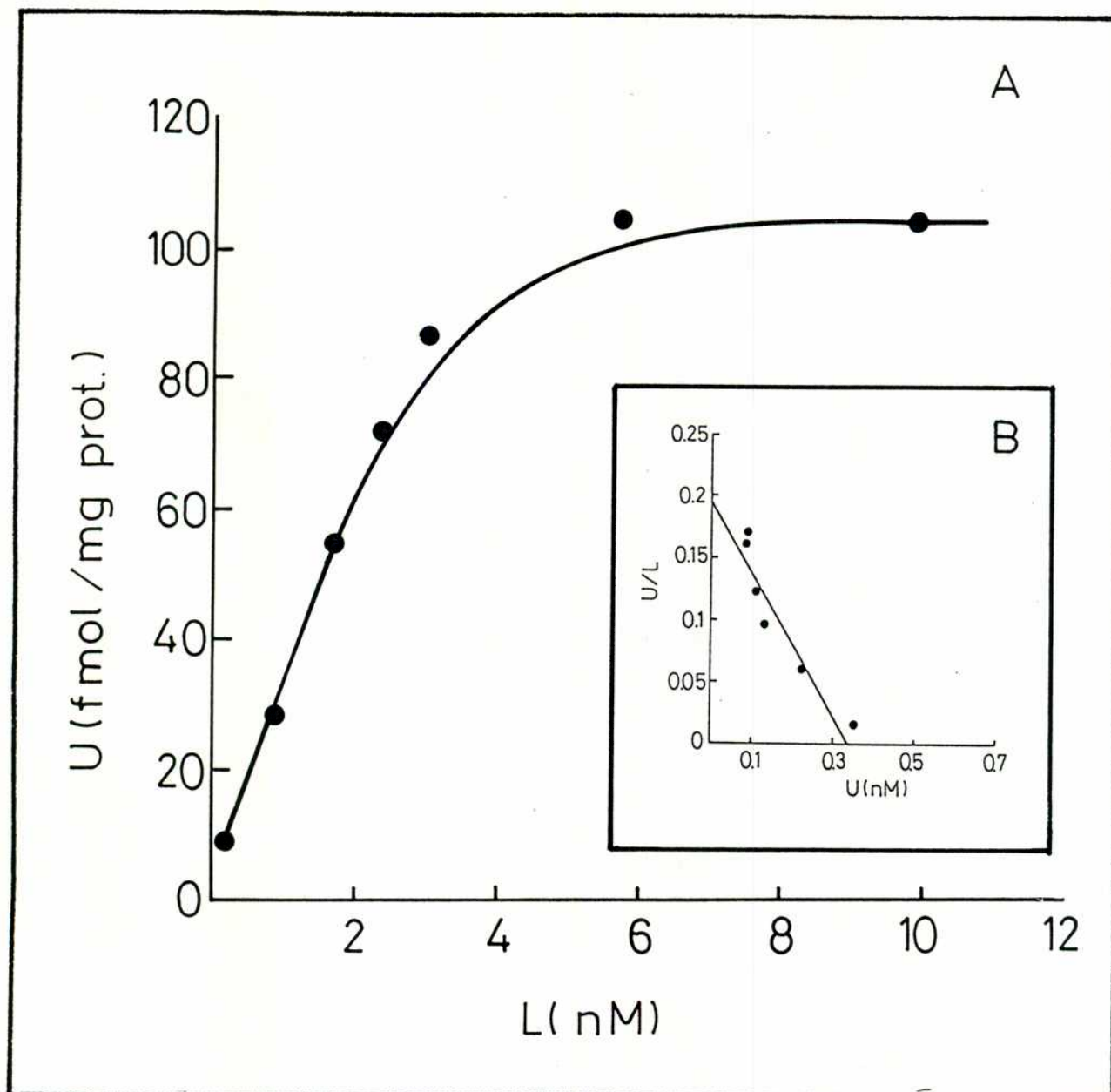
**Figura 26: Unión de  $^3\text{H}$ -5-HT a membranas testiculares: (A) curva de saturación, (B) gráfico de Scatchard.**

Las membranas testiculares se incubaron con concentraciones crecientes de  $^3\text{H}$ -5-HT, determinándose la unión inespecífica en presencia de 5-HT no marcada. La figura muestra los resultados de un experimento representativo.

les y se determinaron las condiciones experimentales para el análisis de la unión de  $^3\text{H}$ -5-HT en ese nuevo sistema. Se observó que la asociación de la  $^3\text{H}$ -5-HT a membranas de células intersticiales alcanza el equilibrio luego de 60 minutos de incubación a  $22^\circ\text{C}$ . La cantidad de  $^3\text{H}$ -5-HT específicamente unida resultó lineal con la concentración de proteínas presentes en la incubación.

Como muestra la Figura 27, la unión de  $^3\text{H}$ -5-HT a membranas de células intersticiales es saturable y el análisis de los datos demuestra que dichas células poseen una población de sitios receptores serotoninérgicos de alta afinidad ( $K_d: 1.78 \pm 0.31 \text{ nM}$ ,  $n=3$ ). La concentración de receptores hallada en las preparaciones de células intersticiales ( $128.4 \pm 16.1 \text{ fmol/mg prot}$ ,  $n=3$ ) aumentó respecto de la hallada en testículo entero, sugiriendo que la 5-HT se uniría preferentemente al tejido intersticial.

Se estudió luego la capacidad de diversas drogas agonistas y antagonistas serotoninérgicas para desplazar la  $^3\text{H}$ -5-HT unida a membranas de células intersticiales, observándose el siguiente orden de potencia: ketanserina > ciproheptadine > metiotepin > metisergida > 5-HT > quipazine. El agonista del receptor  $5\text{-HT}_1$ , 8-OH DPAT, no produjo un desplazamiento significativo de la unión,



**Figura 27:** Unión de  $^3\text{H}$ -5-HT a membranas de células intersticiales: (A) Curva de saturación, (B) gráfico de Scatchard.

Las membranas incubaron con concentraciones crecientes de  $^3\text{H}$ -5-HT, determinándose la unión inespecífica en presencia de 5-HT no marcada. La figura muestra los resultados de un experimento representativo.

aún a concentraciones milimolares. El hecho de que antagonistas del receptor 5-HT<sub>2</sub> tales como ketanserina, ciproheptadine y metiotepin desplacen la unión del radioligando con mayor eficiencia que la misma 5-HT sugieren que las células intersticiales poseen receptores serotoninérgicos tipo 2.

#### EFECTO DE LA SECCION DEL NERVIO ESPERMATICO SUPERIOR SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS TESTICULAR.

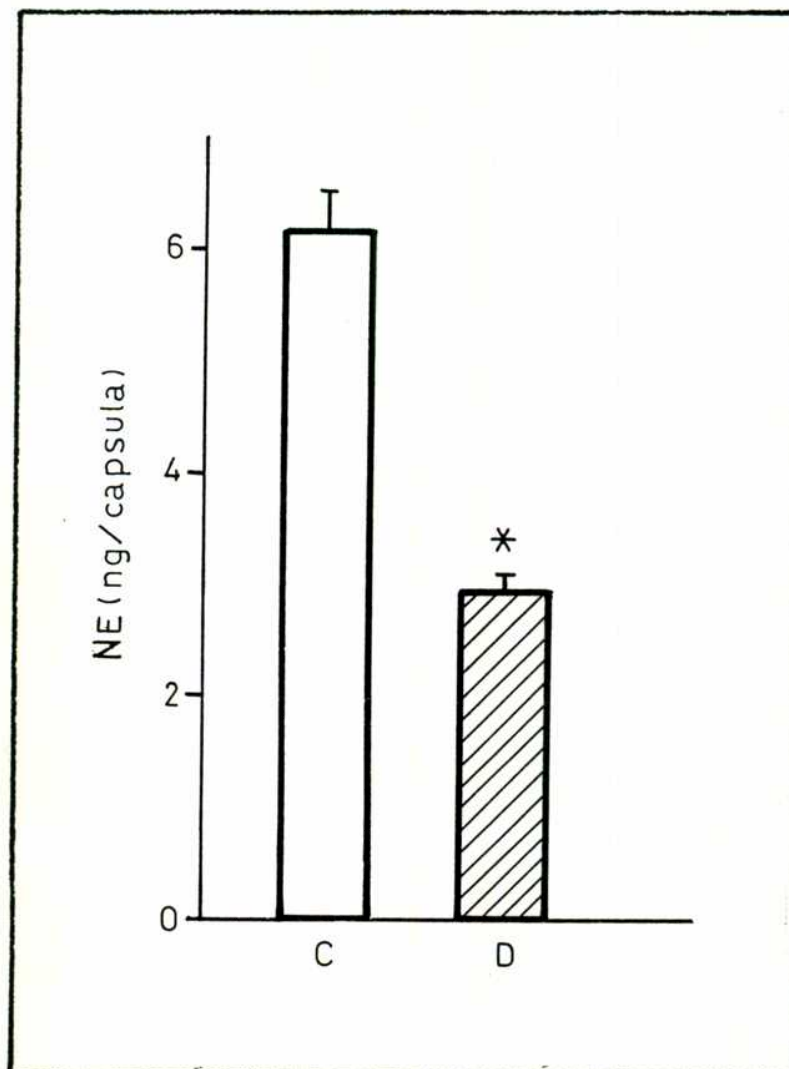
Con el fin de determinar en que medida la inervación monoaminérgica del testículo participa en la regulación testicular se estudió el efecto de la sección del nervio espermático superior sobre la actividad endócrina testicular.

#### Efecto de la desnervación testicular en rata adulta

En una primera serie de experimentos se utilizaron ratas de 60 días de edad sometidas a desnervación testicular unilateral, utilizándose el testículo contralateral como control.

Para evaluar la eficiencia de la desnervación se determinó el contenido de NE en la cápsula testicular. En la Figura 28 se observa que la sección del nervio espermático superior causó una caída promedio del 52% en la concentración de NE.

Diez días después de la desnervación quirúrgica, no se obser-



**Figura 28:** Efecto de la deservación sobre el contenido de norepinefrina en cápsula testicular de ratas adultas.

C: testículo control; D: testículo deservado. Los valores representan el promedio  $\pm$  ES de 10 determinaciones individuales.

\*  $p < 0.01$  con respecto al control.

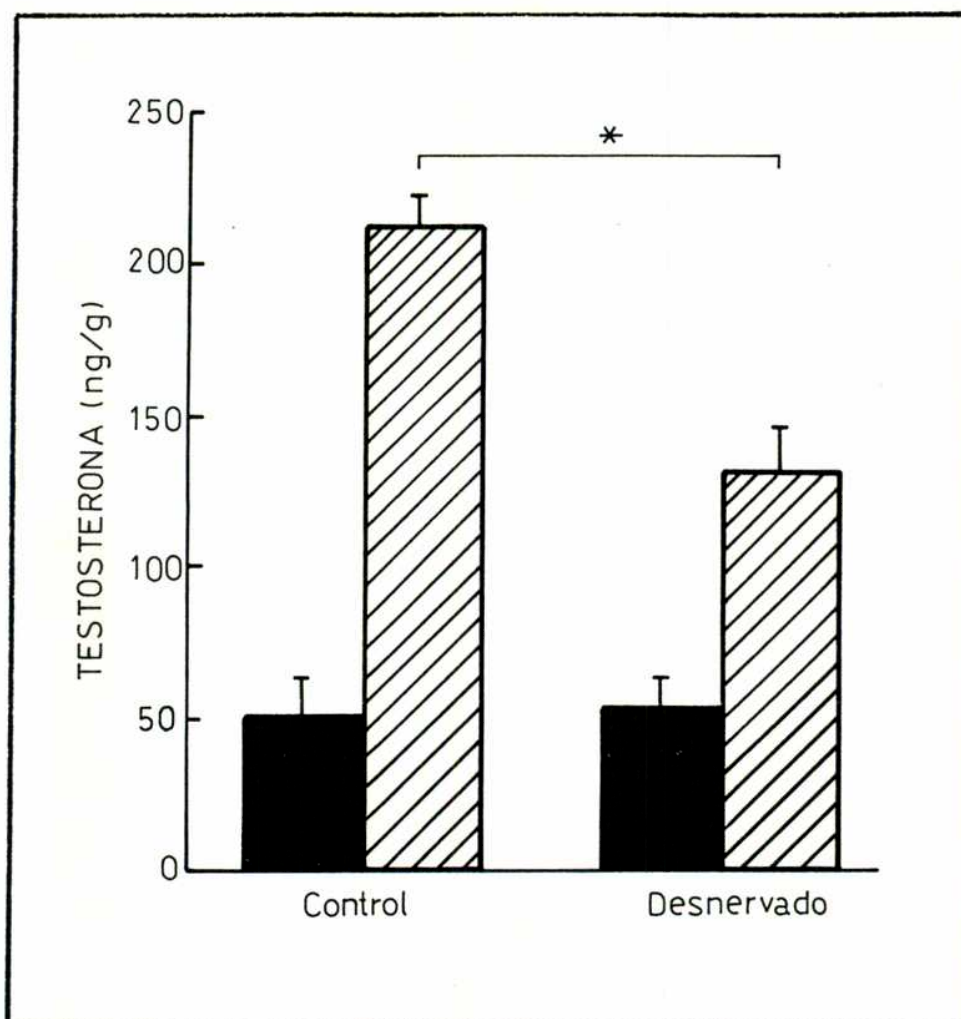
varon cambios en el peso testicular, (controles:  $1.81 \pm 0.05$  g, desnervados:  $1.78 \pm 0.04$  g, n=18) ni en los niveles séricos de testosterona (controles:  $3.85 \pm 0.12$  ng/ml; desnervados:  $4.14 \pm 0.30$  ng/ml, n=7).

### Producción "in vitro" de andrógenos

Se evaluó la producción in vitro de testosterona por testículos enteros descapsulados en condiciones basales y en respuesta a una dosis máxima de hCG (100 mUI). Como muestra la Figura 29 no se observaron diferencias en la producción basal de testosterona, mientras que la respuesta a la hCG resultó significativamente inferior en los testículos desnervados.

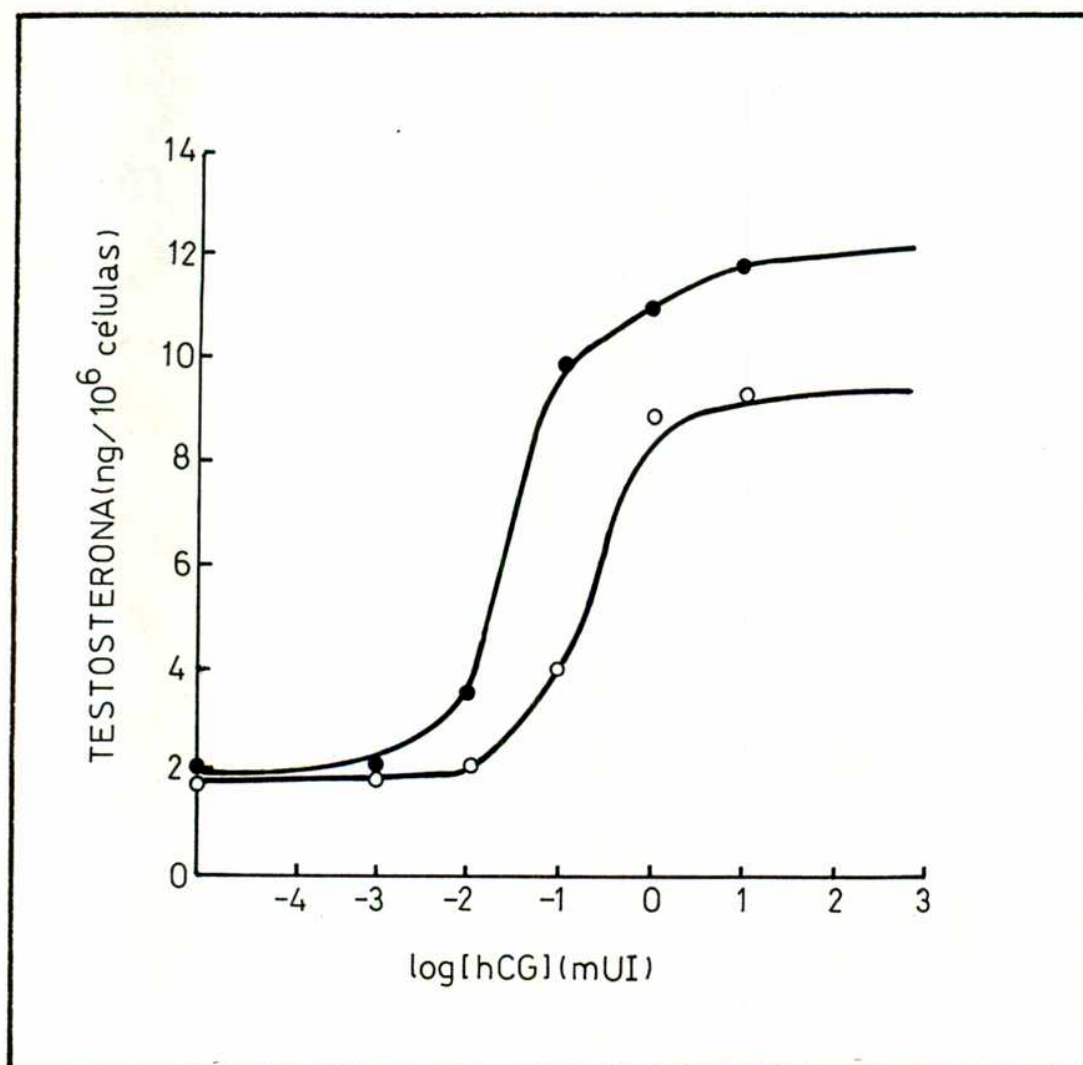
Se analizó luego si la desnervación afecta la sensibilidad con que las células intersticiales responden a concentraciones crecientes de gonadotrofina. Con tal fin se prepararon, a partir de cada animal, dos suspensiones de células intersticiales mediante la colagenización individual del testículo desnervado y del control, las cuales fueron incubadas durante 3 horas en presencia de diferentes concentraciones de hCG. La producción de testosterona por células intersticiales aisladas (fig. 30) es compatible con los resultados obtenidos al incubar testículo entero, en lo que respecta a la producción basal y la respuesta a una dosis máxima de hCG. El análisis de estas curvas indica además que las células intersticiales de testículos desnervados responden con menor





**Figura 29:** Producción in vitro de testosterona por testículos enteros descapsulados, controles y desnervados.

■ : basal, ▨ : 100 mUI de hCG. Los valores representan el promedio de 6 incubaciones individuales  $\pm$  ES. \*  $p < 0.01$



**Figura 30:** Producción de testosterona por células intersticiales de testículos controles y desnervados en respuesta a concentraciones crecientes de hCG.

● : control; ○ : desnervado. Los valores representan el promedio de incubaciones realizadas por triplicado, de un animal representativo de 6 estudiados.

sensibilidad a la gonadotrofina.

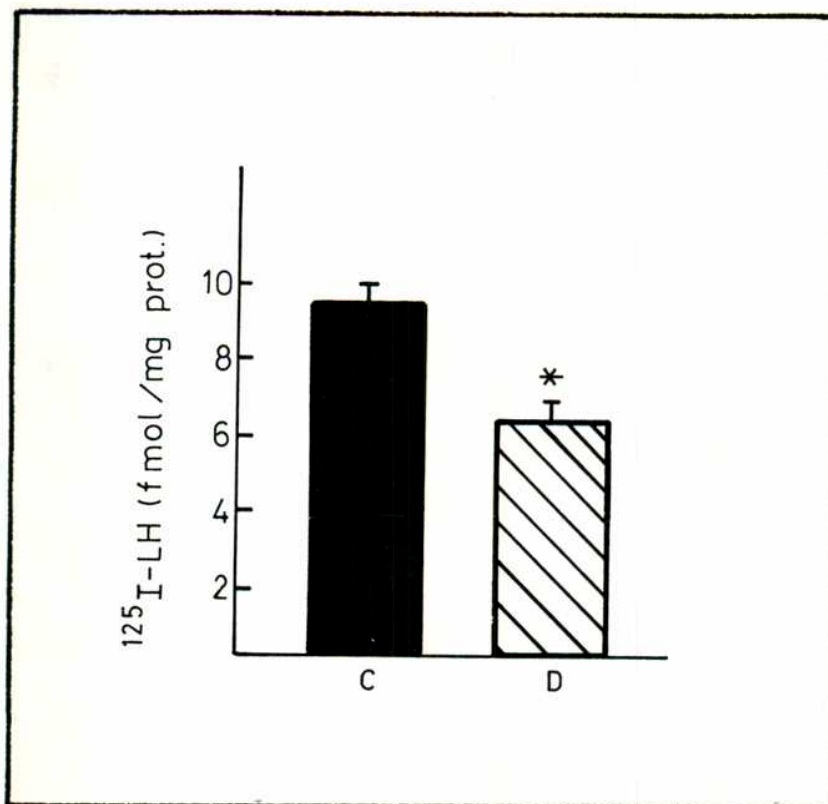
### Receptores testiculares para gonadotrofinas y prolactina.

Teniendo en cuenta el cambio inducido por la desnervación sobre la respuesta esteroideogénica a hCG se decidió estudiar posibles alteraciones en los receptores testiculares para LH. Al evaluar la asociación de concentraciones saturantes de  $^{125}\text{I}$ -LH a membranas testiculares se observó una caída significativa ( $p < 0.001$ ) en la concentración de gonadotrofina específicamente unida a membranas de testículos desnervados (fig. 31).

Se analizó luego posibles cambios en la afinidad de la unión de la LH a su receptor inducidos por la desnervación, incubando las membranas en presencia de concentraciones crecientes de  $^{125}\text{I}$ -LH.

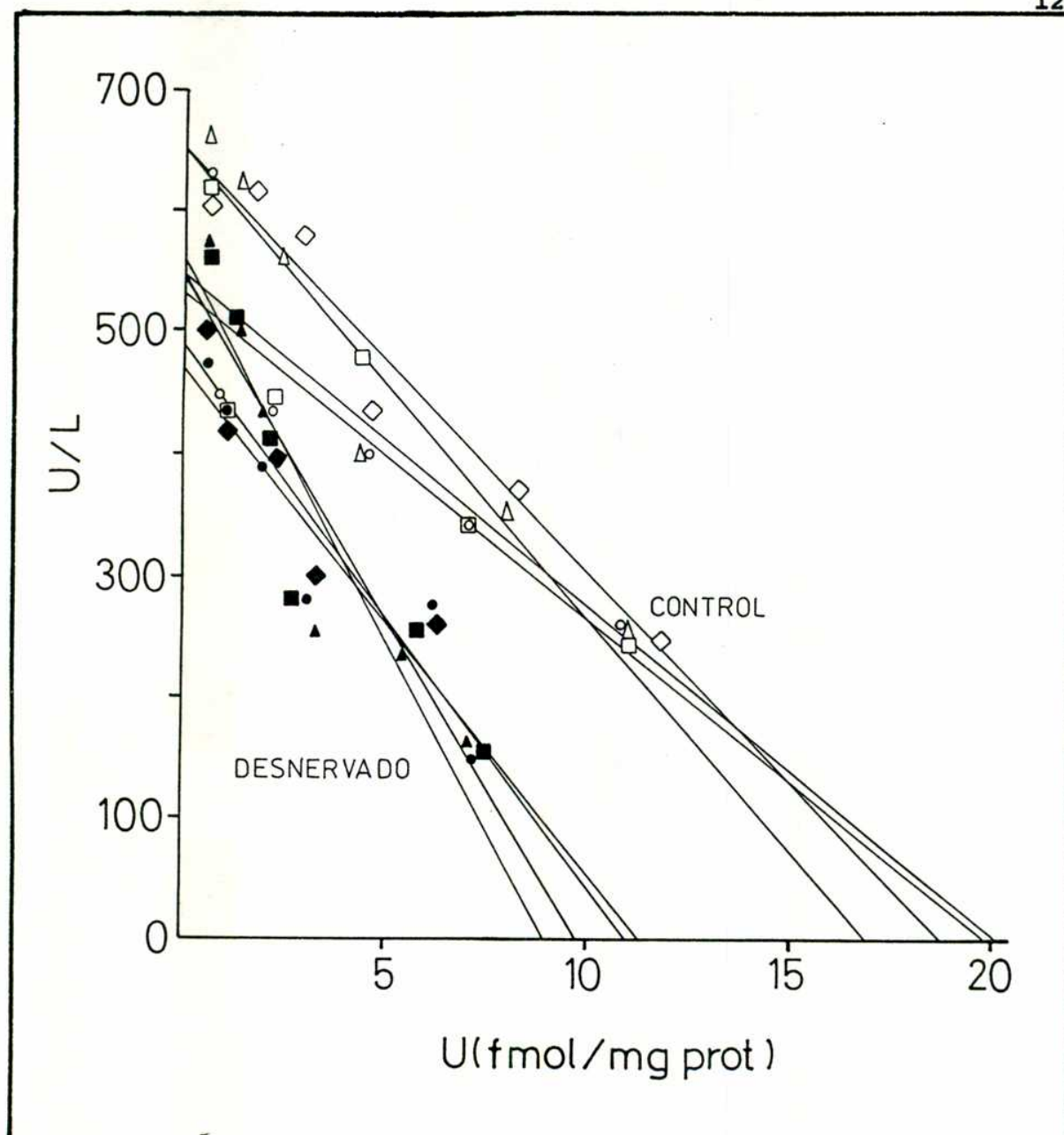
El análisis de los datos según el método de Scatchard (1949) (fig. 32) indicó que la disminución en el número de receptores de LH en el testículo desnervado fue de un 40.7% respecto de los controles (controles:  $17.91 \pm 1.17$  fmol/mg prot; desnervados  $10.35 \pm 0.83$  fmol/mg prot,  $n=12$   $p < 0.0005$ ), y no se observaron modificaciones significativas en la constante de disociación (controles:  $0.029 \pm 0.003$  nM, desnervados:  $0.023 \pm 0.005$ ,  $n= 12$ ).

En los últimos años, se ha observado una inusual asimetría en la respuesta testicular a la hemicastración (Frankel y col, 1989), la cual parecería estar regulada en parte por la inervación adrenérgica del testículo (Frankel y col, 1984; Moger y Anakwe, 1986).



**Figura 31:** Unión de  $^{125}\text{I-LH}$  a membranas testiculares.

Las membranas testiculares se incubaron en presencia de concentraciones saturantes de  $^{125}\text{I-LH}$ . Los valores representan el promedio  $\pm$  ES de 6 determinaciones.  $p < 0.001$ .

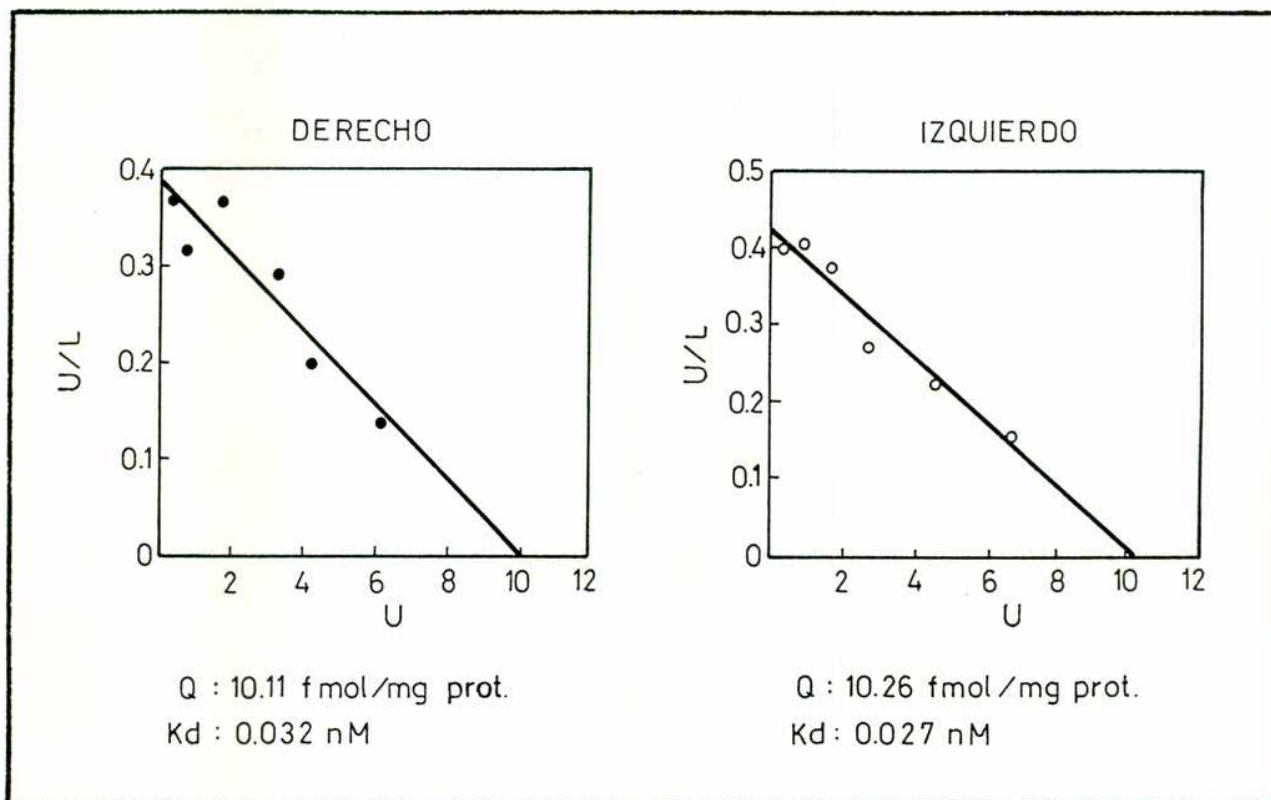


**Figura 32: Efecto de la desnervación testicular sobre los receptores para LH: análisis de Scatchard.**

Se muestran los resultados obtenidos en 4 animales adultos, representativos de un lote de 12 ratas sometidas a desnervación testicular unilateral.

Número de receptores controles:  $17.91 \pm 1.17$  fmol/mg prot ; desnervados:  $10.35 \pm 0.83$  fmol/mg prot.  $p < 0.0005$ ,  $n=12$ )





**Figura 33: Receptores testiculares de LH en animales controles.**

Los gráficos de Scatchard muestran los resultados obtenidos con membranas preparadas individualmente a partir de cada testículo de un mismo animal control.

Receptores de LH (fmol/mg prot)		
Rata	control	desnervado
	derecho	izquierdo
1	16.70	4.94
2	23.60	12.39
3	10.24	6.91
4	14.98	10.60
5	19.45	13.77
	izquierdo	derecho
6	18.53	11.75
7	24.08	12.87
8	14.27	9.27
9	18.92	10.24
10	20.94	9.79
11	19.24	14.31
12	13.95	7.35

**Tabla 7: Concentración de receptores testiculares de LH en animales adultos con desnervación unilateral: análisis del efecto de la desnervación realizada alternativamente en el testículo derecho o izquierdo.**

Disminución promedio respecto del control: 42.7% (desnervación de testículo izquierdo); 41.8% (desnervación de testículo derecho).

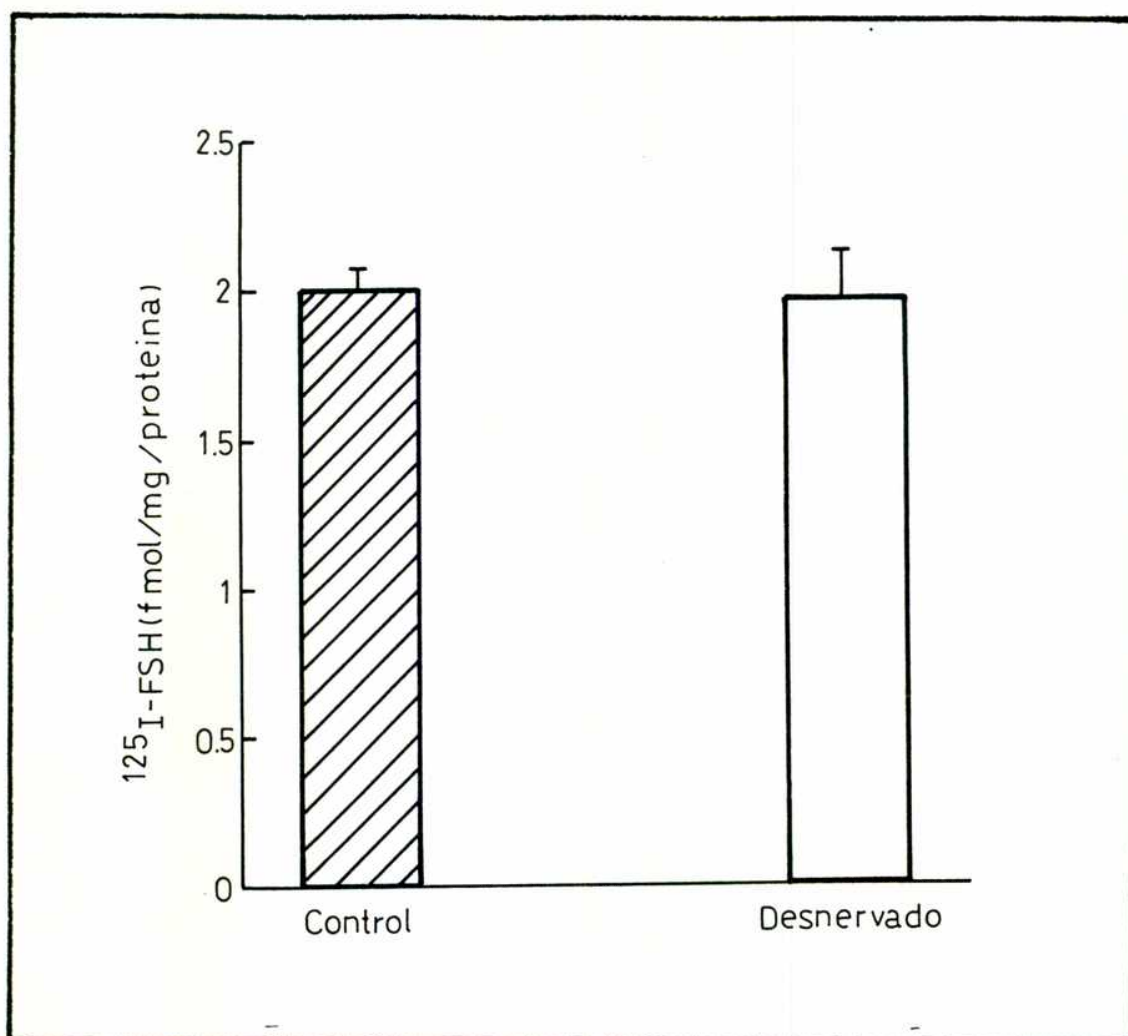
Teniendo en cuenta estos antecedentes, se estudiaron los receptores de LH en ambos testículos de una rata sometida a operación simulada y luego se comparó el efecto de la denervación unilateral de testículo derecho o izquierdo. Como muestra la Figura 33 no se observaron diferencias en la concentración de receptores de LH ni en su constante de afinidad al comparar ambos testículos de animales controles. Por otro lado, la magnitud de la caída en el número de receptores de LH fue independiente del testículo (derecho o izquierdo) en que se realizó la cirugía (Tabla 7).

Contrariamente a lo que ocurre con el receptor de LH, la desnervación no indujo cambios en la concentración del receptor testicular de FSH (fig. 34). Se estudió también la unión de  $^{125}\text{I}$ -PRL a membranas testiculares sin encontrarse diferencias debidas a la desnervación (fig. 35).

#### **Receptores $\beta$ adrenérgicos: efecto de la desnervación**

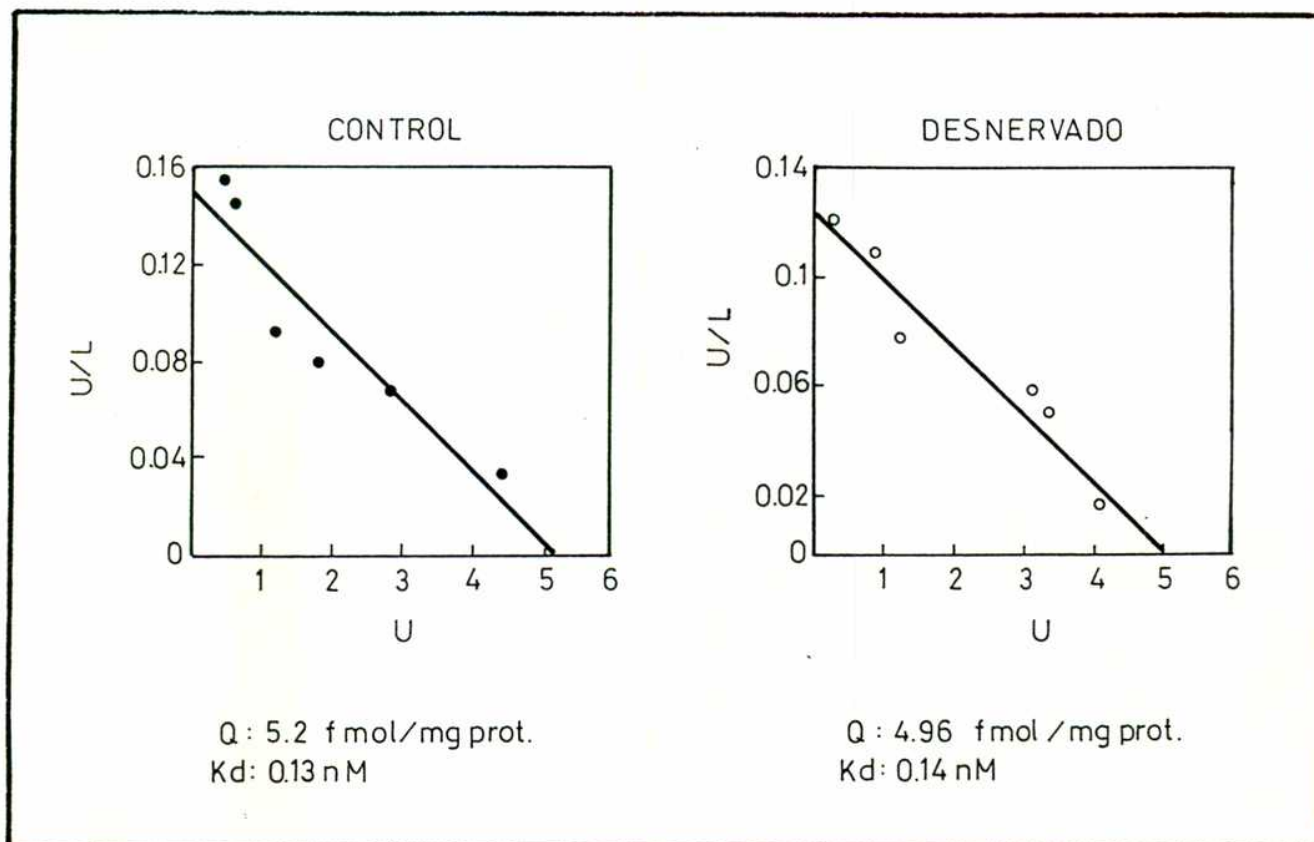
Es bien conocido el desarrollo de los fenómenos de super y subsensibilidad, debidas a alteraciones del tono adrenérgico o el entorno hormonal, en una variedad de tejidos que poseen receptores adrenérgicos (Lefkowitz y col, 1984; Aguado y Ojeda 1984). En función de estos antecedentes se decidió estudiar el efecto de la desnervación testicular sobre los receptores  $\beta$  adrenérgicos en preparaciones de células de Leydig purificadas provenientes de ratas adultas.





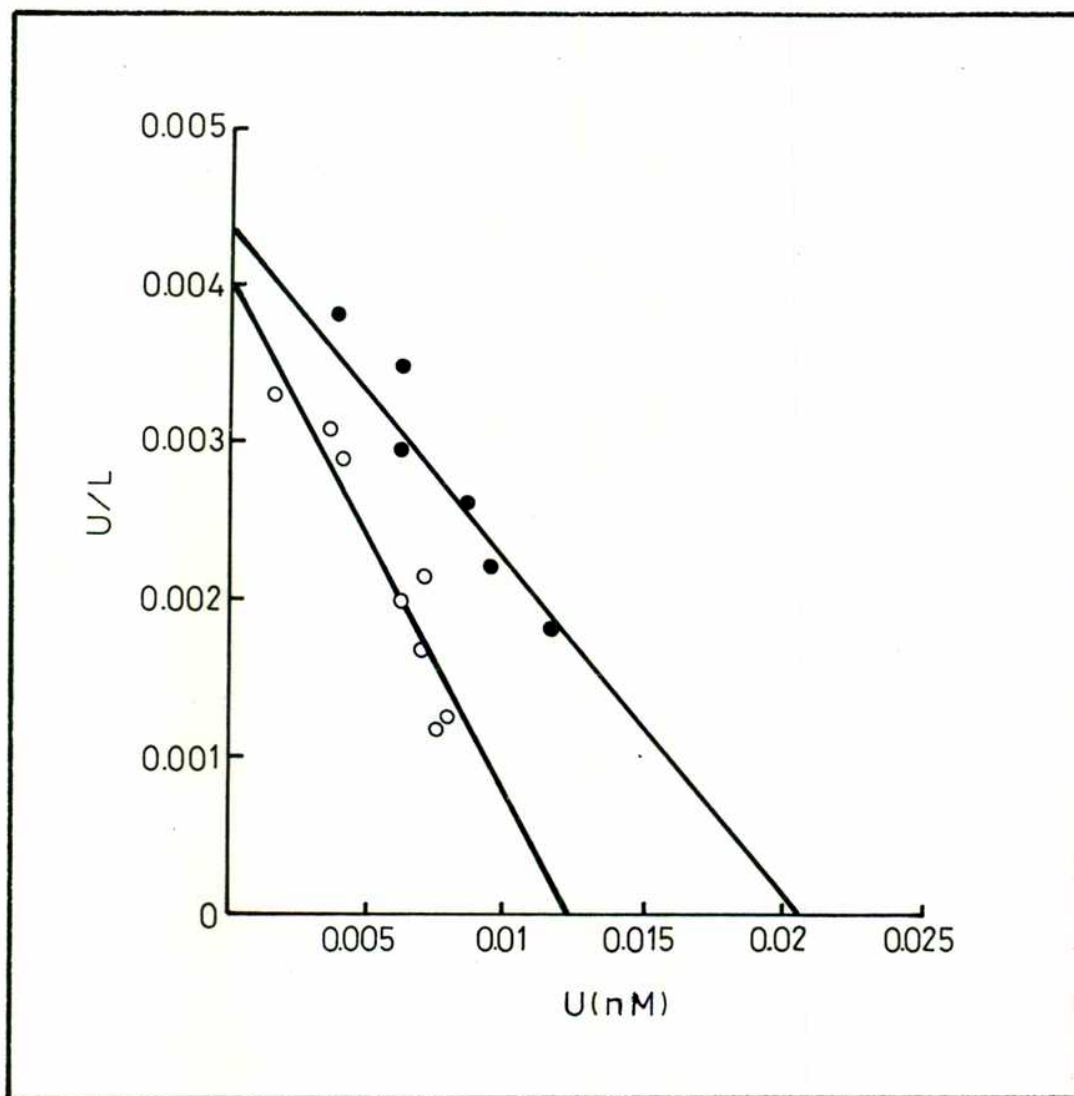
**Figura 34:** Concentración de receptores testiculares para FSH en ratas adultas sometidas a desnervación unilateral.

Las membranas testiculares se incubaron en presencia de concentraciones saturantes de  $^{125}\text{I-FSH}$ . Los valores representan el promedio  $\pm$  ES de 6 determinaciones.



**Figura 35: Receptores de PRL en testículos controles y desnervados.**

Los gráficos de Scatchard muestran los resultados obtenidos en testículo control y desnervado de un animal representativo de 8 estudiados.



**Figura 36:** Efecto de la desnervación testicular sobre los receptores  $\beta$ - adrenérgicos en células de Leydig.

Los gráficos de Scatchard muestran los resultados obtenidos con preparaciones celulares provenientes de testículos controles (●) y desnervados (○), en un experimento representativo.

Como muestra la Figura 36, luego de 10 días de desnervación se observó una importante disminución en la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en las células de Leydig (control:  $7495 \pm 219$  sitios/celula, desnervado:  $4883 \pm 393$ ,  $p < 0.005$ ), sin cambios en la afinidad de los mismos ( $K_d$  controles:  $3.54 \pm 0.72$  nM,  $K_d$  desnervado:  $2.3 \pm 0.31$  nM) .

Las suspensiones de células intersticiales de testículos controles y desnervados de ratas adultas se incubaron en presencia del agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol. En las condiciones experimentales utilizadas no se observó un efecto significativo del isoproterenol sobre la producción in vitro de andrógenos.

#### Efecto de la desnervación testicular en rata prepúber

Como se mencionara en la Introducción, Nagai y col. (1982) observaron que la desnervación testicular de animales pequeños ocasionaba una disminución en el peso testicular e importantes daños morfológicos, alteraciones que no ocurrían al utilizar animales adultos. Teniendo en cuenta este antecedente se decidió estudiar el efecto de la sección del nervio espermático superior en animales prepúberes a fin de evaluar posibles diferencias en la sensibilidad testicular a la desnervación .

Por otro lado, Preslock y McCann (1985) observaron que la ligadura bilateral del vas deferens (que implica la interrupción del nervio espermático inferior) ocasionaba dramáticos cambios en

los niveles séricos de hormonas hipofisaria y sugirieron la existencia de una conexión directa entre el SNC y el testículo. Para evaluar si la vía superior de inervación testicular esta comprometida en mecanismos semejantes al sugerido por estos autores, los animales prepúberes se sometieron a desnervación testicular bilateral y se analizaron también posibles cambios en los niveles circulantes de LH, FSH y PRL.

Tal como se describió para los animales de 60 días se determinó el contenido de NE en la cápsula testicular de animales controles y desnervados. La sección bilateral del nervio espermático superior causó una caída del 52% en el contenido de NE en cápsula testicular (controles:  $3.02 \pm 0.30$  ng/cápsula; desnervados  $1.45 \pm 0.19$  ng/cápsula,  $p < 0.001$ ,  $n = 10$ ).

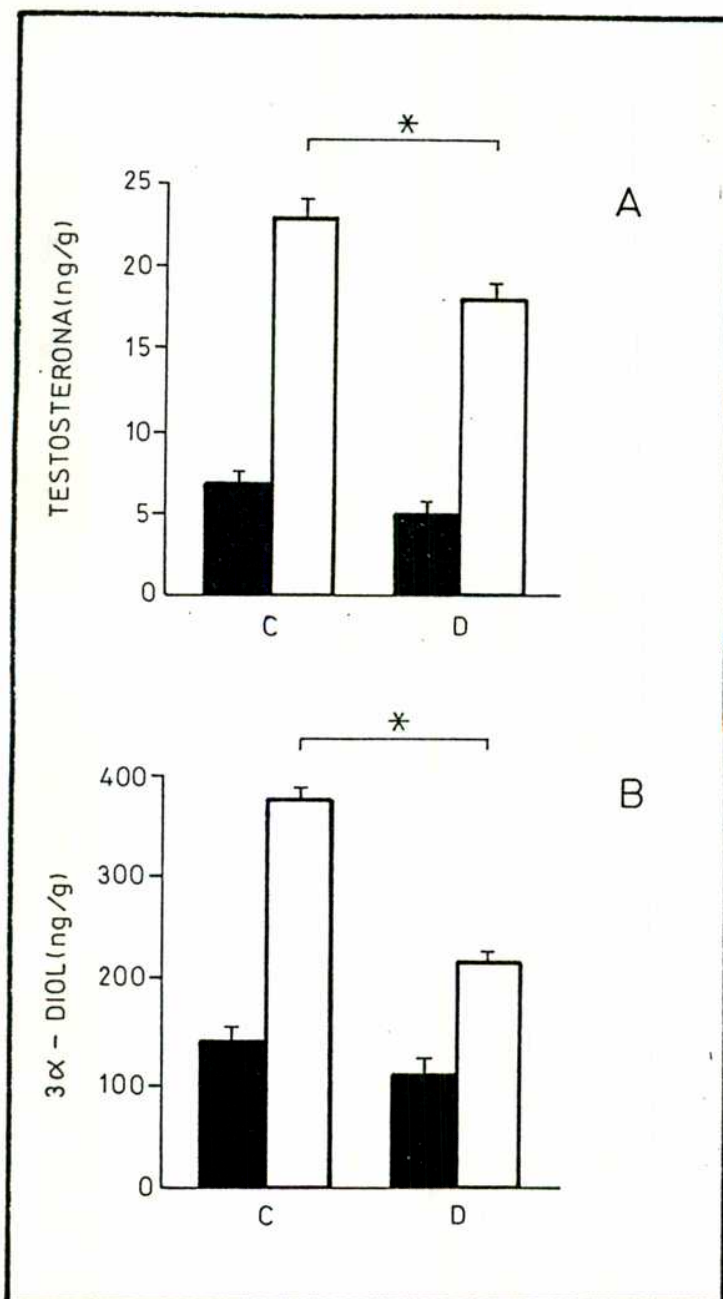
La sección del nervio espermático superior en animales de 30 días no tuvo efecto sobre el peso testicular (controles:  $0.78 \pm 0.04$  g, desnervados:  $0.71 \pm 0.05$  g).

No se observaron diferencias en los niveles séricos de andrógenos, LH, FSH o PRL entre los animales sometidos a desnervación testicular y los animales controles con operación simulada, cuando dichos niveles se determinaron 10 días después de la operación (Tabla 8).

	control	desnervado
Testosterona (ng/ml)	1.24 ± 0.19	1.17 ± 0.15
3 $\alpha$ -diol (ng/ml)	6.64 ± 0.94	6.97 ± 1.06
LH (ng/ml)	1.30 ± 0.14	1.38 ± 0.18
FSH (ng/ml)	16.72 ± 1.12	18.95 ± 2.25
PRL (ng/ml)	3.15 ± 0.27	3.20 ± 0.32

**Tabla 8 : Niveles plasmáticos de andrógenos, LH, FSH y PRL en animales púberes controles y sometidos a desnervación bilateral del testículo.**

Los valores representan el promedio  $\pm$  ES de 10 determinaciones individuales.



**Figura 37: Producción *in vitro* de andrógenos por testículos controles y desnervados de ratas de 40 días.**

■ : basal, □ : hCG 100 mUI. Los valores representan el promedio  $\pm$  ES de 10 determinaciones individuales.  $p < 0.01$

### Producción in vitro de andrógenos

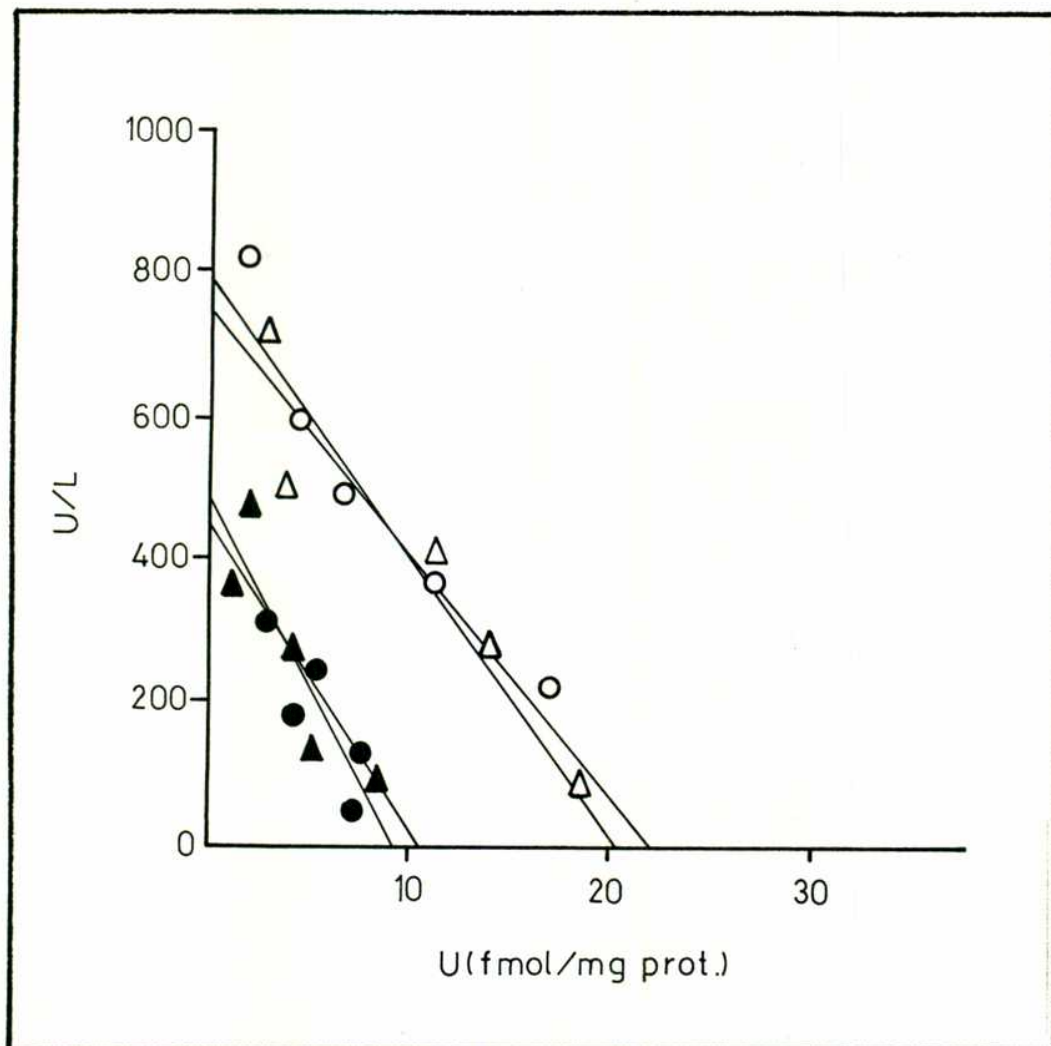
Como muestra la Figura 37 no se observaron diferencias significativas en la producción basal de testosterona y  $3\alpha$ -diol. Cuando las incubaciones se realizaron en presencia de una dosis máxima de hCG, la producción de los dos andrógenos fue significativamente menor en los testículos desnervados que en los controles ( $p < 0.01$ ).

### Receptores testiculares de gonadotrofinas.

Diez días después de la desnervación testicular se estudiaron posibles cambios en la concentración y/o afinidad de los receptores testiculares de gonadotrofinas. Las membranas de testículos controles y desnervados se incubaron con concentraciones crecientes de I-LH hasta alcanzar la saturación. El análisis de los datos según el método de Scatchard demostró que la desnervación provoca una disminución del 60% en la concentración de receptores (controles:  $23.8 \pm 0.9$  fmol/mg prot; desnervados:  $9.3 \pm 1.2$  fmol/mg prot,  $p < 0.001$ ,  $n=5$ ) pero no se modifica el orden de afinidad de los mismos ( $K_d$  controles:  $0.032 \pm 0.013$ ,  $K_d$  desnervados:  $0.020 \pm 0.009$  nM) (Fig.38).

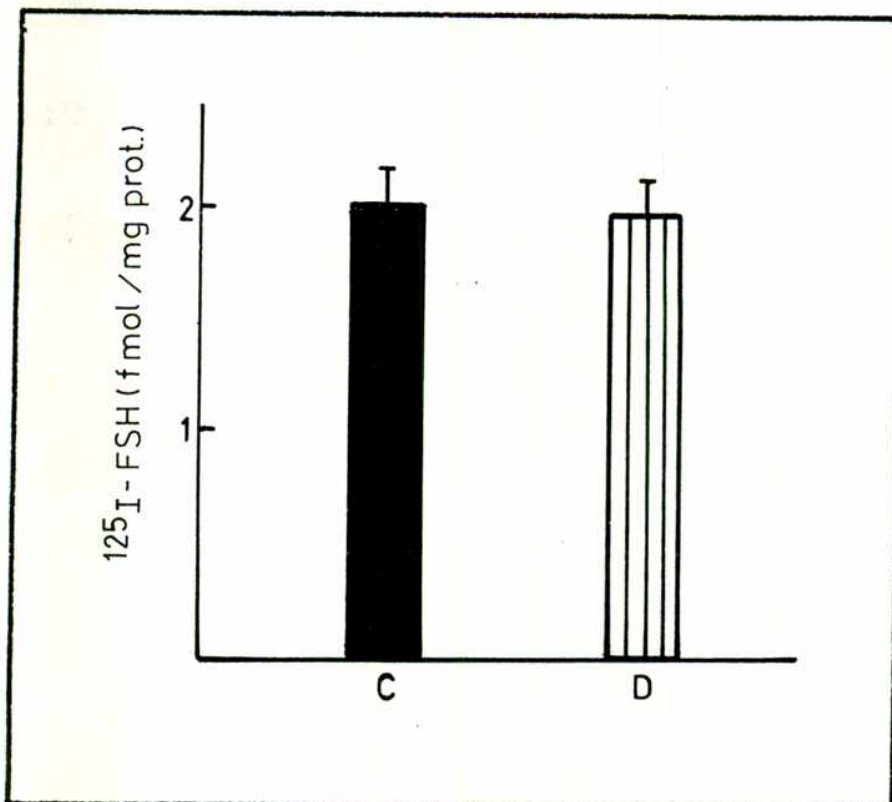
Tal como se observó para el animal adulto, la desnervación en la etapa prepuberal no afectó la concentración de receptores testiculares de FSH (fig. 39).





**Figura 38:** Efecto de la desnervación sobre los receptores testiculares de LH en animales de 40 días: análisis de Scatchard.

La figura muestra los resultados representativos obtenidos en 2 animales controles (○, △) y 2 animales desnervación testicular bilateral (●, ▲). Número de receptores: controles  $23.8 \pm 0.9$  fmol/mg prot; desnervados:  $9.3 \pm 1.2$  fmol/mg prot,  $p < 0.001$ ,  $n=5$ .



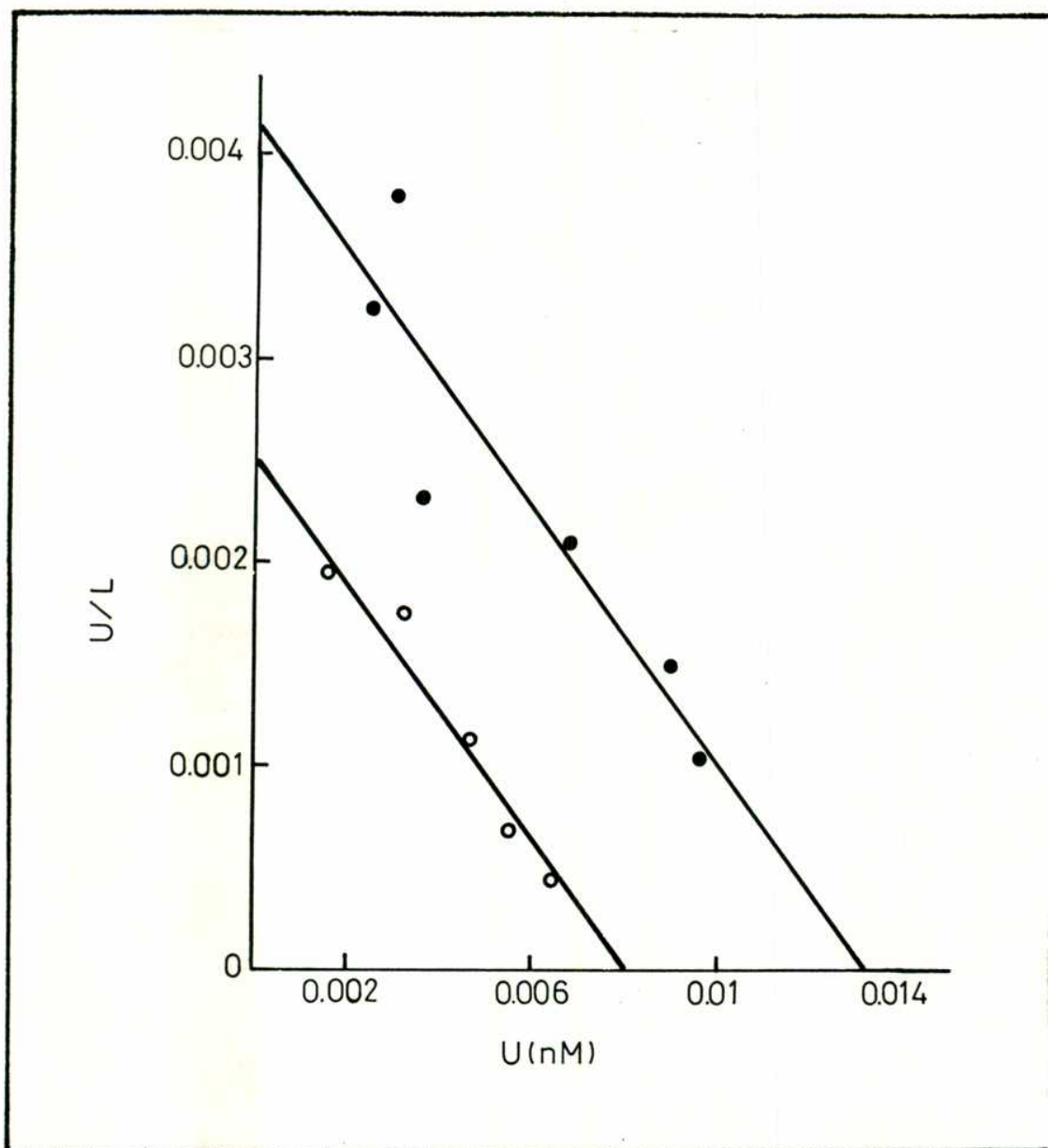
**Figura 39: Receptores testiculares de FSH en animales de 40 días: efecto de la desnevación.**

Las membranas testiculares se incubaron en presencia de concentraciones saturantes de  $^{125}\text{I}$ -FSH. Los valores representan el promedio  $\pm$  ES de 6 determinaciones.

### Receptores $\beta$ adrenérgicos.

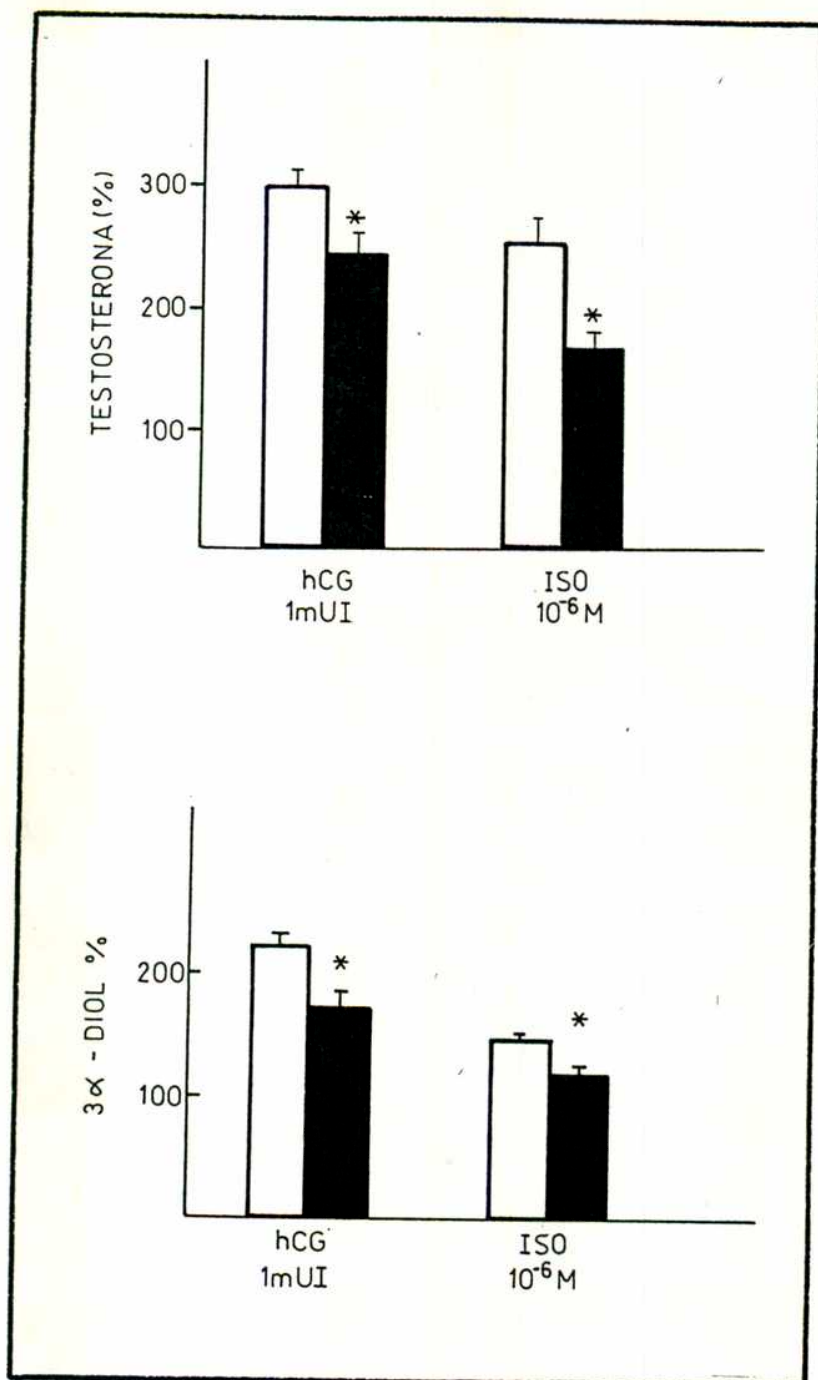
Se estudió luego el efecto de la desnervación testicular sobre los receptores  $\beta$  adrenérgicos en células de Leydig purificadas. Los gráficos de Scatchard de la Figura 40 indican que la desnervación de animales prepuberales indujo una disminución en la concentración de receptores  $\beta$  adrenérgicos (controles:  $3306 \pm 98$  sitios/célula, desnervados:  $2028 \pm 154$  sitios por célula), sin modificarse la constante de afinidad.

A partir de estos resultados, en otra serie de experimentos se incubaron suspensiones de células intersticiales provenientes de testículos controles y desnervados en presencia del agonista  $\beta$  adrenérgico isoproterenol, tanto en condiciones basales como en presencia de una dosis media de hCG. Como se observa en la Figura 41 el estímulo inducido por hCG fue menor en células provenientes de testículos desnervados, lo que confirma los resultados obtenidos por incubación de testículos enteros de animales púberes. Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre en el animal adulto, las células intersticiales de ratas púberes respondieron al estímulo del agonista  $\beta$  adrenérgico isoproterenol. Sin embargo dicho estímulo resultó significativamente menor en las células provenientes de testículos desnervados. Estos resultados son compatibles con la disminución en el número de receptores  $\beta$  adrenérgicos observada anteriormente.



**Figura 40:** Efecto de la desnervación testicular sobre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en células de Leydig de animales de 40 días.

Los gráficos de Scatchard muestran los resultados obtenidos con preparaciones celulares provenientes de testículos controles (●) y desnervados (○), en un experimento representativo.

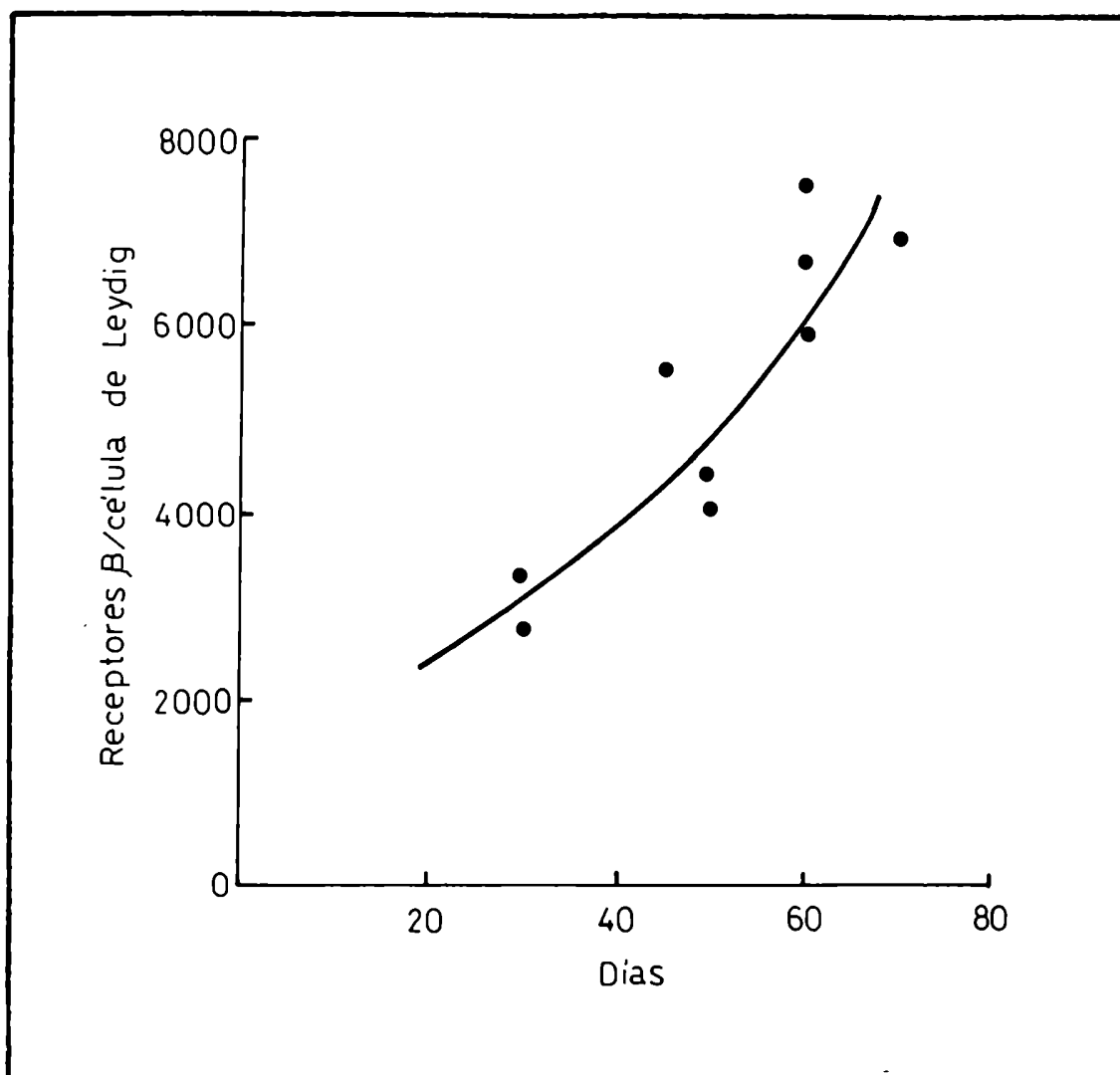


**Figura 41:** Producción de testosterona y 3 $\alpha$  -diol por células intersticiales provenientes de testículos controles y desnervados de animales de 40 días: respuesta al isoproterenol y hCG.

Se evaluó la respuesta esteroidogénica en 12 suspensiones individuales de células intersticiales provenientes de 6 testículos controles y 6 testículos desnervados. Los resultados se expresan como % de la producción basal  $\pm$  ES. ISO: isoproterenol. \* p < 0.01

□ CONTROL

■ DESNERVADO



**Figura 42:** Perfil ontogénico de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en células de Leydig.

Cada punto representa la concentración de receptores expresada en número de sitios /célula, calculada a partir de gráficos de Scatchard correspondientes a cada edad.

### Ontogenia de los receptores $\beta$ -adrenérgicos en células de Leydig

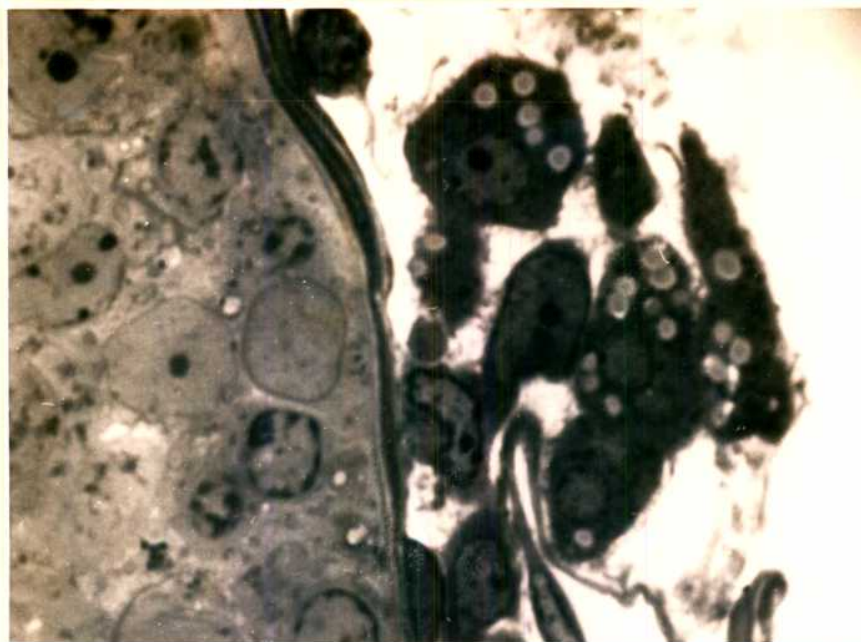
Dado que el número de receptores  $\beta$  adrenérgicos en animales púberes resultó significativamente inferior al hallado para animales adultos se estudió el perfil ontogénico de este receptor. Se encontró que la densidad de receptores  $\beta$  adrenérgicos presentes en la membrana de células de Leydig aumenta gradualmente a lo largo del desarrollo sexual de la rata (fig. 42).

### Morfología del testículo desnervado

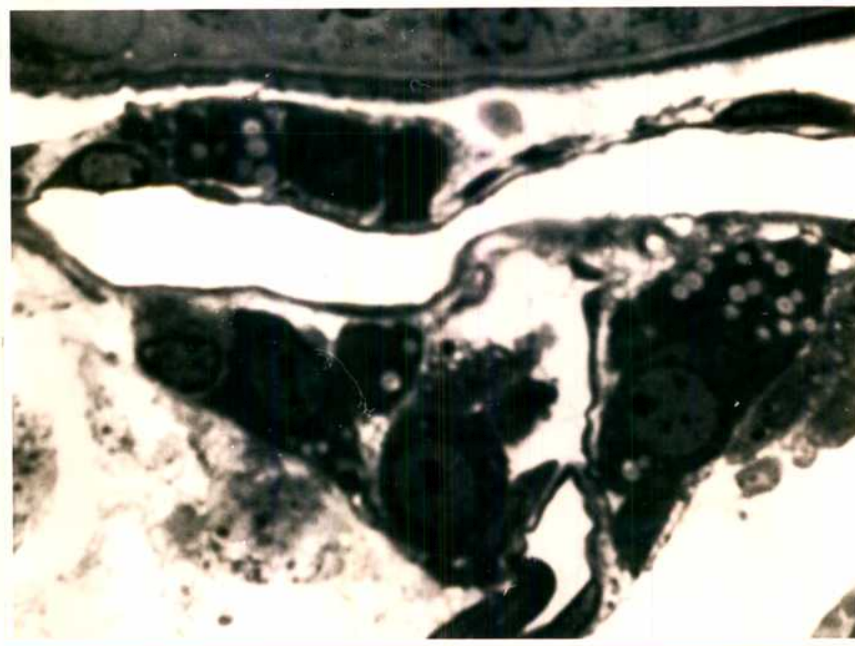
La Figura 43 A muestra la histología del testículo control, donde se observa un grupo de células de Leydig adyacente a un túbulo seminífero. Estas células se reconocen fácilmente por su citoplasma oscuro y por la presencia de gotas lipídicas. La sección del nervio espermático superior no alteró la organización histológica del testículo (fig. 43 B). Tanto el tejido intertubular como el epitelio seminífero carecen de alteraciones degenerativas. Cuando se analizó la estructura de las células de Leydig del testículo desnervado con el microscopio electrónico no se encontraron cambios significativos en las organelas de estas células (fig. 44 A y B). Ocasionalmente se observó dilatación del retículo endoplasmático liso en algunas células de Leydig.



A



B



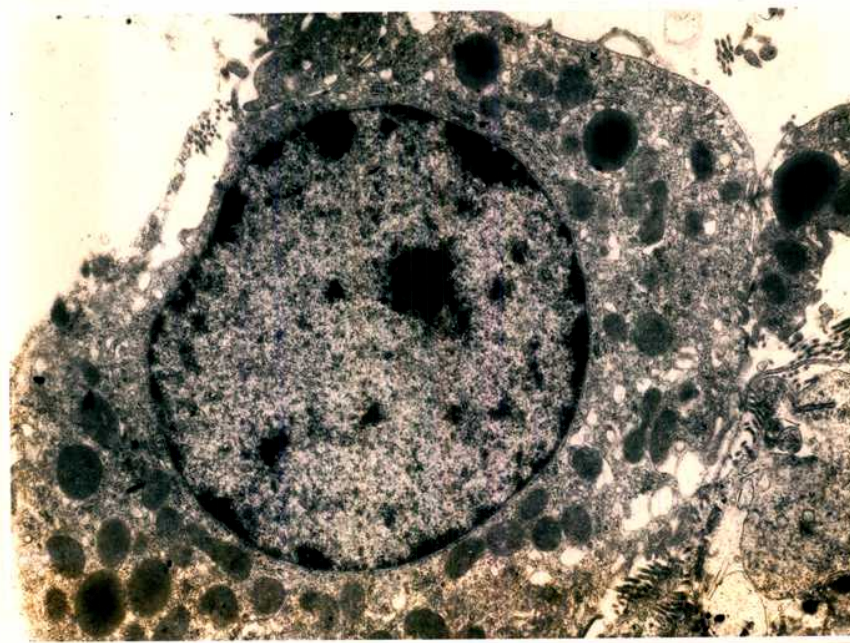
**Figura 43:** Microfotografía de testículo de rata. Cortes ultrafinos coloreados con azul de toluidina. Control (A): Se observa un grupo de células de Leydig próximo a un túbulo seminíferos. Desnervado (B) Células de Leydig alrededor de un vaso sanguíneo. Aumento 1250 x.



A



B



**Figura 44: Ultraestructura de células de Leydig de testículo de rata control (A) y desnervado (B).**

Nótese la dilatación del retículo endoplasmático liso en la fotografía correspondiente al testículo desnervado (B).

**DISCUSSION**

Los resultados presentados en este trabajo demuestran la presencia de monoaminas en diversos compartimientos del testículo y sugieren una activa participación de las mismas en la regulación de la actividad testicular. Las variaciones observadas luego de la desnervación en distintos indicadores de la función endócrina testicular sugieren que los nervios autónomos que llegan al testículo constituyen un importante factor modulador que se integraría a los complejos mecanismos hormonales (endócrinos, parácrinos y autócrinos) que regulan la actividad testicular.

Las observaciones realizadas confirman la presencia de fibras fluorescentes en la cápsula testicular y aclaran la controversia relacionada a las variaciones del contenido de 5-HT con la edad.

La técnica histoquímica utilizada en este estudio se basa en la reacción del ácido glioxílico con las monoaminas del tejido para dar un derivado fluorescente que permite visualizar fibras nerviosas o células que contengan monoaminas. Este método, originalmente descrito por Axelsson y col (1973) y luego modificado por de la Torre y col (1976) ofrece varias ventajas sobre la clásica técnica de fluorescencia inducida por formaldehído (Falk y col. 1962). En primer lugar, el tiempo necesario para el procesamiento de las muestras se reduce de aproximadamente 4 días a solamente media hora y, lo

que es aun más importante, se logra mayor sensibilidad y se reducen las alteraciones morfológicas del tejido.

La presente descripción de fibras monoaminérgicas en la cápsula testicular coincide con publicaciones previas de Bell y Mc Lean (1973), quienes demostraron la presencia de un plexo adrenérgico en la cápsula de ratas adultas, observable mediante la exposición del tejido a vapores de formaldehído. Los mismos autores estudiando la contractilidad de la cápsula en respuesta a estímulos eléctricos y a drogas adrenérgicas y colinérgicas, confirman la existencia de nervios motores adrenérgicos y también fibras colinérgicas en la cápsula testicular.

La cápsula testicular recibe la mayoría de sus fibras nerviosas directamente del nervio espermático superior. En la mayoría de las especies estas fibras inervan los vasos sanguíneos que recorren la cápsula testicular (Risley y Skreptos, 1964; Norberg y col, 1967). Sin embargo en el hombre y el mono rhesus (Hodson, 1970) se han observado numerosas fibras noradrenérgicas inervando el tejido intersticial y el músculo liso de la túnica albugínea. Se han descrito terminales en la túnica vasculosa del toro (Shioda y Nishida, 1966), en la túnica albugínea del hombre y también en la túnica

vaginalis de hombre (Yamashita, 1939) , perro y gato (Corona, 1953).

La mayoría de las fibras que penetran al interior del testículo lo hacen acompañando un pequeño tramo del recorrido de los vasos sanguíneos. Se han observado vasos inervados que penetran hasta el centro del testículo en el gato (Norberg 1967), hombre y mono rhesus (Baumgarten y Holstein, 1967; Hodson, 1970) pero no ocurre lo mismo en otras especies. Los presentes estudios en testículo de rata indican que en esta especie los nervios monoaminérgicos se localizan exclusivamente en la zona periférica de la gonada, generalmente asociados a vasos sanguíneos.

Varios autores coinciden en que los nervios testiculares no penetran la túnica propia de los túbulos seminíferos y por lo tanto no hacen contacto con las células tubulares (Kuntz y Morris, 1946; Norberg y col, 1967; Dayan, 1970). Se han observado fibras que llegan cerca de las células contráctiles de los túbulos seminíferos en el toro (Shioda y Nishida, 1966), gallo (Gilbert, 1968) y en el hombre (Baumgarten y col, 1967; Hodson, 1970).

En un estudio más reciente Yamamoto y col. (1987) sugirieron que las células mioides de testículos humanos

reciben inervación adrenérgica y describieron que los túbulos seminíferos se contraen en respuesta a NE y Ach (Miyake y col., 1986a). Por otro lado, estudios farmacológicos de Miyake y col. (1986b) demuestran la existencia de receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos así como receptores muscarínicos en las células mioides de rata.

En los estudios morfológicos iniciales no se describe la presencia de terminales adrenérgicas o colinérgicas dentro o en la vecindad de los túbulos seminíferos de rata, cobayo o conejo (Risley y Skreptos, 1964; Norberg y col., 1967). Recientemente, Miyake y col (1986a) describieron, mediante técnicas de tinción con plata, fibras nerviosas que contactan con células mioides de rata, y sugirieron que la contracción de los túbulos seminíferos estaría regulada por fibras nerviosas adrenérgicas.

En el presente estudio no se encontraron fibras fluorescentes próximas a los túbulos seminíferos. Es probable que las fibras nerviosas localizadas con técnicas argénticas, contengan otro neurotransmisor no monoaminérgico o bien que sean fibras adrenérgicas que por sus bajos niveles de catecolaminas no se detecten con fluorescencia inducida por ácido glioxílico.

En cuanto a la inervación del tejido intersticial, se observó que el número de fibras próximas a células de Leydig depende en primer lugar de la especie estudiada y también de la posición de las células de Leydig. Se ha observado que en la rata, gato, y cobayo los cúmulos de células de Leydig no están en contacto directo con fibras nerviosas y solo ocasionalmente se encuentra algún grupo de células cercanas a fibras nerviosas perivasculares (Norberg, 1967). En cambio, en el humano se han descrito fibras adrenérgicas en contacto directo con células de Leydig. Los grupos de células más periféricos están asociados con numerosas fibras nerviosas mientras que las células de Leydig en el interior del testículo no se encuentran frecuentemente en relación directa con los nervios. En el hombre y mono Rhesus se han observado terminales que contactan con células de Leydig individuales, las que pueden situarse ya sea bajo la túnica albugínea o entre los túbulos seminíferos (Baumgarten y Holstein, 1967, 1968).

Okkel y Sand (1940) y van Campenhaut (1949) postularon la existencia de una conexión directa entre las fibras adrenérgicas y las células de Leydig en el humano. Sin embargo, en muchos estudios subsiguientes no se encontraron evidencias morfológicas de tal inervación directa (Kuntz y Morris, 1946;

Gray, 1947; Risley y Skreptos, 1964; Shioda y Nishida, 1966; Norberg, 1967a).

Tedde y Piras (1984) estudiaron la inervación del testículo humano mediante microcopía electrónica y a pesar de haber observado sugestivas varicosidades axónicas y botones terminales conteniendo vesículas sinápticas, no visualizaron verdaderas sinapsis entre las células de Leydig y las fibras nerviosas cercanas. Sin embargo, a pesar de la ausencia de contacto sináptico, la proximidad sugiere que el neurotransmisor provee inervación por difusión.

La presente observación de fluorescencia específica en las células del intersticio en los animales de 15 días coincide con descripciones previas (Lombard-des Gouttes, 1974). En este estudio se extendió la observación a animales púberes y adultos, encontrándose que la fluorescencia específica en células intersticiales estaba disminuida en los animales de 40 días y ausente a los 60 días de edad. Es interesante señalar que ocasionalmente se observaron células con gránulos intensamente fluorescentes debajo de la cápsula testicular de animales púberes y adultos, que corresponden a la descripción de mastocitos.

Los estudios espectrofluorométricos realizados confirmaron la presencia de 5-HT en el parénquima testicular. Se



observó que la concentración de esta indolamina no varía significativamente entre los 15 y 45 días de edad. En animales de 60 días de edad se encontraron concentraciones menores en términos de ng/g, probablemente debido al rápido crecimiento del testículo en este período.

Al estudiar el contenido de monoaminas en cada compartimiento testicular aislado se observó que las catecolaminas y 5-HT presentaron el mismo perfil de distribución. La cápsula testicular contiene elevados niveles de monoaminas los cuales pueden asociarse con las fibras fluorescentes observadas en la misma. Las fibras nerviosas que se observan en la cápsula testicular han sido descritas como fibras adrenérgicas (Bell y Mc Lean, 1973), lo que justificaría el alto contenido de NE hallado en la misma. Por otro lado, los resultados del presente trabajo indican que la cápsula testicular de rata también recibe inervación serotoninérgica la cual contribuye al contenido capsular de 5-HT.

Como ya se mencionara anteriormente, el líquido intersticial contiene hormonas y factores producidos localmente así como sustancias provenientes de la circulación general que llegan mediante la filtración capilar (Sharpe y Cooper, 1983). De acuerdo con las presentes observaciones las monoaminas estarían incluidas entre los múltiples factores que se

detectan en el líquido intersticial, lo que sugiere un posible rol modulador de las mismas sobre la actividad testicular.

Las concentraciones de NE, DA y 5-HT hallada en el líquido intersticial son notablemente mayores que los correspondientes niveles plasmáticos. Por lo tanto, las monoaminas presentes en el líquido intersticial no provendrían exclusivamente de la filtración capilar, sino que probablemente difundan desde los terminales nerviosos de en la cápsula hacia el intersticio.

La 5-HT presente en sangre está principalmente contenida en gránulos dentro de las plaquetas, quedando solamente un 10% libre. En los presentes experimentos la 5-HT plaquetaria y plasmática no contribuyeron al contenido de esta indolamina en los distintos compartimientos testiculares, ya que los testículos fueron perfundidos con solución fisiológica antes de su disección. En lo que respecta a una probable subestimación de las monoaminas como consecuencia de su oxidación enzimática, esta fue prevenida por el agregado de pargilina, inhibidor de la MAO, a la solución de perfusión.

La presencia de 5-HT y su metabolito 5-HIAA en el líquido intersticial evidencia la existencia de degradación enzimática de la 5-HT por la MAO testicular. Esta enzima metabolizante de monoaminas se localiza en el sector intersticial y en las

paredes de los túbulos seminíferos de la rata (Ellis y col, 1972).

En las preparaciones de células intersticiales aisladas también se observó la presencia de catecolaminas y 5-HT. Dado que no se visualizaron fibras nerviosas en contacto con el tejido intersticial, es probable que el contenido de monoaminas en las células intersticiales se deba a la existencia de un mecanismo de captación responsable de la concentración de las monoaminas presentes en el líquido intersticial que baña dichas células, o bien que sean sintetizadas por las células intersticiales.

La ausencia de monoaminas en el sector tubular probablemente se deba a la existencia de MAO en el sector intersticial y las paredes de los túbulos seminíferos (Ellis y col, 1972). La especial localización de esta enzima, que degrada monoaminas, podría tener una importancia funcional ya que estaría evitando el acceso de aminas al sector tubular.

Es importante destacar que en las células de Sertoli recientemente aisladas los niveles de receptores  $\beta$  adrenérgicos resultan prácticamente indetectables pero estos se adquieren a lo largo del cultivo (Kierszenbaum y col, 1985). La ausencia de niveles apreciables de catecolaminas en túbulos seminíferos, junto con los antecedentes citados, indican que

las respuestas observadas en el cultivo primario no siempre reflejan lo que ocurre en los tejidos intactos. La función tubular parecería no estar normalmente influenciada por un componente adrenérgico, sin embargo, no puede descartarse que ante situaciones patológicas que alteran el funcionamiento testicular, las células de Sertoli adquieran la capacidad de responder a un estímulo adrenérgico. De hecho se ha demostrado que si bien en ratas intactas los receptores  $\beta$  adrenérgicos se localizan principalmente en el sector intersticial, en testículos criptorquídicos se observa un aumento en el número total de receptores y la aparición de receptores en el sector tubular (Tolszczuk y col, 1988).

La presencia de 5-HT en una rama del nervio espermático superior junto con la caída del contenido de 5-HT que provoca la sección de dicho nervio sugieren que el testículo recibe inervación serotoninérgica. Estos resultados permiten confirmar que las fibras fluorescentes que se observan en la cápsula testicular mediante técnicas histoquímicas contienen tanto catecolaminas como 5-HT. Los niveles de 5-HT en el testículo contralateral a la desnervación no se modificaron con respecto a los valores hallados en animales intactos, lo que permitiría descartar una inervación cruzada por lo menos

en lo que respecta a las fibras que contienen 5-HT. No puede descartarse la posibilidad que la 5-HT esté contenida en nervios adrenérgicos ya que esta establecido que dichos nervios son capaces de captar y almacenar 5-HT.

La cantidad de 5-HT que disminuye en el testículo por desnervación representa entre un 35 y 50% del contenido de esta indolamina en el testículo control, lo que sugiere que el nervio seccionado no sería la única fuente de 5-HT testicular. La 5-HT podría también provenir de otras fibras que lleguen al testículo a través del nervio espermático inferior. En el presente estudio se decidió analizar exclusivamente el efecto de la sección del nervio espermático superior ya que es la principal fuente de inervación testicular.

Otra posible fuente de 5-HT la constituyen los mastocitos que han sido descritos en testículos de algunas especies. En el humano se encuentran mastocitos en sector intersticial (de Kretser y col, 1988) y la cantidad de dichas células aumenta durante la pubertad (Nistal y col, 1984). En el hamster se han descrito mastocitos en la cápsula y alrededor de los vasos sanguíneos, pero no en los espacios intersticiales (Mayerhofer y col, 1989). En el caso de la rata adulta, los mastocitos no son un componente frecuente del tejido intersticial (Pöllänen

y Maddocks, 1988), sin embargo, Sowerbutts y col. (1986) han descrito la presencia de dichas células en contacto con la porción capsular de la arteria testicular. Dichas células podrían quedar adheridas a la capsula durante su aislamiento y contribuirían en parte al contenido total de 5-HT detectado. Tal como se mencionara anteriormente, en la rata adulta se observaron, aunque solo ocasionalmente, células con gránulos fluorescentes por debajo de la cápsula testicular que podrían ser mastocitos.

Aun no se conoce cual sería la importancia funcional de estas células en el testículo normal. Sin embargo, se ha observado la aparición de abundantes mastocitos en el intersticio durante la etapa de recuperación que sigue una a lesión por EDS, (droga que destruye selectivamente las células de Leydig), lo que sugiere que los mastocitos tendrían un rol en la restauración de la actividad normal del testículo (Sharpe y col, 1988).

El tratamiento de ratas macho con hCG induce un aumento en el volumen del fluido intersticial (Setchell y Sharpe, 1981), debido probablemente a un aumento en la permeabilidad vascular (Sharpe, 1984). A pesar de que aun no se conoce el mecanismo molecular que media este efecto de la hCG sobre la microcirculación testicular, Sowerbutts y col. (1986) sugieren

la participación de 5-HT en tal proceso. Estos autores observaron que el antagonista serotoninérgico, ketanserina, bloquea parcialmente este aumento de la permeabilidad vascular y mencionan que los mastocitos presentes en la vecindad de la arteria testicular podrían producir un aumento local de la concentración de 5-HT ante un estímulo apropiado. Una situación similar ocurre en el ovario, donde se han descrito mastocitos alrededor de los vasos sanguíneos que entran y salen del organo, en el hilio ovárico y en la grasa circundante (Schmidt y col, 1988; Krishna y col, 1985). Se ha demostrado que factores tales como LHRH (Sundaran y col, 1980) y LH (Krishna y col, 1985) son capaces de desencadenar la degranulación de los mastocitos y la liberación de histamina y 5-HT, la que llegaría al ovario a través de la sangre.

Los experimentos realizados en el presente trabajo confirman que la 5-HT tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de andrógenos por células de Leydig. Dicho efecto inhibitorio dosis dependiente resultó significativo en presencia de concentraciones mayores o iguales que  $10^{-9}$ M. El control de la viabilidad celular luego de distintos tiempos de incubación en presencia y ausencia de 5-HT permitió descartar un efecto tóxico letal de esta indolamina. Estos resultados

coinciden en parte con un trabajo previo de Vermes y col. (1979) quienes describieron un efecto inhibitorio de 5-HT sobre la producción de testosterona in vitro. Sin embargo en el sistema utilizado por estos autores la inhibición solo fue significativa a concentraciones mayores que  $2 \times 10^{-5}$  M. Esta discrepancia puede deberse a diferencias en la cepa de ratas utilizada, en las técnicas empleadas para la obtención de las suspensiones celulares y en las condiciones de incubación.

En el presente estudio, la producción de testosterona estimulada por una dosis máxima de hCG también resultó inhibida por dosis crecientes de 5-HT. Por otro lado se observó una menor sensibilidad en la respuesta esteroidogénica a dosis crecientes de hCG debida a la presencia de 5-HT en el medio. El hecho de que en presencia de 5-HT y dosis supramáximas de hCG no se alcance la misma respuesta que en los controles evidencia la existencia de una lesión en el camino biosintético de esteroides. Ellis (1972), incubando precursores radiactivos con preparaciones de microsomas o fragmentos de tejido testicular, estudió el efecto directo de 5-HT sobre los distintas etapas enzimáticas de la esteroidogénesis. La 5-HT en concentraciones mayores que 5  $\mu$ M determinó una inhibición no competitiva de la actividad de las enzimas  $17\alpha$  - hidroxilasa,  $C_{17-20}$  liasa y la 17-ceto reductasa, lo que se tradujo



en una inhibición de la conversión de  $^{14}\text{C}$ -progesterona en testosterona radiactiva en ambas preparaciones testiculares. El efecto inhibitorio de la indolamina sobre las enzimas esteroidogénicas observado en los experimentos en que se incubaron microsomas aislados, sugiere un efecto directo del neurotransmisor. Sin embargo, estas observaciones no explicarían los efectos observados en presencia de concentraciones nM de 5-HT.

En este trabajo de Tesis ha sido descrita la presencia de un receptor específico para 5-HT en membranas de células intersticiales con una constante de afinidad del orden nanomolar que resulta compatible tanto con las concentraciones de 5-HT detectadas en líquido intersticial como con las que determinan el efecto inhibitorio sobre la producción *in vitro* de andrógenos. De acuerdo con el análisis de especificidad el receptor testicular para 5-HT correspondería al subtipo 2. En los experimentos de caracterización de este receptor se utilizó como ligando radiactivo  $^3\text{H}$ -5-HT que generalmente no presenta una alta afinidad para el receptor tipo 2, sin embargo, en estos estudios la unión de  $^3\text{H}$ -5-HT se caracterizó por una  $K_d$  del orden nM. Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio de 5-HT sobre la esteroidogénesis esta

mediado por la interacción de la indolamina con receptores específicos en células intersticiales.

En un trabajo muy reciente Tinajero y col. (1991) aportaron evidencias sobre un probable mecanismo a través del cual la 5-HT modularía la esteroidogénesis testicular. Estos autores encontraron que 5-HT induce un aumento de 4 veces en la producción de CRF de las células de Leydig a través de la interacción con receptores específicos de tipo 5-HT<sub>2</sub>, que fueron caracterizados bioquímicamente utilizando como radioligando <sup>125</sup>I-DOI, agonista específico del receptor 5-HT<sub>2</sub>.

En los últimos años se ha descrito la presencia de CRF en testículo de varias especies y se demostró que este polipéptido es estructuralmente idéntico al CRF hipotalámico (Audhya y col, 1987). Estudios inmunohistoquímicos mostraron que el CRF testicular se localiza en células de Leydig y células germinales y su producción está controlada por gonadotrofinas ya que el contenido de CRF testicular disminuye drásticamente luego de la hipofisectomía (Yoon y col, 1988). Se ha demostrado que el CRF producido por las células de Leydig ejerce una regulación autócrina negativa muy eficiente sobre su actividad esteroidogénica. La acción inhibitoria del CRF sobre la producción de AMP<sub>c</sub> y andrógenos ocurre a través de la interacción del péptido con un receptor específico

(Ulisse y col, 1989) que se acopla a una subunidad G distinta de las  $G_s$  y  $G_i$ , y ejerce su acción inhibitoria mediante la activación de la quinasa de proteínas C (Ulisse y col, 1990).

Se ha demostrado que la acción inhibitoria de 5-HT sobre la producción de testosterona estimulada por hCG es prevenida por el antagonista del CRF,  $\alpha$ -helical CRF (9-41), y también por un anticuerpo anti-CRF. Por otro lado, el efecto inhibitorio de 5-HT no se vió afectado por la toxina de cólera ni por la toxina pertussis y en cambio fue revertido mediante el agregado de 8-bromo  $AMP_c$  (Tinajero y col, 1991). Estos resultados demostraron que la 5-HT actua sobre los receptores  $5-HT_2$  en células de Leydig estimulando la secreción de CRF que a su vez inhibe la producción de  $AMP_c$  y consecuentemente la esteroidogénesis.

Es importante señalar que este mecanismo propuesto que involucra el CRF, sólo es válido cuando se evalua el efecto de 5-HT sobre la producción de andrógenos estimulada por hCG, ya que se observó que el CRF no afecta la producción basal de andrógenos (Ulisse, 1989). Probablemente la inhibición observada en condiciones basales se deba a un efecto directo sobre la actividad enzimática, como se mencionara anteriormente.

Los experimentos de desnervación fueron diseñados con el objeto de evaluar en qué medida el nervio espermático superior participa directa o indirectamente en la modulación de la actividad esteroidogénica del testículo.

La desnervación quirúrgica realizada es un procedimiento complejo que implica la separación de las distintas ramas que componen el nervio espermático superior las cuales se encuentran adheridas a la arteria testicular. Durante la disección de los nervios, realizada bajo lupa se tuvo especial cuidado en no dañar los vasos sanguíneos del plexo pampiniforme ya que esto ocasionaría la atrofia total o parcial del testículo.

La eficiencia de la desnervación se controló mediante la determinación de NE en la cápsula, mientras el parénquima se utilizó para los experimentos "in vitro". El contenido de NE en testículos desnervados no cayó a valores indetectables ya que, tal como se mencionara anteriormente, la cápsula testicular también recibe, aunque en menor grado, inervación a través del nervio espermático inferior (Hodson, 1970).

No se observaron diferencias en el peso del testículo debido a la desnervación, tanto en animales de púberes como adultos. Sin embargo, en trabajos previos se observó que la desnervación testicular, lograda por distintas técnicas, induce cambios en el peso del testículo. Una serie de trabajos

pioneros han demostrado que la interrupción de las vías nerviosas que llegan al testículo en especies como el cobayo (Coujard, 1952), conejo (Hodson, 1965) y perros (Kuntz, 1919, Marconi, 1923) ocasiona la atrofia testicular y degeneración del epitelio seminífero.

Nagai y col. (1982) observaron que la desnervación quirúrgica testicular realizada en animales de 13 o 19 días de edad provoca una caída significativa en el peso del testículo y observaron una extensa degeneración en los túbulos seminíferos. Tales cambios morfológicos no se producían si la desnervación se realizaba luego de los 21 días de edad. En el caso de provocar la destrucción de los terminales simpáticos mediante la inyección del neurotóxico, 6-hidroxidopamina, los mismos autores observaron resultados comparables y sugirieron que existiría un período crítico (desde el nacimiento hasta los 15 días) en el cual el sistema nervioso tendría una importante participación en la regulación del crecimiento testicular.

La aplicación tópica de soluciones diluidas de fenol produce un bloqueo irreversible en la conductividad nerviosa (Nathan y Sears, 1960), lo que permite lograr la desnervación de un determinado tejido. Se ha observado que el tratamiento del cordón espermático con soluciones fenólicas diluidas

induce un aumento en el peso testicular que podría deberse a la retención de espermatozoides y fluidos testiculares (Favaretto, 1986). Varios autores han sugerido que la desnervación de la cápsula testicular y el epidídimo podría interferir en las contracciones involucradas en la propulsión de espermatozoides luego de la espermiación, llevando a la inhibición del tránsito de las gametas (Bell y Mc Lean, 1973; Davis y col, 1970).

En el caso del ovario, la sección del nervio ovárico superior tampoco induce cambios en el peso del órgano (Aguado y Ojeda, 1984). En contraposición, se ha observado que la desnervación modifica el peso de otros órganos endócrinos. Por ejemplo, la desnervación unilateral de la tiroides, por sección del nervio carotídeo externo o por gangliectomía cervical superior unilateral, ocasiona la involución del lóbulo tiroideo ipsilateral (Romeo y col. 1986)

Coincidiendo con las presentes observaciones, Frankel y Ryan (1981) observaron que la desnervación quirúrgica bilateral de la rata adulta no provoca cambios en el peso testicular, ni tampoco altera la normal espermatogénesis y el comportamiento sexual de la rata.

El estudio morfológico realizado muestra que la sección del nervio espermático superior no alteró la organización

histológica del testículo. Sin embargo, es necesario hacer un estudio más detallado de la ultraestructura de los compartimientos intersticial y tubular, con técnicas morfométricas para evaluar si las pequeñas alteraciones observadas luego de la desnervación son reales o bien un artefacto de la técnica.

El objetivo de este estudio fue determinar si la desnervación inducía cambios degenerativos marcados como fueron descritos en ratas jóvenes luego de la desnervación quirúrgica o la destrucción de la inervación simpática mediante la inyección local de 6-OH-DA (Nagai y col, 1982).

La desnervación testicular realizada en el presente trabajo puede haber causado modificaciones en el flujo sanguíneo testicular. Sin embargo, estas probables variaciones no se vieron reflejadas en los niveles circulantes de andrógenos los cuales no se modificaron luego de la desnervación uni o bilateral.

La LH, liberada por la adenohipófisis en forma pulsátil, es el principal factor regulador de los niveles plasmáticos de testosterona, sin embargo, variaciones en el flujo sanguíneo testicular podrían resultar en fluctuaciones de las concentraciones plasmáticas de dicho andrógeno. La secreción de testosterona es un fenómeno pasivo que depende de la difusión del esteroide. Si el flujo sanguíneo testicular es rápido la

velocidad de secreción se encontrará limitada por la velocidad de difusión, en cambio, un flujo sanguíneo lento podría ser el limitante de la velocidad de secreción de testosterona y determinar cambios en los niveles plasmáticos de andrógenos (Damber y Janson, 1978). La localización perivascular de las fibras nerviosas (Norberg, 1967) confirma la existencia de mecanismos simpáticos que regulan el lecho vascular del testículo.

Existen muchos factores capaces de modificar el flujo sanguíneo testicular. La infusión de E o NE en la arteria espermática de rata (Free y Jaffe, 1972a) o carnero (Setchell y col, 1966) resulta en una rápida vasoconstricción y un descenso temporal del flujo sanguíneo testicular, mientras que el isoproterenol causa vasodilatación y aumento del flujo en carneros. Se ha demostrado que las prostaglandinas E-2 y F2 disminuyen el flujo sanguíneo en ratas conscientes (Free y Jaffe, 1972b). Otros agentes que disminuyen el flujo sanguíneo testicular son 5-HT (Boccabella y col, 1961) y el cadmio (Setchell y Waites, 1970; Johnson y Turner, 1972).

La administración in vivo de catecolaminas se ha asociado generalmente con una disminución en la concentración plasmática de andrógenos. Levin y col.(1967) han demostrado que la administración sistémica de E a hombres sin manifestaciones



patológicas ocasiona una caída en los niveles circulantes de testosterona. Se han encontrado también importantes disminuciones en la concentración plasmática de testosterona en ratas luego de la administración sistémica de E o NE (Damber y Janson, 1978; Gotz y col, 1983; Stahl y col, 1984). Se ha sugerido que tales efectos se deberían a la influencia de las catecolaminas sobre el lecho vascular del testículo.

Damber y Janson (1978) midieron el flujo sanguíneo testicular en ratas utilizando microesferas radiactivas, sin lograr detectar cambios 20 minutos después de la infusión de E y NE en la arteria de la cola. Este método permite una única medición del flujo no pudiéndose detectar cambios a diferentes tiempos. En otros estudios en que se registró el flujo sanguíneo de manera continua, mediante un detector Doppler de flujo (Damber y col, 1982), se observó que la infusión de 10 ug de NE o E en la cola de la rata producía una disminución significativa en el flujo sanguíneo testicular. Sin embargo, con dosis menores (1 y 0.1 ug) no se alteraba significativamente el flujo sanguíneo. Estos autores sugieren que el hecho de que se hayan requerido dosis altas de catecolaminas para modificar el flujo sanguíneo indica que la función testicular no estaría normalmente afectada por cambios en el flujo sanguíneo.

Las células de Leydig normales poseen un exceso en receptores de LH (Catt y col, 1973; Mendelson y col, 1975). Las curvas dosis respuesta de la unión de  $^{125}\text{I}$ -LH, acumulación de cAMP y biosíntesis de testosterona se caracterizan por valores de CE50 de aproximadamente 80, 5, y 0.8 pM, respectivamente (Mendelson y col, 1975). Debido a esta disociación, la máxima producción de testosterona y de AMPc se observan con un porcentaje de ocupación de los receptores del 1 y 40 % respectivamente. Por lo tanto, teóricamente, la reducción en el número de receptores testiculares de LH, sin cambios en la afinidad, tendría como consecuencia una disminución en la sensibilidad de las células a la hormona, no variando su respuesta máxima. Una disminución en la respuesta máxima en la producción de AMPc y testosterona se observaría en el caso en que el número de receptores descendiera por debajo del 40 y 1 % respectivamente.

En el caso del testículo desnervado se observó una disminución en el número de receptores que oscilaba entre el 40 y 55 % , sin modificaciones significativas en la constante de afinidad. Tal como era de esperar, la caída en la concentración de receptores se tradujo en una disminución de la sensibilidad con que estas células responden a hCG. Sin embargo, ese porcentaje de caída en el número de receptores no

justifica la disminución observada en la respuesta de las células desnervadas a una dosis máxima de gonadotrofina. Esos resultados sugieren entonces que la desnervación testicular podría causar una lesión en el camino biosintético de andrógenos.

La sensibilidad con que otro tejido esteroideogénico, como la corteza suprarrenal, responde a su estímulo trófico, parecería también estar bajo control nervioso. Eduards y col. (1986) han demostrado que una semana después de la sección bilateral de los nervios esplácnicos, la respuesta a ACTH, en términos de producción de cortisol, disminuye en un 50% respecto de los controles. Se observó además una potenciación de la esteroideogénesis estimulada por ACTH al estimular eléctricamente el nervio esplácnico, pero tal efecto no se detecta en ausencia del estímulo trófico (Eduards y Jones, 1987).

Se ha observado que la variación en los niveles circulantes de LH produce cambios en el número de receptores de LH en células de Leydig, fenómeno que se conoce como regulación homóloga de este receptor (Sharpe, 1976, 1977; Hsueh y col, 1976, 1977). La disminución en el número de receptores que se observa luego de la administración de altas dosis de LH (desensibilización de células de Leydig) parecería deberse a

la internalización y degradación del receptor (Ascoli, 1985). En la rata que sufrió desnervación testicular no se encontraron modificaciones en los niveles séricos de LH, que pudieran justificar la disminución observada en el número de receptores de LH por mecanismos similares a los que ocurren en la regulación homóloga de este receptor.

Los testículos que sufrieron regulación negativa de los receptores de LH por administración de altas dosis de esta misma hormona presentan una menor producción de testosterona ante un estímulo máximo así como también una menor sensibilidad a la gonadotropina. En este caso también los cambios observados no pueden explicarse como consecuencia de la caída en el número de receptores ya que la disminución en la producción de testosterona se observó no solo cuando las células se exponen a concentraciones saturantes de hCG sino también al estimular directamente la producción de AMPc con drogas como la toxina colérica (Tsuruhara y col, 1977; Saez y col, 1978; Cigorruga y col, 1978; Melner y Abney, 1980). Se ha demostrado que la menor respuesta en términos de producción de testosterona que presentan las células de Leydig desensibilizadas se debe principalmente a la disminución en la actividad de la  $17\alpha$ -hidroxilasa y la C17-C20 liasa, inducida por la administración de hCG o LH, lo que se conoce como lesión

esteroidogénica tardía (Catt y col. 1980, Tsuhara y col 1977, Chasalow y col 1979; O'Shaughnessy y col, 1982; Brinkman y col, 1982, 1981). En animales inyectados con dosis más altas de hCG se desarrollan otras lesiones conocidas como lesiones tempranas que afectan los pasos previos a la formación de pregnenolona (Catt y col, 1980; Cigorruga y col, 1978; Nozu y col, 1981).

En el modelo utilizado en este trabajo no se observaron cambios en los niveles circulantes de LH que pudieran justificar los cambios observados en el número de receptores de LH tal como ocurre en la desensibilización.

Si bien existen numerosas controversias acerca de la acción de la PRL sobre diversos aspectos de la actividad del testículo, es claro que esta hormona hipofisaria participa en la regulación de los receptores de LH testiculares. Se ha demostrado que el tratamiento con PRL estimula el receptor de LH en ratones enanos (Bohnet y Friesen, 1976), en ratas hipofisectomizadas (Zipf y col, 1978; Purvis y col, 1979) y durante el fotoperiodo corto en el hamster (Bex y col 1978). Sin embargo, Ota y col, (1986) encontraron que una única inyección de PRL no modifica los niveles séricos de LH, pero disminuye los receptores testiculares de LH en función del tiempo y de manera dosis dependiente.

En el presente modelo experimental no se observaron cambios en los niveles circulantes de PRL que pudieran asociarse a la disminución del número de receptores de LH luego de 10 días de la desnervación.

Por otro lado Preslock y McCann (1985) observaron que la ligadura bilateral del vas deferens provoca dramáticos cambios en los niveles plasmáticos de LH, FSH y PRL luego de 24 horas que en el caso de FSH persisten hasta una semana después de la cirugía.

A partir de estas observaciones los autores sugieren que podría existir una conexión directa entre el testículo y el SNC que controlaría la secreción de LH, FSH y PRL. En el presente trabajo, al interrumpir bilateralmente la vía de inervación superior del testículo no se observaron cambios en los niveles plasmáticos de las hormonas hipofisarias. Coincidiendo con estos resultados se observó que una semana después de la sección del nervio ovarico superior no se modifican los niveles séricos de LH, FSH, PRL o GH en ratas prepuberales (Aguado y Ojeda, 1984).

El mecanismo por el cual la desnervación afecta al receptor de LH en las células de Leydig no puede especularse solamente a partir de los presentes resultados. Sin embargo, el hecho de que no se observen cambios simultáneos a nivel

del receptor testicular de PRL el cual se localiza también en las células de Leydig (Charreau, 1977), indica que los cambios en la membrana de dichas células desencadenados por la desnervación afectan selectivamente a los receptores de LH pero no a los de PRL. En este sentido es interesante destacar que la internalización de receptores de LH provocada por dosis desensibilizantes de esta hormona es acompañada por la internalización conjunta del receptor de PRL (Davis y col, 1980). Los mecanismos propuestos para el caso de regulación homóloga negativa del receptor de LH no serían los mismos que ocurren en el testículo desnervado. En este caso la variación observada por desnervación podría ser producto de un reordenamiento de la membrana plasmática. Como se mencionara anteriormente, no puede descartarse el hecho de que existan pequeñas modificaciones en el flujo sanguíneo testicular, ocasionadas por la desnervación. Tales variaciones podrían haber modificado el aporte de LH y otros factores circulantes involucrados en el regulación de la célula de Leydig, y sea ésta la causa de los cambios observados.

Los tejidos blanco de una determinada hormona se encuentran frecuentemente separados, de a pares, como las gonadas o adrenales, o a veces constituyen un órgano bilobulado, como en

el caso de la tiroides. Es de esperar que cada lóbulo o cada miembro de un par respondan de manera similar ante un estímulo hormonal trófico o al perturbar los mecanismos de retroalimentación negativa. Sin embargo, existen situaciones en que tales expectativas no se cumplen. En los últimos años han surgido evidencias que apoyan el concepto de lateralización de los mecanismos neuroendócrinos que controlan las respuestas de ovario y testículo a las gonadotrofinas, tanto a nivel central (Nance, 1983; Fukuda, 1984; Mizunuma, 1983) como periférico.

Chaves y col. (1987), observaron que en ratas unilateralmente ovariectomizadas el ovario derecho muestra mayor capacidad que el izquierdo en mantener la ovulación normal. Por otro lado, se observó que la vagotomía bilateral en ratas hemicastradas inhibe parcialmente la hipertrofia compensatoria solamente en el caso en que el ovario izquierdo permanecía in situ. Los mismos autores sugieren que el nervio vago transportaría diferente información por sus ramas derecha e izquierda, lo que explicaría las asimetrías observadas.

En lo que respecta al testículo, Frankel y col (1984), observaron que la respuesta testicular a la hemicastración, es decir la duplicación de la concentración de testosterona en la vena testicular que ocurre 24 horas después de la hemicastración, era asimétrica. Dicha respuesta, que se encuentra



bajo control neural (Frankel y col., 1984) es más importante y consistente cuando al hemicastrar se extirpa el testículo izquierdo. Teniendo en cuenta estos antecedentes se estudió si el efecto de la desnervación sobre los receptores de LH dependía del lado en que se realizaba la desnervación. El análisis de los resultados obtenidos reveló que la magnitud de la caída en el número de receptores es independiente del lado en que se efectuó la desnervación.

Es probable que la disminución del tono catecolaminérgico producido por desnervación sea en parte responsable de los efectos observados sobre la esteroidogénesis testicular. Tal como se comentara en la Introducción, se ha demostrado que la presencia de catecolaminas en el medio de incubación produce una pequeña estimulación de la producción de testosterona por testículos enteros (Moger y col, 1982; Anakwe y Moger, 1984a). Las catecolaminas ejercen un importante efecto estimulador sobre la producción de andrógenos por células de Leydig de ratón luego de 24 horas en cultivo y este efecto no se observa en preparaciones frescas de dichas células (Cooke y col, 1982; Moger y col, 1982; Moger y Murphy, 1983). Mediante estudios bioquímicos (Anakwe y col, 1985) y funcionales (Anakwe y Moger, 1984; Moger y col, 1982) se ha descrito que las

células de Leydig de rata adulta poseen receptores  $\beta$  adrenérgicos del subtipo  $\beta_2$ . Sin embargo, tal como se observó para el ratón, las células de Leydig de rata deben permanecer durante 3 horas en cultivo para que se evidencie el efecto estimulador de las catecolaminas sobre la producción de testosterona (Anakwe y col, 1985). En cambio se observó que preparaciones frescas de células de Leydig de rata (Anakwe y Moger, 1980) y ratón (Cooke y col, 1982) producen AMPc en respuesta a isoproterenol, indicando que existiría un bloqueo o una lesión en un sitio posterior a la formación de AMPc. Es sabido que tanto la LH como el isoproterenol estimulan la producción de andrógenos a través de la formación de AMPc como segundo mensajero intracelular (Cooke y col, 1982). El hecho de que la LH, pero no el isoproterenol, estimule la producción de andrógenos por células frescas muestra un acoplamiento diferencial del AMPc a la esteroidogénesis en respuesta a los dos agonistas. Es probable que el AMPc formado en respuesta al isoproterenol este compartimentalizado en un "pool" intracelular que no es inmediatamente accesible a las proteínas receptoras de AMPc que están acopladas a la esteroidogénesis (Anakwe y Moger, 1986). Se ha sugerido que la alteración que se observa luego de la formación de AMPc pudo ocasionarse durante el aislamiento de las células y luego en el cultivo se

restablecería el mecanismo completo de estimulación de la esteroidogénesis por los agonistas  $\beta$  adrenérgicos. Existen numerosas evidencias de que el proceso de aislamiento puede causar daños que modifican la capacidad de respuesta de las células de Leydig. Es importante mencionar que determinados protocolos de dispersión y purificación de células de Leydig disminuyen la respuesta, en términos de AMPc y testosterona, a un estímulo de LH (Aldred y Cooke, 1982, 1983; Molenaar y col, 1983).

Coincidiendo con los antecedentes de otros grupos, en las condiciones de trabajo de los presentes experimentos tampoco se observó una estimulación significativa en preparaciones de células frescas de animales adultos. No obstante, se observó que las suspensiones células intersticiales de ratas púberes producen andrógenos en respuesta al isoproterenol. Probablemente en este estadio de maduración el aislamiento de células intersticiales no provoque las mismas alteraciones que se observan en el animal adulto.

Las células intersticiales provenientes de testículos desnervados a los 30 días de edad, mostraron una menor respuesta que las controles ante el estímulo del isoproterenol. Esta subsensibilidad en la respuesta coincide con la disminución en el número de receptores  $\beta$  adrenérgicos obser-

vada 10 días después de la desnervación testicular. Los cultivos celulares, en los que se puede controlar las concentraciones de agonistas adrenérgicos del medio, permiten simular las condiciones de desnervación in vivo. Es importante mencionar que el número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos de las células de Leydig desciende notablemente a las 3 horas de cultivo y sigue disminuyendo gradualmente durante las primeras 48 horas (Anakwe y Moger, 1986).

Contrariamente a lo que ocurre en testículo, se observó que el número de receptores  $\beta$  adrenérgicos en el ovario aumenta casi dos veces una semana después de la sección del nervio ovarico superior. (Aguado y col. 1984). El desarrollo de supersensibilidad esta precedido por una etapa de subsensibilidad, así 48 horas después de la desnervación total del ovario se observó una caída importante en el número de receptores  $\beta$  adrenérgicos (Marchetti y col, 1987). El cultivo células de la granulosa, que simularia in vitro la disminución del tono adrenérgico que ocurre en la desnervación, provoca un aumento en el número de receptores  $\beta$  (Kliachco y Zor, 1981) que puede revertirse mediante el agregado de NE o E al medio de cultivo. Evidentemente los cambios en el número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos que se observan por desnervación del testículo no son comparables a los que ocurren en el ovario.

El número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en células de Leydig aumenta progresivamente a medida que el animal alcanza su madurez sexual, lo que permite sugerir que durante el desarrollo el sistema nervioso eferente participaría en la regulación de la respuesta testicular a los estímulos gonadotróficos. Las alteraciones en la respuesta esteroidogénica a hCG, en los receptores de LH y  $\beta$ -adrenérgicos observadas luego de la desnervación fueron comparables en el caso de estudiar animales desnervados en la etapa prepuberal o adulta. Este hecho indica que en estas dos etapas del desarrollo sexual, la rata presenta una sensibilidad comparable frente a la desnervación.

Recientemente, Damber (1990) estudió el efecto de la simpatectomía inducida por guanetidina, en ratas adultas. Dicho tratamiento no alteró el flujo sanguíneo testicular, ni los niveles plasmáticos e intratesticulares de testosterona. En cambio, los niveles del andrógeno luego de la administración in vivo de hCG estaban disminuidos en los animales simpatectomizados, coincidiendo con los resultados in vitro descriptos en esta Tesis.

Los importantes cambios observados en los receptores testiculares de LH y receptores  $\beta$ -adrenergicos en células de Leydig luego de la desnervación apoyan la hipótesis que el testículo, fundamentalmente regulado por factores hormonales, se encuentra además bajo el control directo del SNC a través de vías neuronales específicas.

**CONCLUSIONES**

- Las células intersticiales de ratas de 15 días de edad presentan fluorescencia específica inducida por ácido glioxílico. El parénquima de animales púberes y adultos contiene escasas células con intensos gránulos fluorescentes. La cápsula testicular tiene abundantes fibras fluorescentes.
- Las catecolaminas y la 5-HT presentes en el testículo se encuentran igualmente distribuidas: en cápsula, células intersticiales y líquido intersticial, no detectándose las mismas en las preparaciones de túbulos seminíferos.
- La rama nerviosa que se origina en el plexo renal contiene 5-HT. La sección de dicho nervio ocasiona una disminución significativa en el contenido de 5-HT en cápsula y líquido intersticial.
- La 5-HT inhibe la producción de andrógenos in vitro tanto en condiciones basales como en presencia de un estímulo gonadotrófico. En el sector intersticial hay sitios de unión específica para  $^3\text{H}$ -5-HT, de tipo 5-HT<sub>2</sub>.
- La sección del nervio espermático superior ocasiona una caída en el contenido capsular de NE, una inhibición de la producción in vitro de andrógenos en respuesta al estímulo de

hCG y un descenso en el número de receptores testiculares de LH , sin cambios en la afinidad de los mismos. El peso y la organización histológica del testículo desnervado estan conservados y los niveles séricos de andrógenos y hormonas hipofisarias se mantienen dentro de los valores normales.

- El número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en células de Leydig disminuye en un 50% diez días después de la desnervación y las células intersticiales desarrollan subsensibilidad al estímulo  $\beta$ -adrenérgico.

- El número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en células de Leydig aumenta progresivamente a lo largo de la maduración sexual de la rata.

J. S. F.

W. Blau

Almúndico



## REFERENCIAS

- Abayaskeara DRE, Kurlak LO, Cooke BA, Jeremy JY, Dandona P, Sharpe RM. (1988) Role of arachidonic acid metabolites in mediating the hCG-induced increases in interstitial fluid volume in rats. En: The molecular and cellular endocrinology of the testis. BA Cooke and RM Sharpe (eds) Serono symposium. vol 50 Raven Press N.Y. p 143.
- Aguado LI, Ojeda SR (1984) Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. *Endocrinology* 114: 1845.
- Aguado LI, Ojeda SR (1984) Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology* 114: 1944.
- Ahlquist RP (1948) A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* 153: 586.
- Ahren B. (1986) Thyroid neuroendocrinology: neural regulation of thyroid hormone secretion. *Endocr. Rev.* 7: 149
- Arhen B, Taborsky GJ (1986) The mechanism of vagal nerve stimulation of glucagon and insulin secretion in the dog. *Endocrinology* 118: 1551.
- Albert DH, Ascoli M, Puett D, Coniglio JG (1980) Lipid composition and gonadotropin-mediated lipid metabolism of the M5480 murine cell tumor. *J.Lipid Res.* 21: 862.
- Aldred LF, Cooke BA (1983) The effect of cell damage on the density and steroidogenic capacity of rat testes Leydig cells, using an NADH exclusion test for determination of viability. *J. Steroid Biochem.* 18: 411.
- Aldred LF, Cooke BA (1982) The deleterious effect of mechanical disassociation of rat testes on the functional activity and purification of Leydig cells using Percoll gradients. *Int. J.Androl* 5:191.
- Alm P, Alumets J, Hakanson R, Owman Ch Sjoberg N-O, Stjernquist M, Sundler F (1981) Enkephaline-immunoreactive nerve fibres in the feline genito-urinary tract. *Histochemistry* 72:351.

- Anakwe OO, Moger WH (1984b)  $\beta_2$ -adrenergic stimulation of androgen production by cultured mouse testicular interstitial cells. *Life Science* 35:2041.
  
- Anakwe OO, Moger WH. (1986) Catecholamine stimulation of androgen production by rat Leydig cells. Interactions with luteinizing hormone and luteinizing hormone releasing hormone. *Biol.Reprod.* 35: 806.
  
- Anakwe OO, Moger WH. (1984a) Ontogeny of rodent testicular androgen production in response to isoproterenol and luteinizing hormone in vitro. *Biol.Reprod.* 30: 1142.
  
- Anakwe OO, Murphy PR, Moger WH. (1985) Characterization of  $\beta$ -adrenergic binding sites on rodent Leydig cells. *Biol.Reprod.* 33:815.
  
- Aoki A, Fawcett DW (1978) Is there a local feedback from the seminiferous tubules affecting activity of the Leydig cell. *Biol. Reprod.* 19: 144.
  
- Aragona C, Frisen HG. (1975) Specific prolactin binding sites in the prostate of rats. *Endocrinology* 97: 677.
  
- Ascoli M. (1982) Internalization and degradation of receptor bound human chorionic gonadotropin in Leydig tumor cells. *J.Biol. Chem.* 257, 13306.
  
- Ascoli M. (1985) Regulation of luteinizing hormone receptors and actions. In: Luteinizing hormone action and receptors. Ascoli M (ed) CRC Press Florida. p199.
  
- Audhya T, Schlesinger D, Hutchinson B, Brown C, Hollander CS. (1987) Corticotropin releasing factor in the testis is structurally identical to that in the hypothalamus and is localized to the Leydig cell. *Clin. Res.* 35: 645.
  
- Axelsson S, Bjorklund A, Falk B, Lindvall O, Svensson LA. (1973) Glyoxylic acid condensation: A new method for the histochemical demonstration of biogenic monoamines. *Acta Physiol. Scand.* 89: 57.

- Bardin CW, Cheng CY, Musto NA, Gunsalus GL. (1988). The Sertoli cell. En: The physiology of reproduction. Knobil E, Neil J (eds)  
Raven Press N.Y. p. 933.
  
- Bardin CW, Shaha C, Mather J, Salomon Y, Margioris AN, Liotta AS, Gerendai I, Chen CL Krieger DT. (1984) Identification and possible function of pro-opiomelanocortin-derived peptides in the testis. *Annls N.Y. Acad. Sci.* 438: 346.
  
- Bartke A, Klemcke H, Matt K. (1985) Effects of physiological and abnormally elevated prolactin levels on the pituitary-testicular axis. *Med.Biol* 63: 264.
  
- Bartke A. (1971) Effects of prolactin and luteinizing hormone on the cholesterol stores in the mouse testis. *J.Endocr.* 49: 317.
  
- Baumgarten HG, Holstein AF. (1968) Adrenerge innervation im Hoden und Nebenhoden vom Schwan. *Z.Zellforsch.Mikroskop. Anat.* 91:402.
  
- Baumgarten HG, Holstein AF. (1967) Catecholaminhaltige Nervenfasern im Hoden des Menschen. *Z.Zellforsch.Mikroskop.Anat.* 79: 398.
  
- Bell A, Mc Lean JR (1973) The autonomic innervation of the rat testicular capsule. *J.Reprod.Fert.* 32:253.
  
- Bellve AR, Feigg LA (1984) Cell proliferation in the mammalian testis . Biology of the seminiferous growth factor (SGF). *Rec. Prog. Horm.Res.* 40: 531.
  
- Bergh A. (1982) Local differences in Leydig cell morphology in the adult rat testis : evidence for a local control of Leydig cells by adjacent seminiferous tubules. *Int.J.Androl.* 5: 325.
  
- Bergh A. (1983) Paracrine regulation of Leydig cell by the seminiferous tubules. *Int.J.Androl.* 6: 57.
  
- Bex FJ, Bartke A, Goldman BD, Dalterio S. (1978) Prolactin, growth hormone receptors and seasonal changes in testicular activity in the golden hamster. *Endocrinology* 103, 2069.

- Bliss EL, Frischat A, Samuels L. (1972) Brain and testicular functions. *Life Sci.* 11:231.
- Bobbioni E, Marre M, Helman A, Assan R. (1983) The nervous control in rat glucagon secretion in vivo. *Horm. Met. Res.* 15: 133.
- Bocabella AV, Salgado ED, Alger EA. (1962) Testicular function and histology following serotonin administration. *Endocrinology* 71: 827.
- Bohnet HG y Friesen HG (1976) Effect of prolactin and growth hormone on prolactin and LH receptors in dwarf mouse *J.Reprod Fertil* 48: 307.
- Boitani C, Ritzen EM, Parvinen M. (1981) Inhibition of rat Sertoli cell aromatase by factors secreted specifically at spermatogenesis stages VII and VIII. *Molec cell. Endocr.* 23: 11.
- Brinkman A, Leemborg I, Rommerts F y Van der Molen H (1982) Translocation of the testicular estradiol receptor is not an obligatory step in the gonadotropin-induced inhibition of C17-C20-lyase. *Endocrinology* 110: 1834.
- Brinkman AO, Leemborg FG, y Van der Molen HJ (1981) hCG-induced inhibition of testicular steroidogenesis: an estradiol-mediated process? *Mol.Cell Endocrinol.* 105: 431.
- Burden HW, Lawrence IE.(1977) The effect of denervation on compensatory ovarian hypertrophy. *Neuroendocrinology* 23:368-378.  
(1985) Evidence that  $\beta$ -endorphin binds to specific receptors in rat peripheral tissues and stimulates the adenylate cyclase-adenosine 3'5'-monophosphate system. *Endocrinology* 117: 1389.
- Burden HW, Lawrence IE, Smith CP, Hoffman J, Leonard M, Fletcher DJ, Hodson CA. (1986) The Effects of vagotomy on compensatory ovarian hypertrophy and follicular activation after unilateral ovariectomy. *The Anatomical Record* 214: 61.
- Burden HW. (1978) Ovarian innervation. En: *The vertebrate ovary.* Jones R (eds) N. Y. Plenum Press. p 615.

- Calandra RS, Barañao JLS, Bertini L, Calvo JC, Charreau EH, Chiauzzi VA, Suescun MO, Tesone M. (1982) Effects of PRL on the male gonad and sex accessory organs. En *Physiopathology of hypophyseal disturbances and diseases of reproduction*. Vol87. De Nicola AF, Blaquier JA, Soto R (eds) Alan Liss, Inc. N.Y. p. 87.
  
- Calvo, JC. Comunicación personal, 1982.
  
- Campos MB, Marengo FD, Calandra RS, Ritta MN. Modulación hormonal del contenido testicular de GABA. XXXIV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Nov. 1989.
  
- Cardinali DP, Ladizesky (1985) Changes in parathyroid hormone and calcium levels after superior cervical ganglionectomy of rats. *Neuroendocrinology* 40: 291.
  
- Cardinali DP, Romeo HE (1990) Peripheral neuroendocrine interrelationships in the cervical region. *NIPS*: 5: 100.
  
- Catt, KJ, Dufau ML (1973) Spare gonadotropin receptors in rat testis. *Nature New Biol* 244:219.
  
- Catt KJ, Harwood JP, Clayton RN, Davies TF, Chan V, Katikineni M, Nozu K. y Dufau ML. (1980) Regulation of peptide hormone receptors and gonadal steroidogenesis. *Rec Prog Hormone Res* 36:557.
  
- Charreau EH, Attramadal A, Torjesen PA, Purvis K, Calandra RS, Hanson V. (1977) Prolactin binding in rat testis: Specific receptors in interstitial cells. *Molec.Cell.Endocr.* 6: 303.
  
- Charreau EH, Calvo JC, Tesone M, Biella de Souza Valle L, Barañao JL(1978) Insulin regulation of Leydig cell LH receptors. *J. Biol. Chem.*; 253: 2504.
  
- Chasalow F, Marr H, Haour F y Saez JM (1979) Testicular steroidogenesis after human chorionic gonadotropin desensitization In rats. *J.Biol.Chem* 254: 5613.

- Chavés R, Cruz ME, Dominguez R. (1987) Differences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: effect of ipsi- and contralateral vagus nerves on the remaining ovary J.Endocrinol 113: 397.
- Chen YI, Kraemer FB, Reaven GM. (1980) Identification of specific HDL-binding sites in rat testis. J.Biol.Chem 255: 9162.
- Chiauuzi VA, Cigorraga SB, Escobar ME, Rivarola MA, Charreau EH. (1982) Inhibition of FSH by circulating immunoglobulins. J. Clin. Endocrinol. Metab. 54: 1221.
- Chiocchio SR, Vacas I, Cardinali DP, Tramezzani JH. (1984) Early depression of post castration rise of gonadotropin after superior cervical ganglionectomy of male rats. Brain Res. 309: 354.
- Christensen K. (1975) Leydig cell. En: Handbook of physiology Section 7 vol 5 Cap 3 Ed Geifer, SR). p. 57.
- Cigorraga SB, Dufau ML y Catt KJ (1978) Regulation of luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in gonadotropin-desensitized Leydig cells. 253: 4297.
- Clark RV. (1976) Three dimensional organization of testicular interstitial tissue and lymphatic space in the rat. Anat Rec. 184: 203.
- Clegg EJ, Macmillan A. (1965). The uptake of vital dyes and particulate matter by the Sertoli cells of the rat testis. J.Anat.London, 99: 219.
- Clermont Y, Le Blond CP, Messier B. (1959) Durée de cycle de l'épithélium séminal du rat. Arch. Anat. Micro. Morph. Exp. 48: 37.
- Cooke BA, Golding M, Dix CJ Hunter MG. (1982) Catecholamine stimulation of testosterone production via cyclic AMP in mouse Leydig cells in monolayer culture. Mol.Cell. Endocr. 27: 221.

- Corona GL. (1953) L'innervazione della vaginale propria del testicolo. *Z.Anat.Entwicklungsgeschichte* 117: 306.
- Corpéchet C, Baulieu E-E, Robel P. (1981) Testosterone, dihydrotestosterone and androstenediols in plasma, testes and prostates of rats during development. *Acta Endocrinologica* 96: 127.
- Costa E, Neff NH. (1970) Estimation of turnover rates to study the metabolic regulation of the steady state level of neuronal monoamines. En: *Handbook of Neurochemistry*. A.Lajthe (ed) Plenum Press, New York p.45.
- Coujard R (1952) Effects sur le testicule et l'épididyme de la phenolisation de fibres nerveuses. *C.R.Soc.Biol.* 146: 704.
- Curry TE, Lawrence IE, Burden HW. (1984) Effect of ovarian sympathectomy on follicular development during compensatory ovarian hypertrophy in the guinea pig. *J. Reprod. Fertil* 71: 39.
- Curry TE, Lawrence IE, Burden HW. (1985) Ovarian sympathectomy in the golden hamster: effects on estrous cyclicity and follicular development. *Exp. Clin. Endocr.* 86: 284.
- Curzon G, Green R. (1970) Rapid method for the determination of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in small regions of the rat brain. *Br. J. Pharmacol* 39 653.
- Da Prada M, Zürcher G. (1976) Simultaneous radioenzymatic determination of plasma and tissue adrenalin, noradrenalin and dopamine within the femtomole range. *Life Sci.* 19: 1161.
- Dail WG, Moll MA, Weber K (1983) Localization of vasoactive intestinal polypeptide in penile erectile tissue and in the major pelvic ganglion of the rat. *Neuroscience* 10: 1379.
- Dallman MF, Engeland WC, Shinsako J (1976) Compensatory adrenal growth, a neurally mediated reflex. *Am.J.Physiol* 231:408.
- Dallman MF, Engeland WC, Holzwarth MA. (1977) The neural regulation of compensatory ovarian growth. *Ann. NY Acad Sci* 297: 373.



- Damber E, Janson PO (1978) The effects of LH, adrenaline and noradrenaline on testosterone concentrations in anaesthetized rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*88: 390.
  
- Damber JE, Bergh A, Daehlin L. (1985) Testicular blood flow, vascular permeability and testosterone production after stimulation of unilateral cryptorchid adult rats with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 117:1906.
  
- Damber JE, Lindahl O, Selstam G Tenland T. (1982) Testicular blood flow measured with a laser Doppler flowmeter: acute effects of catecholamines. *Acta physiol.Scand* 115: 209.
  
- Damber JE, Widmark A, Bergh A. (1985) Changes of testicular vascular resistance after treatment of rats with an LH-RH-agonist. *Acta endocr. Copenh. Suppl.* 270: 205, Abstr.
  
- Damber E. (1990) The effect of guanetidine treatment on testicular blood flow and testosterone production in rats. *Experientia* 46: 486.
  
- Dave JR, Rubinstein N, Eskay RL. (1985) Evidence that  $\beta$  endorphin binds to specific receptors in rat peripheral tissues and stimulates the adenylate-cyclase-adenosine 3',5'-monophosphate system. *Endocrinology* 117: 1389.
  
- Davis JR, Langford GA, Kirby PJ. (1970) The testicular capsule. En: *The testis*. Vol 1 Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL (eds) p. 282.
  
- Davis TF, Katikineni M, Chau V, Harwood JP, Dufau ML, Catt KJ (1980) Lactogenic receptor regulation in hormone stimulated steroidogenic cells. *Nature* 283: 863.
  
- Dayan AD. (1970) Variation between species in the innervation of intra-testicular blood vessels. *Experientia* 26:1360.
  
- de Kretser DM, Kerr JB, (1988) The cytology of the testis. In : Knobil E, Neill J et al eds *The Physiology of Reproduction* . Raven Press, New York, vol 1 : 902.
  
- de la Torre LC, Surgeon JW. (1976) A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxylic acid technique: the SPG method. *Histochemistry* 41: 1.

- di Zerega GS, Sherins RJ. (1981) Endocrine control of adult testicular function. In: The testis. H.Burger, DM de Kretser(eds) Raven Press N.Y. p.127
- Dunning BE, Taborsky GJ. (1988) Galanin - Sympathetic neurotransmitter in endocrine pancreas? Diabetes 37 :1157.
- Dufau ML, Tsuruhara T, Horner KA, Podestá EJ, Catt KJ. (1977) Intermediate role of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and protein kinase during gonadotropin-induced steroidogenesis in testicular interstitial cells. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 74: 3419
- Dufau ML, Veldhuis J, Fraioli F, Johnson MH, Catt KJ (1983) Mode of bioactive LH secretion in man. J. Clin. Endocrinol.Metab. 57: 993.
- Dufau ML, Watanabe K, Catt KJ. (1973) Stimulation of cyclic AMP production by the rat testis during incubation with hCG in vitro. Endocrinology 92: 6.
- Dym M, Fawcett DW. (1970) The blood testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. Biol. Reprod. 3: 308
- Eduards AV, Jones CT, Bloom SR. (1986) Reduced adrenal cortical sensitivity to ACTH in lambs with cut splachnic nerves. J.Endocr. 110: 81.
- Eduards AV, Jones CT. (1988) Secretion of corticotrophin releasing factor from the adrenal during splachnic nerve stimulation in conscious calves. J. Physiol. 400: 89
- Eik-Nes KB (1969) An effect of isoproterenol on rates of synthesis and secretion of testosterone. Am.J. Physiol 271: 1764.
- Ellis LC, Jaussi AW, Baptista MW, Urry RL (1972) Correlation of age changes in monoamine oxidase activity and androgen synthesis by rat testicular minced and teased preparations in vitro. Endocrinology 90: 1610.

- Ellis LC. (1972) Inhibition of rat testicular androgen synthesis in vitro by melatonin and serotonin. *Endocrinology* 90: 17.
  
- Falk B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A. (1962) Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.* 10: 348.
  
- Favaretto ALV, Lamaano-Carvalho AL, Ferreira AL y Antunes-Rodrigues J. (1986) Effect of spermatic cord phenolization on the spermatogenic and secretory activities of the adult rat testes. *Brazilian J Med Biol Res* 19: 233.
  
- Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. (1973) Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.* 9: 500.
  
- Fawcett DW. (1975) Ultrastructure and function of the Sertoli cell. En: *Handbook of physiology* Section 7 vol 5 Cap 3 Ed Geifer, SR). p.21.
  
- Frankel AI, Chapman JC, Cook B. (1989) Testes are asymmetric in the testicular hemicastration response of the male rat. *J.Endocrinol* 122: 485.
  
- Frankel AI, Mock EJ, Chapman JC. (1984) Hypophysectomy and hemivasectomy can inhibit the testicular hemicastration response of the mature rat. *Biol.Reprod* 30: 804.
  
- Frankel AI, Ryan EL (1981) Testicular innervation is necessary for the response of plasma testosterone levels to acute stress. *Biol.Reprod.* 24: 491.
  
- Free MJ, Jaffe RA (1972a) Dynamics of circulation in the testis of the conscious rat. *Am.J.Physiol* 223: 241.
  
- Free MJ, Jaffe RA (1972b) Effect of prostaglandins on blood flow and pressure in the conscious rat. *Prostaglandins* 1: 483.
  
- Freedman DA, Ascoli M. (1983) The LDL pathway of cultured Leydig tumor cells. *Biochem. Biophys. Acta* 754: 72.

- Fukuda M, Yamanouchi K, Nakano Y, Furuya H, Arai Y. (1984) Hypothalamic laterality in regulation gonadotropic function: unilateral hypothalamic lesion and ovarian compensatory hypertrophy. *Neuroscience Letters* 51:365.
- Furness JB, Costa M. Distribution of intrinsic nerve cell bodies and axons which take up aromatic amines and their precursors in the small intestine of the guinea pig. (1978) *Cell tissue Research* 188: 527.
- Galil KAA. (1982) Effects of high environmental temperature on the testis. PhD. Thesis. University of Cambridge, Cambridge.
- Gerendai I, Marchetti B, Mauger S, Roxas MA, Scapagnini U. (1978) Prevention of compensatory ovarian hypertrophy by local treatment of the ovary with 6-hydroxydopamine. *Neuroendocrinology* 27: 272.
- Gerendai I. (1980) Unilateral complete isolation of the medial basal hypothalamus interferes with the compensatory ovarian growth following unilateral ovariectomy. *Neuroendocrinol. Lett.* 2: 39.
- Gershon MD, Dreyfus CF, Pickle VM, Joh TH, Reis DJ. (1977) Serotonergic neurons in the peripheral nervous system: Identification in gut by immunohistochemical localization of tryptophan hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 3086.
- Gotz F, Stahl F, Röhde W, Dorner G (1983) The influence of adrenaline on plasma testosterone in adult and newborn male rats. *Exp Clin Endoc* 81: 239.
- Gray DJ. (1947) The intrinsic nerves of the testis. *Anat Rec.* 98: 325.
- Greenberg J, Schubert W, Metz J, Yanaihara N, Forssmann W-G (1985) Studies of the guinea pig epididymis III: Innervation of epididymal segments. *Cell Tissue Res.* 239: 395.
- Grootegoed JA, Peters MS, Muller E, Rommerts FFG, Van Der Molen HJ. (1977) *Molec. Cell. Endocr.* 9: 159.

- Gu J, Polak JM, Probert L, Islam KN, Marangos PH, Mina S, Adrian TE, McGregor GO, O'Shaughnessy DJ, Bloom SR (1983) Peptidergic innervation of the human male genital tract J. Urol 130: 386.
- Guldenaar SEF, Pickering BT (1985) Immunocytochemical evidence for the presence of oxytocin in rat testis. Cell Tiss. Res. 240: 485
- Hakanson R, Sundler F, Uddman, R. (1982) En: Vasoactive Interstitial Peptide. S. Said ed. pp: 121-144, Raven Press NY.
- Hall PF, Charponnier C, Nakamura M, Gabbiani G. (1979) The role of microfilaments in the response of Leydig cells to luteinizing hormone. J. Steroid Biochem. 11: 1361.
- Hall PF, Eik Nes KB. (1962) The action of gonadotropic hormones upon rabbit testis in vitro. Biochem. Biophys. Acta 63: 411.
- Hall PF, Eik Nes KB. (1963) The influence of gonadotropin in vivo upon the biosynthesis of androgens by homogenate of rat testis. Biochem. Biophys. Acta 71: 438.
- Hall PF, Sozer CC, Eik Nes KB. (1964) Formation of dehydroepiandrosterone during in vivo and in vitro biosynthesis of testosterone by testicular tissue. Endocrinology 74: 35.
- Hall PF. (1963) The effect of interstitial cell-stimulating hormone on the biosynthesis of testicular cholesterol from acetate-1-C<sup>14</sup>. Biochemistry 2: 1232.
- Hamon M, Bourgoin S, Artaud F, El Mestikaway S. (1981) The respective roles of tryptophan uptake and tryptophan hydroxylase in the regulation of serotonin synthesis in the central nervous system. Journal of Physiology (Paris) 77: 269.
- Hansson V, Calandra RS, Purvis K, Ritzen M, French FS (1976) Hormonal regulation of spermatogenesis. En: Vitamins and Hormones  
Munson PL, Diczfalusy E, Glover J, Olson RE (eds) Academic Press p. 187.

- Heath H. (1980) Biogenic Amines and the secretion of parathyroid hormone and calcitonin. *Endocrine Rev.* 1: 319
- Heinddel JJ, Steinberger A, Strada SJ (1981) Identification and characterization of a  $\beta_1$  adrenergic receptor in the rat Sertoli cell. *Mol. Cell. Endocrinol.* 22: 349.
- Hertel C, Staehelin M. (1983) Reappearance of  $\beta$  adrenergic receptors after isoproterenol treatment in intact C6-cells. *J. Cell. Biol.* 97: 1538.
- Hodson N (1965) Sympathetic nerves and reproductive organs in the male rabbit. *J.Reprod.Fertil.* 10: 209.
- Hodson N. (1970) The nerves of the testis epididymis and scrotum. En: the testis vol 1. Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL (eds) pp 47.
- Hökfelt T, Elfvin LG, Elde R, Schultzberg M, Goldstein M, Luft R. (1977) Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons. *Proc. Natl. Acad Sci* 74: 3587.
- Hsueh AJW, Dufau ML, Catt KJ. (1977) Gonadotropin-induced regulation of luteinizing hormone receptors and desensitization of testicular 3':5'-cyclic AMP and testosterone responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 592.
- Hsueh AJW, Dufau ML, Catt KJ. (1976) Regulation of luteinizing hormone receptors in testicular interstitial cells by gonadotropin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 72: 1145.
- Humphrey PPA (1984) Peripheral 5-hydroxytryptamine receptors and their classification. *Neuropharmacology* 23: 1503.
- Janszen FHA, Cooke BA, Van der Molen HJ. (1977) Specific protein synthesis in isolated rat Leydig cells. Influence of LH and cycloheximide. *Biochem. J.* 162: 341.

- Johnson AD, Turner PC (1972) Early actions of cadmium in the rat and domestic fowl. VI. Testicular and muscle blood flow changes. *Comp. Biochem. Physiol* 41: 451.
- Juniewicz PE, Johnson BH (1983) Phenotypic variation in testosterone and luteinizing hormone production among boars: differential response to gonadotropin releasing hormone and adrenocorticotrop hormone. *Biol.Reprod.* 29: 464.
- Juniewicz PE, Johnson BH (1981) Influence of adrenal steroid upon testosterone secretion by the boar testis. *Biol.Reprod.* 25: 725.
- Kalla NR (1979) Demonstration of direct effect of serotonin on rat Leydig cells. *Andrologia* 11: 259.
- Kamberi IA, Mical RS, Porter JC. (1971) Effects of melatonin and serotonin on the release of FSH and prolactin. *Endocrinology* 88: 1288.
- Kanson BG, Hsueh AJW (1985) Nicotinic cholinergic agonists inhibit androgen biosynthesis by cultured rat testicular cells. *Endocrinology* 117: 1874.
- Kierszenbaum AL, Spruill WA, White MG, Tres, LL, Perkins JP. (1985) Rat Sertoli cell acquire a  $\beta$  adrenergic response during primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 2049.
- King AB, Langworthy OR. (1940) Effects of denervation on testicular morphology in cats. *J. Urol.*44: 74.
- Kleitman N, Holzwarth MA. (1985) Compensatory adrenal growth is inhibited by sympathectomy. *Am. J. Physiol.* 248: E261-E263.
- Kliachco S, Zor U. (1981) Increase in catecholamine-stimulated cyclic AMP and progesterone synthesis in rat granulosa cells during primary culture. *Mol. Cell.Endocrinol.* 23: 23.
- Koch DD, Kissinger DT. (1973) Determination of tryptophan and several metabolites in physiological samples by reverse phase chromatography with electrochemical detection. Dept. Chemistry. Purdue Univ. West Lafayette In.

- Koji M, Yamamoto M, Mitsuya H. (1986) Pharmacological and histological evidence for adrenergic innervation of the myoid cells in the rat seminiferous tubule. *Tohoku J. exp. Med.* 149: 79.
  
- Kormano M, Karhunen P, Kahanpaa K. (1968) Effect of long term 5-hydroxytryptamine treatment on the rat testis. *Ann. Med. Exp. Fenn.* 46: 474.
  
- Kormano M, Pentilla A. (1968) Distribution of endogenous and administered 5-hydroxytryptamine in the rat testis and epididymis. *Ann. Med. Exp. Fenn.* 46: 468.
  
- Krishna A, Terranova (1985) Alterations in mast cells degranulation and ovarian histamine in the proestrous hamster. *Biol. Reprod.* 32: 1211.
  
- Kuhn-Velten N, Wolff J, Passia D, Staib W. (1982) Determination of non specific esterase activity in rat testis interstitial cells: a marker for evaluation of Leydig cell purification procedure and of cell viability during incubation and continuous superfusion. *Cell. Mol. Biol.* 28: 473.
  
- Kuntz A (1919) Experimental degeneration in the testis of the dog. *Anat. Rec.* 17: 221.
  
- Kuntz A, Morris RE. (1946) Components and distribution of the spermatic nerves and the nerves of the vas deferens. *J. Comp. Neurol.* 85: 33.
  
- Lacau de Mengido IM, Becú-Villalobos D, Díaz G, Libertum C. (1989) Chronic Activation of dopamine receptors in the female infantile rat: effect on hypophyseal hormones and on the onset of puberty. *Endocrinology* 124: 746.
  
- Lacroix M, Parvinen M, Fritz IB (1981) Localization of testicular plasminogen activator in discrete portions (Stages VII and VIII) of the seminiferous tubule. *Biol. Reprod.* 25: 143.
  
- Langley, J.N. (1897) On the regeneration of preganglionic and postganglionic visceral nerve fibers. *J. Physiol.* (London) 22, 215.
  
- Larsen JJ, Ottensen B, Fahrenkrug J, Fahrenkrug L (1981) Vasoactive intestinal peptide (VIP) in the male genitourinary tract. Concentration and motor effect. *Invest. Urol.* 19: 211.



- Larsson LI, Fahrenkrug J, Schaffalitzky de Muckadell OB (1977) Occurrence of nerves containing vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in the male genital tract. *Life Science* 21:503.
- Le Blond CP, Clermont Y (1952) Definition of stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat. *Ann.N.Y. Acad. Sci* 55: 548.
- Lee W, Schwall R, Mason AJ, Mather JP (1988). Interstitial cell cultures secrete an activity with characteristics of the inhibin  $\beta$ - $\beta$  homodimer, activin. En : *The molecular and cellular endocrinology of the testis*. BA Cooke and RM Sharpe (eds) Serono symposium. vol 50 Raven Press N.Y. p 21.
- Lefkowitz RJ, Stadel JM, Cerione RA, Strulovici, Caron MG (1984) Structure and function of  $\beta$ -adrenergic receptors: regulation at the molecular level. En: *Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research*. P Greengard (ed). Raven Press, N.Y. p 19.
- Levin J, Lloyd CW, Lobotsky J, Friedrich EH (1967) The effect of epinephrine on testosterone production . *Acta Endocr (Copenh)* 55: 184.
- Levy H, Wendler DH , Rubin BL (1959) Observation on steroid  $3\beta$ -ol dehydrogenase activity in steroid producing glands. *J. Histochem Cytochem* 7, 320.
- Leysen JE (1984) Serotonin receptor binding sites: localization and rol in the brain and peripheral tissues. En: *Progress in tryptophan and serotonin research*. Schlossberger HG (ed). Walter Gruyter and Co. Berlin, p. 189.
- . LI CC. (1964) *Introduction to experimental statistics*. Mc Graw Hill, N.Y.
- Liptrap RM, Raeside JI, (1975) Increase in plasma testosterone concentration after injection of adrenocorticotrophin into the boar. *J.Endocr.* 66: 123.
- Liu Ch, Kinson GA. Testicular gametogenic and endocrine responses to melatonin and serotonin peripherally administered to mature rats. (1973) *Contraception* 7: 153.

- Loewy AD. (1990) Anatomy of the autonomic nervous system: an overview. En: Central regulation of autonomic functions. Loewy AD, Spyer KM (eds). Oxford University Press, N.Y. p.3.
- Lombard-des-Gouttes MN, Falck B, Owman Ch, Rosengren E, Sjöberg NO, Walles B. (1974) On the content and distribution of amines in the testis during development. *Endocrinology* 95: 1746.
- Lowry OH, Rosenbrough NL, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- Lundberg JM, Terenius L, Hökfelt T, Goldstein M (1983). High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci. Lett.* 42:167.
- Maddocks S, Setchell BP (1988) The composition of extracellular interstitial fluid collected with a push-pull cannula from the testes of adult rats. *J. Physiol.* 407: 363.
- Marchetti B, Cioni M, Folléa N, Pelletier G. (1987) Ovarian adrenergic nerves directly participate in the control of luteinizing hormone releasing hormone and  $\beta$ -adrenergic receptors during puberty: a biochemical and autoradiographic study. *Endocrinology* 121: 219.
- Marconi P (1923) Atrophie testiculaire par lesions nerveuses. *C.R.Soc.Biol.* 88: 356.
- Marre M, Bobbioni E, Shepherd M, Miller J, Assan R. (1982) The nervous control of rat somatostatin, glucagon and insulin secretion. *Diabete Metab.* 8: 179.
- Martin ICA, Lapwood KR, Kitchell, RL. (1984) The effects of specific neurectomies and cremaster muscle sectioning on semen characteristics and scrotal thermoregulatory responses of rams. En: *Reproduction in sheep*. Lindsay DR, Pearse DT (eds) Australian Academy of Science, Canberra p.73.
- Martin GR (1990) Current problems and future requirements for 5-hydroxytryptamine receptor classification. *Neuropharmacology* 3: 321.
- Mayer S. (1980) Drugs acting at synaptic and neuroeffector functional sites. En: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Goodman Gilman, Goodman Gilman (eds) p 62.

- Mayerhofer A, Bartke A, Steger RW. (1989) Catecholamine effects on testicular testosterone production in the gonadally active and the gonadally regressed adult golden hamster. *Biology of reproduction* 40: 752.
- Mayerhoffer A, Bartke A, Amador AG, Began T. (1989) Histamine affects testicular steroid production in the golden hamster. *Endocrinology* 125: 560.
- Melner MH, Abney TO (1980) Depletion of the cytoplasmic estrogen receptor in gonadotropin-desensitized testes. *Endocrinology* 107: 1620.
- Mendelson C, Dufau ML, Catt KJ (1975) Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3'-5' monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells. *J.Biol.Chem.* 250: 8818
- Miller RE. (1981) Pancreatic neuroendocrinology. *Endocr. Rev.* 2: 471
- Miyake K, Yamamoto M, Mitsuya H. (1986a) Pharmacological and histological evidence for adrenergic innervation of the myoid cells in the rat seminiferous tubule. *Tohoku J. exp. Med* 149:79-87.
- Miyake K, Yamamoto M, Narita H, Hashimoto J, Mitsuya H. (1986b) Evidence for contractility of the human seminiferous tubule confirmed by its response to noradrenaline and acetylcholine. *Fertil. Steril.* 46: 734.
- Mizunuma H, DePalatis LR, McCann SM. (1983) Effect of unilateral orchidectomy on plasma FSH concentration: evidence for a direct connection between testes and CNS. *Neuroendocrinology* 37:291.
- Moger WH, Anakwe OO (1986) Propranolol inhibits the compensatory increase in androgen secretion after unilateral orchidectomy on rats. *J.Reprod Fertil* 76: 251.
- Moger WH, Murphy PR, Casper RF (1982) Catecholamine stimulation of androgen production by mouse interstitial cells in primary culture. *J. Androl* 3: 227.

- Moger WH, Murphy PR. (1983).  $\beta$ -adrenergic agonist induced androgen production during primary culture of mouse Leydig cells. Archives of andrology 10: 135.
- Molenaar R, Rommerts FFG, van der Molen HM (1983). The steroidogenic activity of isolated Leydig cells from mature rats depends on the isolation procedure. Int. J. Androl 6: 261.
- Mulder E, Peters MJ, De Vries J, Van Der Molen. (1975) Characterization of a nuclear receptor for testosterone in seminiferous tubules of mature rat testes. Molec. cell. Endocr. 2: 171.
- Myers DA, Robertshaw D, Nathanielsz PW. (1990) Effect of bilateral splenic nerve section on adrenal function in the ovine fetus. Endocrinology 127: 2328.
- Nagai K, Murano S, Minokoshi Y, Okuda H, Kinutani M. (1982) Effects of denervation and local 6-hydroxydopamine injection on testicular growth in rats. Experientia 38: 592.
- Naghshineh S, Treadwell CR, Gallo LH, Vahouny GV. (1978) Protein -kinase mediated phosphorylation of purified ester hydrolase from bovine adrenal cortex. J. Lipid Res.19:561.
- Nakajim S, Hall PF. (1981) Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis: Purification and properties of a C<sub>21</sub> steroid side chain cleavage system (17 -hydroxylase and C<sub>17-20</sub> lyase ). J.Biol.Chem. 256: 3871.
- Nathan PW y Sears TA (1960) Effects of phenol on nervous conduction. J.of Physiology 150: 565.
- Niemi,M, Sharpe R.M. & Brown, W.R.A. (1986) Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. Cell Tiss. Res. 243: 337.
- Nistal M, Santamaria L, Paniagua R (1984) Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood. Acta Anat 119: 156.
- Noordhuizen-Stassen EN, Wensing CJG (1983) The effect of transection of the main vascular and nervous supply of the testis on the development of spermatogenic epithelium in the pig. J.Pediatr.

surg. 18: 601.

- Norberg, K.A. (1967) Transmitter histochemistry of the sympathetic adrenergic nervous system. Brain Res. 5, 125.

- Norberg KA, Risley PL, Ungerstedt U. (1967a) Adrenergic innervation of the male reproductive tracts in some mammals. 1. The distribution of adrenergic nerves. Z.Zellforsch. Mikroskop. Anat. 76: 278.

- Norberg KA, Risley PL, Ungerstedt U. (1967b) Adrenergic innervation of the male reproductive ducts in some mammals. Effects of vasectomy and castration. Experientia 23: 392.

- Nozu K, Dufau ML y Catt KJ (1981) Estradiol receptor-mediated regulation of steroidogenesis in gonadotropin-desensitized Leydig cells J. Biol. Chem. 256: 1915.

- O'Shaughnessy PJ y Payne AH (1982) Differential effects of single and repeated administration of gonadotropins on testosterone production and steroidogenic enzymes in Leydig cell populations. J. Biol.Chem. 257: 11503.

- Ochs S, Worth RM (1978) Axoplasmic transport in normal and pathological systems. En: Physiology and pathobiology of axons. Waxman SG (ed) Raven Press, New York, p251.

- Okkel H, Sand K. (1940) Morphological relationship between testicular nerves and LEydig cells in man. J.Endocrinol 2:38.

- Oshima H, Ochi AI (1973) On testicular 17 $\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase: product activation. Biochem.Biophys.Acta 306: 227.

- Oshima H, Sarada T, Kioyochiro O, Tamaoki BI (1970) 4-5 -hydrogenase in immature rat testes, its intracelular distribution, enzyme kinetics and influence of administered gonadotrophin and testosterone propionate. Endocrinology 86:1215.

- Ota H, Wakizara A, Fukushima M, Maki M. (1986) Modulation of testicular Receptors for LH, FSH and prolactin by the administration of ovine prolactin in mature rat. *Endocrinol. Japan* 33: 469.
- Ottensen B, Wagner G, Fahrenkrug J. (1988) Peptidergic innervation of the sexual organs. En: *Handbook of sexology. Vol 6: The pharmacology and endocrinology of sexual function.* JMA Sitsen, ed: 66.
- Parmetier M, Inagami T, Pochet R, Desclin JC (1983) Pituitary- dependent renin-like immunoreactivity in the rat testis. *Endocrinology* 112: 1318.
- Parvinen M, Byskov AF, Andersen CY, Grinsted J. (1982) Is the spermatogenic cycle regulated by MIS and MPS. *ANN.N.Y. Acad. Sci.* 383: 483.
- Parvinen M, Nikula H, Huhtaniemi I. (1984) Cyclic regulation of the rat Leydig cell testosterone production by seminiferous tubules. *Annls N.Y.Acad Sci.* 438: 681.
- Parvinen M. (1982) Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr.Rev.* 3: 404.
- Payne AH, Valladares LE (1980) Regulation of testicular aromatization by luteinizing hormone. In *Testicular Development Structure and Function.* Eds.A.Steinberger and E. Steinberger. Raven Press New York. p. 185.
- Podesta EJ, Dufau ML, Catt KJ. (1976). Characterization of two forms of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase in rat testicular interstitial cells: hormonal activation and conversion to a single catalytic subunit "in vitro" *Mol.Cell. Endocrinol.* 5: 109.
- Podestá EJ, Rivarola MA (1974) Concentration of androgens in whole testis, seminiferous tubules and interstitial tissue of rats at different stages of development *Endocrinology* 95: 455.
- Polak JM, Bloom SR (1984) Regulatory peptides - The distribution of two newly discovered peptides: PHI and NPY. *Peptides* 5: Suppl. 1, 79.

- Polak JM, Gu J, Mina S, Bloom SR. (1981) VIPergic nerves in the penis. *Lancet* 2: 217.
- Pöllänen, P & Maddocks, S. 1988 Macrophages, lymphocytes and MHC II antigen in the ram and the rat testis. *J.Reprod.Fert.* (1988) 82: 437.
- Poyet P, Labrie F. (1983) Characterization of  $\beta$ -adrenergic receptors in dispersed rat Leydig cells. *Biol.Reprod.* 28 (Suppl 1): 59 (abstract).
- Preslock LP, McCann SM (1985) Short-term effect of vasoligation upon plasma follicle-stimulating hormone and prolactin in the adult rat: further evidences for a direct neural connections between the testes and the central nervous system. *Biol Reprod* 33:1120.
- Purvis K, Clausen OPF, Hanson V (1979) Prolactin and Leydig cell responsiveness to LH/hCG in the rat. *Arch.Androl* 3: 219.
- Radicella J.P. Mecanismos de acción de la hormona luteinizante y esteroidogénesis en células de Leydig. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. U.B.A. 1986.
- Reiter RJ, Fraschini F. (1969) Endocrine aspects of the mammalian pineal gland: a review. *Neuroendocrinology* 5: 219.
- Richardson BP, Engel GE (1986) The pharmacology and function of 5-HT<sub>3</sub> receptors *TINS*: 9: 424.
- Riskey PL, Skreptos CN. (1964) Histochemical distribution of cholinesterases in the testis, epididymis and vas deferens of the rat. *Anat.Record* 148: 231.
- Ritchie, A.W.S.; Hargreave, T.B.; James, K.& Chisholm, G.D.(1984) Intraepithelial lymphocytes in the normal epididymis. A mechanism for tolerance to sperm auto-antigens *Br. J. Urol.* 56: 79.
- Ritta MN, Campos MB, Calandra RS. (1987) Effect of GABA and benzodiazepines on testicular androgen production. *Life Sci.* 40: 791.

- Ritta MN, Campos MB, Calandra RS (1991) Coexistence of gamma aminobutyric acid type A and type B receptors in testicular interstitial cells. *J. Neurochem* 56: 1236.
- Ritzen M, Boitani C, Parvinen M, French FS, Feldman M (1982) Stage-dependent secretion of ABP by rat seminiferous tubules. *Molec.cell.Endocr.*25: 25.
- Rivarola MA, Sanchez P, Saez JM. (1985) Stimulation of RNA and DNA synthesis in spermatogenic cells by their coculture with Sertoli cells. *Endocrinology* 117: 1796.
- Romeo HE, Gonzalez Solveira C, Vacas MI, Rosenstein RE, Barontini M, Cardinali DP. (1986) Origins of the sympathetic projections to rat thyroid and parathyroid glands. *J.Autonomic Nervous System* 17: 63.
- Romeo HE, Diaz MC, Ceppi J, Zaninivich AA, Cardinali DP. (1988) Effect of inferior laryngeal nerve section on thyroid function in rats. *Endocrinology* 122: 2557
- Romeo HE, Boado RJ, Cardinali DP. (1985) Role of the sympathetic nervous system in the control of thyroid growth of normal and hypophysectomized rats. *Neuroendocrinology* 40: 309.
- Roukenen A, Vihko R. (1974) Concentrations of unconjugated and sulfated neutral sterols in boar testis. *J.Steroid Biochem.* 5: 33.
- Saez JM, Haour F, Tell GPE, Gallet D y Sanchez P. (1978) Human chorionic gonadotropin induced Leydig cell refractoriness to gonadotropin stimulation. *Mol Pharmacol* 14: 1054.
- Salgado ED, Green DM. (1955) Renal necrosis induced In rats by serotonin. *Amer. J. Physiol.* 183: 657.
- Samuels LT, Bussman L, Matsumoto K, Huseby RA (1975) Organization of androgen biosynthesis in the testis. *J. Steroid Biochem.* 6: 291.



- Samuels LT. (1960) Metabolism of steroid hormones. En: Metabolic pathways. Vol 1. Greenberg (ed) Academic Press N.Y. p.53
- Scatchard G. (1949) The attraction of protein for small molecules and ions. Ann.N.Y.Acad.Sci. 51:660.
- Schmidt G, Owman Ch, Sjöbert N-O (1988) Cellular localization of ovarian histamine, its cyclic variations and histaminergic effects on ovulation in the rat ovary perfused in vitro. J. Reprod Fertil 82: 409.
- Schultzberg M, Lindh B. (1988). Transmitters and peptides in autonomic ganglia. En: Handbook of Chemical neuroanatomy. Vol.6: The peripheral nervous system. Björklund A (ed) Elsevier, Amsterdam p 297.
- Sertoli E. (1965) Dell' esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi dell'testicolo umano. Morgagni 7: 31.
- Setchell BP, Sharpe RM (1981) Effect of injected human chorionic gonadotrophin on capillary permeability, extracellular fluid volume and the flow of lymph and blood in the testis of rats. J. Endocrinology 91: 345.
- Setchell BP, Waites GMH, Thorburn GD. (1966) Blood Flow in the testis of the conscious ram measured with Krypton-85; effects of heat, catecholamines and acetyl choline. Circ.Res, 18: 755
- Setchell BP, Waites GMH (1970) Changes in the permeability of the testicular capillaries and of the "blood-testis barrier" after injection of cadmium chloride In the rat. J.Endocr., 47: 81.
- Sharp B, Pekany AE, Meyer NV, Hershman JM (1980)  $\beta$ -endorphin in male rat reproductive organs. Biochem. Biophys.Res.Commun. 95:618.
- Sharpe RM, Cooper I (1983) Testicular Interstitial fluid as a monitor for changes in the intratesticular environment in the rat. J. Reprod. Fertil. 69:125.

- Sharpe RM, Doogan DG, Cooper I. (1983) Direct effects of a luteinizing hormone releasing hormone agonist on intratesticular levels of testosterone and interstitial fluid formation in intact male rats. *Endocrinology* 113: 1306.
- Sharpe RM, Fraser HM, Ratnasooriya WD (1988) Assessment of the role of Leydig cell products other than testosterone in spermatogenesis and fertility in the adult rat. *Int J Androl* 11: 507.
- Sharpe RM. (1976) HCG-induced decrease in availability of rat testis receptors. *Nature* 264: 644.
- Sharpe RM. (1977) Gonadotropin-Induced reduction in the steroidogenic responsiveness of the immature rat testis. *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 76: 957.
- Sharpe RM. (1979) Gonadotropin induced accumulation of interstitial fluid in the rat testis. *J. Reprod. Fertil.* 55: 365.
- Sharpe RM. (1980) Temporal relationship between interstitial fluid accumulation and changes in gonadotropin receptor numbers and steroidogenesis in the rat testis. *Biol. Reprod.* 22: 851.
- Sharpe RM. (1981) The importance of testicular interstitial fluid in the transport of injected hCG to Leydig cells. *Int. J. Androl* 4: 64.
- Sharpe RM. (1982) Cellular aspects of the inhibitory actions of LH-RH on the ovary and the testis. *J. Reprod.Fert.* 64: 517.
- Sharpe RM. (1983) Impaired gonadotrophin uptake in vivo by the cryptorchid testis. *J. Reprod. Fertil.* 67: 379.
- Sharpe RM. (1984) Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol.Reprod.* 30: 29.
- Shikita M, Hall PF. (1973) Cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria: An enzyme for the side chain clivage of cholesterol. I Purification and properties. *J.Biol.Chem.* 248: 5598.
- Shioda T, Nishida S. (1966) Innervation of the bull testis. *Japan.J.Vet.Sci.* 28: 251.

- Sowerbutts SF, Jarvis Lg, Setchell Bp, (1986) The increase in testicular vascular permeability induced by human chorionic gonadotropin involves 5-hydroxytryptamine and possibly estrogens, but not testosterone, prostaglandines, histamine or bradykinin. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci* 64: 137.
- Stahl F, Gotz F, Dorner G (1984) Plasma testosterone levels in rats under various conditions. *Exp Clin Endocrinol* 84: 277.
- Steers WD, McConnell J, Benson GS (1984) Anatomical localization and some pharmacological effects of vasoactive intestinal polypeptide in human and monkey corpus cavernosum. *J.Urol* 132: 1048.
- Steinberger E. (1971) Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol.Rev.* 51: 1.
- Stjernquist M, Hakanson R, Leander S, Owman C, Sundler F, Uddman R. (1983) Immunohistochemical localization of substance P, vasoactive intestinal polypeptide and gastrin-releasing peptide in vas deferens and seminal vesicle, and the effect of these and eight other neuropeptides on resting tension and neurally evoked contractile activity. *Regul.Pept.* 7:67.
- Suescun MO, González SI, Chiauuzi VA, Calandra RS. (1985) Effects of induced hypoprolactinemia on testicular function during gonadal maturation in the rat. *J. Androl.* 6: 77.
- Sullivan MHF, Cooke BA (1985) Control and production of leucotriene B<sub>4</sub> in rat tumour and testicular leydig cells. *Biochem J.* 230: 821.
- Sundaran K. Didolkar A, Thau R, Chaudhuri M, Schmidt F (1988) Antagonists of luteinizing hormone releasing hormone bind to rat mast cells and induces histamine release. *Agents actions* 25: 307.
- Sweet F, Onoda M, Hall PF, Yanagabashi K, Shively JE (1985) A P-450 enzyme from fetal pig testis converts progesterone to delta-4- androstenedione via dual activity at its active site. *J.Biol. Chem.* 30: 8593.

- Syed V, Khan SA, Ritzen EM (1985) Stage specific inhibition of interstitial cell testosterone secretion by rat seminiferous tubules in vitro. *Molec. Cell Endocrinol.*40: 257.
- Tedde G, Tedde Piras A. L'Innervation de testicule humain étudiée par microscopie électronique. (1984) *Bull. Assoc. Anat. Vol. 68, fascículo 200, p.77.*
- Thompson RC, Seasholtz AF, Herbert E. (1987) Rat corticotropin releasing hormone-gene: sequence and tissue-specific expression. *Mol. Endocrinol* 1: 363.
- Tinajero JC, Fabbri A, Dufau ML.(1991) Corticotropin releasing factor secretion is regulated by serotonin in the Leydig cell. 73 rd. Annual Meeting of the Endocrine Society. Abstract N° 44.
- Tindall DJ, Miller DA, Means AR (1977) Characterization of androgen receptor in Sertoli cell enriched testis. *Endocrinology* 101: 13.
- Tolszczuk M, Folléa N, Pelletier G. (1988) Characterization and localization of  $\beta$ -adrenergic receptors in control and cryptorchidized rat testis by in vitro autoradiography. *J.Androl.* 9:172.
- Tres LL, Smith E, Van Wyk JJ, Kierszenbaum RL. (1986) Immunoreactive sites and accumulation of somatomedin-C in rat Sertoli-spermatogenic cell co-cultures. *Exp.Cell.Res.* 162:33.
- Tsuruhara T, Dufau ML, Cigorruga S y Catt KJ (1977) Hormonal regulation of testicular luteinizing hormone receptors *JBiol Chem* 252: 9002.
- van Campenhaut E. (1949) Les relations nerveuses de la glande interstitielle des glandes genitales chez les mammisferes. *Rev.Can. Biol* 8: 374.
- Van der Molen HJ, Grootgoed JA, De Greef-Bitleveld MJ, Rommerts FF, Van der Vusse GH. (1975): Distribution of steroids:steroid production and steroid metabolizing enzymes in rat testis. In :French FS, Hansson V, Martin-Ritzen E, Nayfeh SN (eds). *Hormonal regulation of Spermatogenesis* pp 3-23. Plenum Press, NY.

- Verhoeven G. (1980) Effects of neurotransmitters and follicle stimulating hormone on the aromatization of androgens and the production of adenosine 3',5' monophosphate by cultured testicular cells. *J. Steroid Biochem.* 12: 315.
- Vermes I, Várszegi M, Tóth EK, Telegdy G. (1979) Study of the effects of neurotransmitters on the hypothalamus-pituitary-testis function in vitro cell suspension system. *Arch. Androl.* 3: 127.
- Vihko KK, Suominen JSO, Parvinen M. (1984) Cellular regulation of plasminogen activator secretion during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 31: 383.
- Wang J, Galil KAA, Setchell BP (1983) Changes in testicular blood flow and testosterone production during spermatogenesis after irradiation. *J. Endocrinol.* 98: 35.
- Waterfield AA, Smockum RWJ, Hughes J, Kosterlitz HW, Henserson G. (1977) In vitro pharmacology of the opioid peptides, enkephalines and endorphin. *Eur.J. Pharmacol.* 43: 107.
- Weiss GK, Dail WG, Ratner A. (1982) Evidence for direct neural control of ovarian steroidogenesis in rats. *J. Reprod. Fertil.* 65: 507.
- Wilton LJ, de Kretser DM. (1984) The influence of luteinizing hormone on the Leydig cells of cryptorchid rat testes. *Acta endocr. Copenh.* 107: 110.
- Wright WW, Parvinen M, Musto NA, Gunsalus GL, Phillips DM, Mather JP, Bardin CW. (1983) Identification of stage-specific proteins synthesized by rat seminiferous tubules. *Biol.Reprod.* 29: 257.
- Yamamoto M, Takaba H, Hashimoto J, Miyake K. (1987) Evidence for innervation of the myoid cell in the human seminiferous tubule. *Urol.Int* 42: 137.
- Yamamoto M, Takaba H, Hashimoto J, Koji M. (1987) Evidence for innervation of the myoid cell in the human seminiferous tubule. *Urol.int* 42: 137.
- Yamashita K. (1939) Histologische Studien zur innervation des hodens und des Nebenhodens beim menschen. *J.Oriental Med* 30, Abstr Sect. 150.

- Yee JD, Hutson JC. (1985) Effects of testicular macrophage conditioned medium on Leydig cells in culture. *Endocrinology* 116: 2682.
- Zieher LM, Debeljuk L, Iturriza F, Mancini RE. (1971) Biogenic amine concentration in testes of rats at different ages. *Endocrinology* 83: 351.
- Zipf WB, Payne AH, Kelch RP (1978) Prolactin, growth hormone and luteinizing hormone in the maintenance of testicular luteinizing hormone receptors *Endocrinology* 103: 595.