

Tesis de Posgrado

Control de la función reproductiva en el hamster macho

Frungieri, Mónica Beatriz

1997

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

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

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

Cita tipo APA:

Frungieri, Mónica Beatriz. (1997). Control de la función reproductiva en el hamster macho. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2987_Frungieri.pdf

Cita tipo Chicago:

Frungieri, Mónica Beatriz. "Control de la función reproductiva en el hamster macho". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2987_Frungieri.pdf

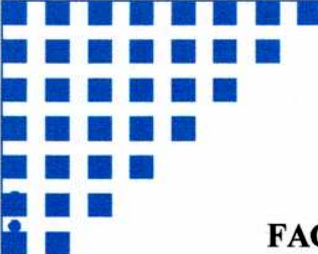
EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**CONTROL DE LA FUNCION REPRODUCTIVA
EN EL HAMSTER MACHO**

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTORA DE LA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

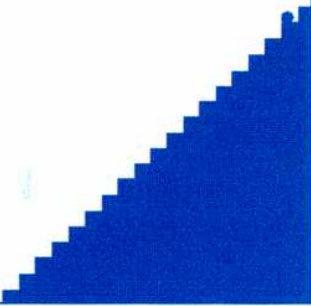
***AUTORA:* Lic. Mónica Beatriz Frungieri**

***DIRECTOR:* Prof. Dr. Ricardo Saúl Calandra**

***CODIRECTORA:* Prof. Dra. Silvia Inés Gonzalez-Calvar**

Instituto de Biología y Medicina Experimental

1997



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**CONTROL OF THE REPRODUCTIVE
FUNCTION IN THE MALE HAMSTER**

**THESIS FOR PURSUING A Ph. D. DEGREE FROM THE
UNIVERSITY OF BUENOS AIRES**

***AUTHOR:* Lic. Mónica Beatriz Frungieri**

***DIRECTOR:* Prof. Dr. Ricardo Saúl Calandra**

***CODIRECTOR:* Prof. Dra. Silvia Inés Gonzalez-Calvar**

Instituto de Biología y Medicina Experimental

1997

A mis padres

A mi hermana y amigos

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. Ricardo S. Calandra, por haberme brindado la oportunidad de iniciarme en la investigación científica, realizando el presente Trabajo de Tesis bajo su dirección. Quisiera agradecerle muy especialmente el estímulo, interés y confianza recibido de su parte a lo largo de estos años.

A la Prof. Dra. Silvia I. Gonzalez-Calvar, por transmitirme sus conocimientos y experiencia, y por haber guiado mis primeros pasos en la investigación. Por su invalorable ayuda, paciencia y dedicación en la codirección de esta Tesis.

Al Dr. Modesto Rubio y al personal de ININFA, por su asesoramiento en la determinación de los niveles tisulares de Serotonina.

A la Dra. Stella Campo, y al personal del CEDIE, por su colaboración en la determinación de Inhibina.

Al Dr. Omar Pignataro por su colaboración en la determinación del mecanismo de acción de la Serotonina sobre la esteroidogénesis gonadal, y por su buena disposición en la discusión de resultados.

A la Dra. Isabel Lüthy, por su desinteresado aporte en la redacción de este Trabajo, y sobre todo, por sus consejos.

A la Dra. Susana B. Rulli, por su estímulo, su infinita paciencia, y por su colaboración en la discusión de resultados y preparación de esquemas y dibujos. Por escucharme en mis malos momentos y por brindarme siempre una palabra de aliento.

A la Sra. Paula Durante, por su permanente estímulo y colaboración, pero sobre todo, por su cálida e invalorable amistad.

A la Lic. Stella Vazquez, por los buenos momentos compartidos en el Laboratorio, y por su constante estímulo.

Al Instituto de Biología y Medicina Experimental, por haberme permitido disponer de todos los elementos que posibilitaron el desarrollo de esta Tesis.

Al personal de Criadero y Biblioteca, por su buena voluntad y constante dedicación.

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

A la Universidad de Buenos Aires, por mi formación de grado y posgrado.

Al Lic. Martín Cammarota y a Diego Bustos por su infinita paciencia y ayuda en la realización de los gráficos de la presente Tesis.

Al Lic. Edgardo Hernandez y a la Lic. Andrea Ventura por su ayuda en el tratamiento estadístico de los resultados de este trabajo.

A mis padres, mis cimientos. Por su apoyo incondicional e invaluable comprensión y confianza.

A mi hermana, mi mejor amiga. Por compartir sueños y realidades, y por darme fuerzas para seguir adelante.

A mis amigas Carina, Raquel, Sandra y Verónica (en estricto orden alfabético), por su comprensión y apoyo, y por darme una excelente razón para continuar día a día.

A mis compañeros de trabajo en el C.B.C., por su amistad y paciencia cotidiana.

A mi país, mi lugar en el mundo.

RESUMEN

El hámster es una especie con reproducción estacional controlada fotoperiódicamente. La exposición de animales adultos a fotoperíodos cortos produce marcadas alteraciones en el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, que resultan en una fase inicial de quiescencia (*regresión*), y una posterior recuperación de la actividad sexual (*recrudescencia espontánea*).

Los resultados presentados en esta Tesis han permitido: a) realizar un estudio comparativo sobre distintos aspectos de la función sexual, en dos especies de hámsteres: Dorado y Djungarian; b) establecer semejanzas y diferencias entre el proceso de desarrollo puberal y la transición fotoperiódica regresión-recrudescencia; c) estudiar el metabolismo de las poliaminas en testículos y vesículas seminales, y su correlación con el trofismo del órgano; d) establecer una dependencia diferencial de la actividad secretoria gonadal de inhibina B respecto de FSH, según el tiempo de permanencia en fotoperíodo corto; e) evaluar la presencia de GABA y Serotonina en gónadas y glándulas sexuales accesorias; y f) determinar la participación de la Serotonina en la modulación local del proceso esteroideogénico, y su mecanismo de acción a través de una inhibición en la actividad adenilato ciclasa.

Dichos resultados contribuyen al conocimiento de los mecanismos que controlan la función reproductiva en el hámster macho, los cuales se manifiestan sobre los distintos niveles que conforman el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.

ABSTRACT

The hamster is a seasonal breeder. The exposure of hamsters to short fotoperiods causes a severe alteration of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, including an early quiescence phase (*regression*), and a later recovery of the sexual activity (*spontaneous recrudescence*).

The results of this Thesis permitted: a) to make a comparative study about the different aspects of the sexual function between two species of hamsters: Golden and Djungarian; b) to establish similitudes and differences between the sexual development and the regression-recrudescence transition; c) to study polyamine metabolism in testes and seminal vesicles, and its correlation with organ growth; d) to establish a differential dependency of the gonadal secretion of inhibin type B with respect to FSH, in relation with the time of permanence in short photoperiod; e) to determine the presence of GABA and Serotonin in testes and accessory sexual glands; and f) to establish the role of Serotonin in the local modulation of steroidogenesis, and its action mechanism through the inhibition of adenylate cyclase activity.

These results contribute to the knowledge of the mechanisms regulating the reproductive function in the male hamster, manifested at different levels of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Δ	delta/variación
γ -GT.....	gamma-glutamyl-transpeptidasa
17 β HSD.....	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
3 β -HSD.....	enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ^5 - Δ^4 isomerasa
5-HIAA.....	ácido 5-hidroxi indol acético
5-HT.....	serotonina, 5-hidroxitriptamina
5-HT ₂	receptores serotoninérgicos tipo 2
5-HTP.....	5-hidroxitriptofano
A-PA.....	acetil poliaminas
A-put.....	acetil-putrescina
ABP.....	proteína ligadora de andrógenos
ACTH.....	hormona estimulante de la corteza adrenal o adrenocorticotrofina
ACHC.....	cis 3-ácido carboxílico aminociclohexano
ADH.....	hormona antidiurética o vasopresina
ADN.....	ácido desoxirribonucleico
ADNc.....	ácido desoxirribonucleico complementario
AE.....	actividad específica
AMPc.....	adenosina 3',5'-monofosfato cíclica
androsterona.....	3 α -hidroxi-5 α -androstano-17-ona
ANOVA.....	análisis de la varianza de una vía
APPA.....	ácido 3-aminopropanofosfínico
ARN.....	ácido ribonucleico
ARNm/s.....	ácido/s ribonucleico/s mensajero/s
AT.....	acetil-CoA espermidina/espermina N ¹ -acetiltransferasa
ATP.....	adenosina trifosfato
BSA.....	albúmina sérica bovina
CACA.....	ácido cis 4-aminocrotónico
CAMP.....	cis 2-aminometil-ciclopropano
CEDIE.....	Centro de Investigaciones Endocrinológicas
cm.....	centímetro
cm ³	centímetro cúbico
CoA.....	coenzima A
CRE.....	elemento de respuesta al AMPc
CREB.....	proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
CRF.....	factor liberador de corticotrofina
DABA.....	L 2,4-ácido diamino-n-butírico
DAO/s.....	di amino oxidasa/s
dbAMPc.....	dibutiril adenosina 3',5'-monofosfato cíclica

DBI.....	péptido inhibidor de la unión de diazepam ó endozepina
DE ₅₀	dosis efectiva 50
DHT.....	5 α -dihidrotestosterona, 5 α -androstano, 17 β -ol-3-ona
Diol.....	5 α -androstano 3 α , 17 β -diol
dl.....	decilitro
Dopa.....	dihidroxifenilalanina
dpm.....	desintegraciones por minuto
DS.....	desvío estándar
DTT.....	ditiotreitol
EDTA.....	ácido etilendiaminotetraacético
EDS.....	etileno dimetano sulfonato
EGF.....	factor de crecimiento epidérmico
ELISA.....	enzimoinmunoanálisis
ES.....	error estándar
Esd.....	espermidina
Esp.....	espermina
etiocolanolona.....	3 α -hidroxi-5 β -androstano-17-ona
FC.....	fotoperíodo corto
Fig.....	figura
FN.....	fotoperíodo normal
FSH.....	hormona folículo estimulante
g.....	gramos
g.....	aceleración de la gravedad
GABA-T.....	ácido γ -amino butírico transaminasa
GABA.....	ácido γ -amino butírico
GAD.....	glutamato decarboxilasa
GH.....	hormona de crecimiento o somatotrofina
Glut.....	ácido glutámico
GnRH.....	hormona liberadora de gonadotrofinas
gr.....	griego
GTP.....	guanosina trifosfato
GTPasas.....	enzimas que hidrolizan a la guanosina trifosfato
hCG/APL.....	gonadotrofina coriónica humana
HDL.....	lipoproteínas de alta densidad
HPLC.....	cromatografía líquida de alta presión
hs.....	horas
IBYME.....	Instituto de Biología y Medicina Experimental
IMBICE.....	Instituto Multidisciplinario de Biología Celular
ININFA.....	Instituto de Investigaciones Farmacológicas
INT.....	cloruro de iodonitro tetrazolio
kg.....	kilogramo
l.....	litro
lat.....	latín
LH.....	hormona luteinizante

M.....	molar
MAO/s.....	mono amino oxidasa/s
µg.....	microgramo
µl.....	microlitro
µmol.....	micromol
µM.....	micromolar
mg.....	miligramo
ml.....	mililitro
mmol.....	milimol
mM.....	milimolar
MIX.....	3-isobutyl-1-methylxantina
M.....	molar
MPA.....	ácido 3-mercaptopropiónico
MSH.....	hormona estimulante de los melanocitos
MTA.....	5'-metil-tioadenosina
mUI.....	mili unidades internacionales
n.....	tamaño poblacional
N ¹ A-esd.....	N ¹ -acetil espermidina
N ¹ A-esp.....	N ¹ -acetil espermina
N ⁸ A-esd.....	N ⁸ -acetil espermidina
NAD/NADH.....	nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado/reducido
NADP/NADPH.....	nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato oxidado/reducido
ng.....	nanogramo
nmol.....	nanomol
nM.....	nanomolar
NIADDK.....	National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive Diseases and Kidney
NPY.....	neuropéptido Y
°C.....	grados centígrados
ODC.....	ornitina decarboxilasa
P-450c17.....	complejo enzimático 17α hidroxilasa C17-20 liasa, dependiente del citocromo P450
PA.....	poliaminas
PAO.....	poliamina oxidasa
PBR.....	receptor periférico de benzodiacepinas
PBS.....	buffer fosfato salino
PCA.....	ácido perclórico
PEG.....	polietilenglicol
pH.....	potencial hidrógeno (-log [H ⁺])
pg.....	picogramo
pmol.....	picomol
pM.....	picomolar
PKA.....	proteína quinasa AMPc dependiente
PKC.....	proteína quinasa C

POMC.....	pro-opiomelanocortina
POPOP.....	1,4-bis[5-fenil-2-oxazolil] benzeno; 2,2'-p-fenileno-bis [5-feniloxazol]
PPO.....	2,5-difenil-oxazol
PRL.....	prolactina
Proteína G.....	proteína de unión a nucleótidos de guanina
Proteína Gi.....	proteína inhibitoria de unión a nucleótidos de guanina
Proteína Gs.....	proteína estimuladora de unión a nucleótidos de guanina
Put.....	putrescina
r.....	coeficiente de correlación
Rf.....	relación de frentes
RIA.....	radioinmunoanálisis
rpm.....	revoluciones por minuto
SA.....	ácido succínico
SamDC.....	S-adenosilmetionina decarboxilasa
SAP.....	polipéptido activador de la esteroidogénesis
SCC.....	complejo enzimático que rompe la cadena lateral del colesterol
SCP ₂	proteína transportadora del colesterol
SDS.....	dodecil sulfato de sodio
SIP.....	proteína inductora de la esteroidogénesis
SSA.....	succínico semialdehído
SSADH.....	succínico semialdehído dehidrogenasa
T.....	testosterona, androsteno 17 β -ol-3-ona
TACA.....	ácido trans 4-aminocrotónico
TAMP.....	trans 2-aminometil-ciclopropano
TCA.....	ácido tricloroacético
TGF.....	factor de crecimiento transformante
THPO.....	4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo 4,5-piridin 3-ol
Tris.....	Tris-hidroximetil aminometano
TSH.....	hormona estimulante de la tiroides o tirotrófina
UBA.....	Universidad de Buenos Aires
UI.....	unidades internacionales
VIP.....	polipéptido intestinal vaso activo
vol.....	volumen

INDICE

	<i>Página</i>
INTRODUCCION.....	1
1. DESCRIPCION ANATOMO-FUNCIONAL DEL EJE REPRODUCTIVO.....	2
1.1. GLANDULAS ENDOCRINAS.....	2
1.2. UNIDAD HIPOTALAMO-HIPOFISARIA.....	2
1.3. EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO-GONADAL.....	5
1.4. GLANDULA PINEAL.....	7
1.5. TRACTO GENITAL MASCULINO.....	9
1.5.1. Testículo.....	11
1.5.1.1. Túbulos seminíferos.....	11
1.5.1.1.1. <i>Células de Sertoli</i>	12
1.5.1.1.1.1. <i>Mecanismo de acción de FSH en las células de Sertoli</i>	12
1.5.1.1.1.2. <i>Inhibina y activina</i>	14
1.5.1.1.2. <i>Ciclo espermatogénico</i>	16
1.5.1.2. Tejido intersticial.....	18
1.5.1.2.1. <i>Células de Leydig</i>	19
1.5.1.2.1.1. <i>Biosíntesis de andrógenos</i>	20
1.5.1.2.1.2. <i>Regulación de la síntesis de andrógenos</i>	24
1.5.1.2.2. <i>Otros componentes celulares del tejido intersticial</i>	27
1.5.1.3. Relaciones paracrinas, autocrinas e intracrinas en el testículo	28
1.5.2. Epidídimo.....	29
1.5.3. Vesículas seminales.....	30
1.5.4. Próstata.....	31
2. ENDOCRINOLOGIA REPRODUCTIVA EN EL HAMSTER.....	33
2.1. ESPECIES.....	33
2.2. DESARROLLO SEXUAL.....	35

2.3. CAMBIOS ESTACIONALES.....	37
2.2.1. Regresión reproductiva foto-inducida.....	37
2.2.2. Recrudescencia testicular espontánea y foto-estimulada.....	39
3. POLIAMINAS.....	42
3.1. ESTRUCTURA Y FUNCION.....	42
3.2. BIOSINTESIS Y CATABOLISMO.....	45
3.2.1. Regulación del metabolismo de las Poliaminas.....	49
3.3. POLIAMINAS EN ORGANOS REPRODUCTIVOS.....	51
3.3.1. Testículo.....	51
3.3.2. Epididimo y glándulas sexuales accesorias.....	53
4. NEUROENDOCRINOLOGIA Y REPRODUCCION.....	56
4.1. ORGANIZACION DEL SISTEMA NERVIOSO.....	56
4.1.1. Sistema nervioso central.....	56
4.1.1.1. Ontogenia y ciclo reproductivo anual.....	56
4.1.2. Sistema nervioso periférico.....	60
4.1.2.1. Inervación del tracto genital masculino.....	61
4.1.2.1.1. <i>Inervación del testículo, epidídimo y conducto deferente</i>.....	63
4.1.2.1.2. <i>Inervación de las glándulas sexuales accesorias</i>.....	65
4.2. NEUROTRANSMISORES.....	66
4.2.1. GABA.....	66
4.2.2. Serotonina.....	71
4.2.3. Neuromodulación de la función gonadal.....	75
OBJETIVOS.....	82
MATERIALES Y METODOS.....	85
1. DROGAS Y REACTIVOS.....	86
2. ANIMALES.....	87
3. TRATAMIENTO.....	88

3.1. EN EL ESTUDIO DEL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.....	88
3.2. EN EL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LA FUNCION REPRODUCTIVA.....	89
4. DETERMINACION DEL PERFIL SERICO.....	90
4.1.LIPIDOS EN SUERO.....	90
4.2. HORMONAS PROTEICAS.....	92
4.3. ANDROGENOS.....	93
4.3.1. Extracción de andrógenos.....	93
4.3.2. Determinación de andrógenos.....	93
4.4. INHIBINA B.....	94
5. DETERMINACION DEL PERFIL DE ANDROGENOS TISULARES.....	95
5.1. Extracción de andrógenos.....	95
5.2. Determinación de andrógenos.....	96
6. ANALISIS DEL METABOLISMO TISULAR DE LAS POLIAMINAS.....	96
6.1. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE POLIAMINAS.....	96
6.2. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE ACETIL POLIAMINAS.....	98
6.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ORNITINA DECARBOXILASA	99
7. ANALISIS DEL METABOLISMO TISULAR DE NEUROTRANSMISORES.....	101
7.1. GABA.....	101
7.1.1. Preparación de membranas portadoras de receptores gabaérgicos.....	101
7.1.2. Determinación de los niveles tisulares de GABA.....	102
7.1.3. Análisis de la biosíntesis tisular de GABA.....	103
7.1.3.1. Determinación de los niveles tisulares de ácido glutámico.....	103
7.1.3.2. Actividad glutamato decarboxilasa.....	104
7.1.3.3. Determinación de los niveles tisulares de putrescina.....	104

7.1.4. Efecto del ácido amino-oxiacético sobre los niveles tisulares de GABA.....	105
7.2. SEROTONINA.....	105
7.2.1. Determinación de los niveles testiculares de serotonina y 5-hidroxi-indol acético.....	105
8.PRODUCCION DE ANDROGENOS <i>IN VITRO</i>	107
8.1. PRODUCCION DE ANDROGENOS POR FRAGMENTOS TESTICULARES.....	107
8.1.1. Incubación de fragmentos testiculares.....	107
8.1.1.1. Efecto del tamaño de los fragmentos testiculares.....	108
8.1.1.2. Curvas dosis-respuesta.....	108
8.1.1.3. Influencia de GABA y serotonina sobre la producción de andrógenos <i>in vitro</i> por fragmentos testiculares.....	108
8.2. PRODUCCION DE ANDROGENOS EN CELULAS INTERSTICIALES.....	109
8.2.1. Obtención de células intersticiales.....	109
8.2.1.1. Técnica de dispersión celular.....	109
8.2.1.2. Viabilidad celular.....	110
8.2.1.3. Rendimiento celular y grado de contaminación.....	110
8.2.2. Incubación de células intersticiales.....	111
8.2.2.1. Curvas dosis-respuesta.....	111
8.2.2.2. Influencia de GABA y serotonina sobre la producción de testosterona <i>in vitro</i> en células intersticiales.....	111
8.2.2.3. Influencia de serotonina sobre la producción de testosterona <i>in vitro</i> estimulada por dibutiril adenosina 3',5'-monofosfato ciclica en células intersticiales.....	112
8.2.2.4. Rol del factor liberador de corticotrofina sobre la producción de testosterona <i>in vitro</i> en células intersticiales.....	112
8.3. DETERMINACION DE ANDROGENOS <i>IN VITRO</i>	112

9. DETERMINACION DE PROTEINAS.....	113
10. DETERMINACION DE ADN.....	113
11. ANALISIS ESTADISTICOS.....	113
RESULTADOS.....	115
FUNCION REPRODUCTIVA EN EL HAMSTER MACHO: INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL FOTOPERIODO	
1. INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL FOTOPERIODO SOBRE EL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO-GONADAL Y GLANDULAS SEXUALES ACCESORIAS.....	116
1.1. PESO CORPORAL.....	116
1.1.1. En el proceso de desarrollo sexual.....	116
1.1.2. Influencia del fotoperíodo sobre el peso corporal.....	117
1.2. MODIFICACIONES EN EL PESO DE LOS ORGANOS REPRODUCTIVOS.....	118
1.2.1 Testículo.....	118
1.2.1.1. En el proceso de desarrollo sexual.....	118
1.2.1.2. Influencia del fotoperíodo sobre el peso testicular.....	121
1.2.2. Epidídimo.....	124
1.2.2.1. En el proceso de desarrollo sexual.....	124
1.2.2.2. Influencia del fotoperíodo sobre el peso epididimario.....	126
1.2.3. Vesículas seminales.....	128
1.2.3.1. En el proceso de desarrollo sexual.....	128
1.2.3.2 Influencia del fotoperíodo sobre el peso de las vesículas seminales.....	130
1.2.4. Próstata.....	132
1.2.4.1. En el proceso de desarrollo sexual.....	132
1.2.4.2. Influencia del fotoperíodo sobre el peso de la próstata.....	133
1.3. PERFIL LIPIDICO SERICO.....	134
1.3.1. Influencia del fotoperíodo sobre el perfil lipídico sérico.....	134

1.4. PERFIL HORMONAL SERICO.....	136
1.4.1. En el proceso de desarrollo sexual.....	136
1.4.2. Influencia del fotoperíodo sobre el perfil hormonal sérico.....	138
1.5. NIVELES SERICOS DE INHIBINA B.....	140
1.5.1. Influencia del fotoperíodo sobre los niveles séricos de inhibina B.....	140
1.6. PERFIL DE ANDROGENOS GONADALES.....	141
1.6.1. Influencia del fotoperíodo sobre el perfil de andrógenos gonadales.....	141
1.7. PERFIL DE ANDROGENOS EPIDIDIMARIOS.....	142
1.7.1 Influencia del fotoperíodo sobre el perfil de andrógenos epididimarios.....	142
2. EFECTO DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES DE POLIAMINAS Y DE SUS ACETIL DERIVADOS EN TESTICULO Y VESICULAS SEMINALES.....	145
2.1. TESTICULO.....	145
2.1.1. Niveles de poliaminas.....	145
2.1.2. Niveles de acetil poliaminas.....	148
2.1.3. Actividad ornitina decarboxilasa.....	150
2.2. VESICULAS SEMINALES.....	151
2.2.1. Niveles de poliaminas.....	151
2.2.2. Niveles de acetil poliaminas.....	154
2.2.3. Actividad ornitina decarboxilasa.....	156
3. NEUROTRANSMISORES EN ORGANOS REPRODUCTIVOS.....	158
3.1. TESTICULO.....	158
3.1.1. INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES TESTICULARES DE GABA.....	158
3.1.1.1. Niveles testiculares de GABA.....	158
3.1.1.1.1. En el proceso de desarrollo sexual.....	158

3.1.1.1.2. Influencia del fotoperíodo sobre los niveles testiculares de GABA.....	161
3.1.1.2. Biosíntesis testicular de GABA.....	162
3.1.1.2.1. Ácido glutámico. Niveles testiculares.....	162
3.1.1.2.1.1. En el proceso de desarrollo sexual.....	162
3.1.1.2.1.2. Influencia del fotoperíodo sobre los niveles testiculares de ácido glutámico.....	164
3.1.1.2.2. Actividad glutamato decarboxilasa.....	166
3.1.1.2.2.1. Influencia del fotoperíodo sobre la actividad glutamato decarboxilasa testicular.....	166
3.1.1.2.3. Putrescina. Niveles testiculares.....	167
3.1.1.2.3.1. Influencia del fotoperíodo sobre los niveles testiculares de putrescina.....	167
3.1.1.3. Efecto del ácido amino-oxiacético sobre los niveles testiculares de GABA.....	168
3.1.2. INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES TESTICULARES DE SEROTONINA.....	169
3.1.2.1. Niveles testiculares de serotonina y ácido 5-hidroxi-indolacético.....	169
3.1.2.1.1. En el proceso de desarrollo sexual.....	169
3.1.2.1.2. Influencia del fotoperíodo sobre los niveles testiculares de serotonina y ácido 5-hidroxi indol acético.....	177
3.2. EPIDIDIMO.....	180
3.2.1. INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES EPIDIDIMARIOS DE GABA.....	180
3.2.1.1. Niveles epididimarios de GABA.....	180
3.2.1.1.1. En el proceso de desarrollo sexual.....	180
3.2.1.1.2. Influencia del fotoperíodo sobre los niveles epididimarios de GABA.....	181
3.2.1.2. Biosíntesis epididimaria de GABA.....	182

3.2.1.2.1. Acido glutámico. Niveles epididimarios	182
3.2.1.2.1.1. <i>En el proceso de desarrollo sexual</i>	182
3.2.1.2.1.2. <i>Influencia del fotoperíodo sobre los niveles epididimarios de ácido glutámico</i>	184
3.2.1.2.2. Actividad glutamato decarboxilasa	185
3.2.1.2.2.1. <i>Influencia del fotoperíodo sobre la actividad glutamato decarboxilasa epididimaria</i>	185
3.3. VESICULAS SEMINALES	186
3.3.1. INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES DE GABA EN VESICULAS SEMINALES	186
3.3.1.1. Niveles de GABA en vesículas seminales	186
3.3.1.1.1. <i>En el proceso de desarrollo sexual</i>	186
3.3.1.1.2. <i>Influencia del fotoperíodo sobre los niveles de GABA en vesículas seminales</i>	187
3.3.1.2. Biosíntesis de GABA en vesículas seminales	189
3.3.1.2.1. Acido glutámico. Niveles en vesículas seminales	189
3.3.1.2.1.1. <i>En el proceso de desarrollo sexual</i>	189
3.3.1.2.1.2. <i>Influencia del fotoperíodo en los niveles de ácido glutámico en vesículas seminales</i>	190
4. NEUROTRANSMISORES Y FUNCION TESTICULAR. ESTUDIOS IN VITRO	193
4.1. FRAGMENTOS TESTICULARES.....	193
4.2. OBTENCION DE CELULAS INTERSTICIALES.....	194
4.3. CURVAS DOSIS-RESPUESTA A hCG.....	197
4.3.1. Hámsteres adultos expuestos a fotoperíodo normal.....	197
4.3.1.1. Curva dosis-respuesta a hCG en fragmentos testiculares	197
4.3.1.2. Curva dosis-respuesta a hCG en células intersticiales	200
4.3.2. Hámsteres de 30 días de edad expuestos a fotoperíodo normal.....	201

4.3.2.1. Curva dosis-respuesta a hCG en fragmentos testiculares.....	201
4.3.3. Hámsteres adultos expuestos a fotoperíodo corto durante 14 semanas.....	204
4.3.3.1. Curva dosis-respuesta a hCG en fragmentos testiculares.....	204
4.4. INFLUENCIA DE GABA SOBRE LA PRODUCCION DE ANDROGENOS.....	206
4.4.1. Hámsteres adultos expuestos a fotoperíodo normal.....	206
4.4.1.1. Influencia de GABA sobre la producción de andrógenos por fragmentos testiculares.....	206
4.4.1.2. Influencia de GABA sobre la producción de andrógenos en células intersticiales.....	208
4.4.2. Hámsteres de 30 días de edad expuestos a fotoperíodo normal.....	209
4.4.2.1 Influencia de GABA sobre la producción de andrógenos por fragmentos testiculares.....	209
4.4.3. Hámsteres adultos expuestos a fotoperíodo corto durante 14 semanas.....	210
4.4.3.1. Influencia de GABA sobre la producción de andrógenos por fragmentos testiculares.....	210
4.5. INFLUENCIA DE SEROTONINA SOBRE LA PRODUCCION DE ANDROGENOS.....	212
4.5.1. Hámsteres adultos expuestos a fotoperíodo normal.....	212
4.5.1.1. Influencia de serotonina sobre la producción de andrógenos por fragmentos testiculares.....	212
4.5.1.2 Influencia de serotonina sobre la producción de andrógenos en células intersticiales.....	215
4.5.1.3. Influencia de dibutiril adenosina 3',5' monofosfato cíclico en la regulación serotoninérgica de la producción de andrógenos en células intersticiales.....	216

4.5.1.4. Influencia del factor liberador de corticotrofina sobre la producción de andrógenos en células intersticiales.....	217
4.5.1.5. Rol del factor liberador de corticotrofina en la regulación serotoninérgica de la producción de andrógenos en células intersticiales.....	219
4.5.2. Hámsteres de 30 días de edad expuestos a fotoperíodo normal.....	220
4.5.2.1 Influencia de serotonina sobre la producción de andrógenos por fragmentos testiculares.....	220
4.5.3. Hámsteres adultos expuestos a fotoperíodo corto durante 14 semanas.....	224
4.5.3.1. Influencia de serotonina sobre la producción de andrógenos por fragmentos testiculares.....	224
 DISCUSION.....	 227
 CONCLUSIONES.....	 268
 BIBLIOGRAFIA.....	 278

INTRODUCCION

1. DESCRIPCION ANATOMO-FUNCIONAL DEL EJE REPRODUCTIVO

1.1. GLANDULAS ENDOCRINAS

Las **glándulas endócrinas** están formadas por grupos de células dispuestas en cordones o en placas. A diferencia de sus homólogas exócrinas, las glándulas endócrinas carecen de conductos, siendo su única conexión con el resto del cuerpo, el torrente sanguíneo. Así, las glándulas endócrinas sintetizan y secretan compuestos químicos conocidos con el nombre de **hormonas** (gr. *hormaein*, poner en movimiento, excitar), que son transportadas por sangre o linfa hacia otros tejidos u órganos del organismo, en donde participan en la regulación de sus principales procesos metabólicos. En la última década, el término "hormonas" ha sido extendido a compuestos biológicos que nunca son incorporados a la circulación general, y/o efectúan una regulación paracrina, autocrina o intracrina en los mismos órganos en que son sintetizados.

Las principales glándulas endocrinas involucradas en el control de la función reproductiva son: la hipófisis, la pineal y las gónadas (Hickman, 1986b; Geneser, 1988a).

1.2. UNIDAD HIPOTALAMO-HIPOFISARIA

La **hipófisis** (gr. *hypo*, por debajo; y gr. *fyó*, crecimiento) o **glándula pituitaria** (lat. *pituita* moco), y el **hipotálamo** (gr. *hypo*, por debajo; y gr. *thálamos*, tálamo) son estructuras anatómicamente relacionadas. Esta estrecha vinculación favorece su dependencia funcional. Por tal motivo se considera a las mismas como una **unidad hipotálamo-hipofisaria** (Fig. 1).

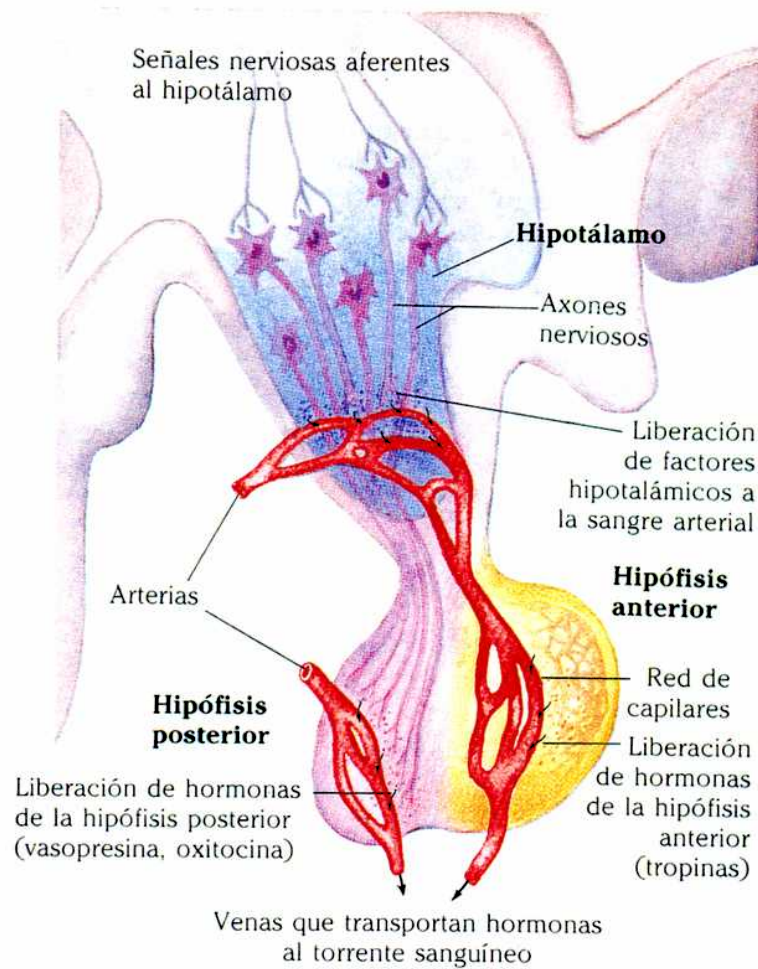


Figura 1. ESQUEMA DE LA UNIDAD HIPOTALAMO-HIPOFISARIA HUMANA.

El hipotálamo ocupa la región ventromedial del diencefalo y está comunicado con la hipófisis a través del infundíbulo.

La hipófisis está ubicada en la *silla turca*, una cavidad craneal en el hueso del esfenoides, y se encuentra fijada a la parte inferior del cerebro por medio del *tallo pituitario*. La hipófisis puede ser dividida en dos sectores: la **neurohipófisis**, y la **adenohipófisis**.

La neurohipófisis está compuesta por la *pars nervosa*, *proceso infundibular* o *lóbulo neural*; la *eminencia media* o *infundíbulo*; y por el *tallo hipofisario*, *neural* o *infundibular*. Las fibras nerviosas amielínicas del haz hipotálamo-hipofisario se originan en los *núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular*, en donde se sintetizan las hormonas *oxitocina* y *vasopresina* o *antidiurética* (ADH). Los axones neuronales corren por el tallo infundibular hacia la *pars nervosa* terminando cerca de capilares. La *pars nervosa*, es la encargada de acumular y secretar las hormonas producidas en los somas neuronales de los núcleos hipotalámicos. Así, en la *pars nervosa*, la *oxitocina* y *vasopresina* son almacenadas dentro de gránulos secretorios en íntima asociación con moléculas transportadoras, conocidas como *neurofisinas* (Geneser, 1988a).

La adenohipófisis está integrada por la *pars distalis*, la *pars tuberalis* y la *pars intermedia*.

La *pars distalis* constituye la mayor parte del tejido adenohipofisario, pudiéndose diferenciar en ella distintos tipos celulares. Las principales células acidófilas presentes en la *pars distalis* son las *células somatotróficas*, productoras de la hormona somatotrofina o de crecimiento (GH); y las *células mamotróficas* o *lactotróficas*, que secretan prolactina (PRL). Los tipos celulares basófilos de la *pars distalis* están integrados por las *células tirotróficas*, que sintetizan la hormona estimulante de la tiroides o tirotrófina (TSH); las *células gonadotróficas*, secretoras de la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), y las *células corticotróficas*, que sintetizan la hormona estimulante de la corteza adrenal o adrenocorticotrofina (ACTH).

La pars tuberalis, es una pequeña porción de la adenohipófisis en contacto con la eminencia media, formada por células similares a las encontradas en la pars distalis.

La pars intermedia presenta células del tipo basófilo productoras de la hormona estimulante de los melanocitos (MSH), que se distribuyen en una delgada capa en la zona que limita la adenohipófisis con la neurohipófisis.

La actividad adenohipofisaria está regulada por *centros hipotalámicos*. Las neuronas de estos centros hipotalámicos sintetizan compuestos que, por vía vascular y a través del sistema porta hipofisario, llegan a la células de la adenohipófisis en dónde estimulan o inhiben la síntesis y liberación de las hormonas peptídicas GH, PRL, TSH, FSH, LH y ACTH.

Las arterias hipofisarias superiores rodean la eminencia media, y allí se anastomosan y capilarizan formando el *plexo capilar primario*. Estos capilares contactan con los axones de las neuronas túbero-infundibulares produciéndose así el pasaje de las neurohormonas hipotalámicas al *sistema portal largo superior* que se dirige hacia la adenohipófisis. Existe también un *plexo capilar secundario* ubicado en el lóbulo neural y formado por la capilarización de las arterias hipofisarias inferiores, que se encuentra conectado con las células adenohipofisarias por medio de un *sistema portal corto inferior*.

Si se realiza tracción mecánica de la hipófisis en dirección anteroposterior, se pueden separar dos partes, lo que ha dado lugar a la clásica denominación de **lóbulo anterior** y **lóbulo posterior**.

El lóbulo anterior está constituido por la pars distalis de la adenohipófisis; mientras que, el lóbulo posterior comprende la pars intermedia de la adenohipófisis y la pars nervosa de la neurohipófisis (Fawcett, 1991a).

1.3. EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO-GONADAL

Las hormonas LH y FSH son sintetizadas y secretadas por la adenohipófisis en respuesta al estímulo hipotalámico generado por la hormona liberadora de

gonadotrofinas (GnRH). GnRH es un decapeptido producido en las neuronas peptidérgicas del área preóptica del hipotálamo, liberado en forma pulsátil al sistema porta hipofisario desde las terminales nerviosas de la eminencia media. Así, esta hormona llega a la hipófisis en donde interactúa con receptores de membrana presentes en los gonadotropos.

Las gonadotrofinas hipofisarias actúan sobre los testículos promoviendo y estimulando la actividad reproductiva. Mientras que la FSH ejerce su acción sobre las células de Sertoli regulando la espermatogénesis; LH actúa sobre las células de Leydig induciendo la síntesis de andrógenos. Sin embargo, ambos procesos gonadales son interactivos, requiriendo la integración y coordinación entre las distintas poblaciones celulares del testículo.

La PRL, secretada por las células lactotróficas de la adenohipófisis, interacciona con sitios de unión específicos en las células de Leydig, regulando el número de receptores gonadales de LH y el almacenamiento de los ésteres de colesterol, precursores en la síntesis de T (Tougaard y Tixier-Vidal, 1994). Además, esta hormona hipofisaria, estimula, en el hámster, la secreción de FSH, controlando de este modo la funcionalidad del sector tubular (Bartke, 1985).

Los andrógenos estimulan el crecimiento y desarrollo de los órganos reproductivos, participan en la expresión de los caracteres sexuales secundarios, inducen y mantienen el ciclo espermatogénico normal, y modulan el comportamiento sexual. Alternativamente, tejidos periféricos tales como el hígado, riñón, piel, glándula adrenal y determinados tipos celulares del sistema inmune, son influenciados por andrógenos.

A su vez, el hipotálamo y la hipófisis presentan receptores de andrógenos, que participan en la retro-modulación ejercida por estos esteroides sobre el eje reproductivo (Gharib y col., 1990).

1.4. GLANDULA PINEAL

La glándula pineal (lat. *pineal*, piña) o epífisis es un órgano aplanado en forma de piña, ubicado sobre el techo del tercer ventrículo, y rodeado por la epimadre que funciona a modo de cápsula. Desde allí parten, hacia dentro de la glándula, tabiques de tejido conectivo, vasos y fibras nerviosas que la dividen en lobulillos. Dos tipos celulares predominan en la glándula pineal, los *pinealocitos* y los *astrocitos*.

Los pinealocitos son las células más abundantes de la epífisis, y se encuentran ubicados principalmente en el parénquima glandular. Los astrocitos se encuentran localizados entre los pinealocitos y formando una cápsula por dentro de la epimadre. Entre las células de la glándula pineal, se visualizan capilares, colágeno, fibras nerviosas y una sustancia fundamental de glucosaminoglucanos ácidos producida por los pinealocitos. A partir de esta sustancia fundamental, se liberan cristales de hidroxipatita conocidos con el nombre de *acérvulos cerebrales*, *areniscas* o *arenilla cerebral*. El número de areniscas presentes en la glándula pineal aumenta con la edad (Geneser, 1988a; Fawcett, 1991b).

En los mamíferos la luz ambiental, especialmente en las longitudes de onda comprendidas en el rango del amarillo y verde, incide sobre los fotorreceptores de la *retina*, donde es convertida en un impulso eléctrico que se transmite a través del sistema nervioso central hacia las *fibras simpáticas posganglionares*, cuyos cuerpos celulares están ubicados en el *ganglio cervical superior*, y luego, por el *nervio conarius*, que se encuentra ubicado debajo de la vena de Galeno y penetra en la parte posterior de la glándula pineal, para ramificarse finalmente dentro de ella. Las terminales de los nervios conarios están íntimamente relacionadas con los pinealocitos. Los pinealocitos sintetizan grandes cantidades de la hormona **melatonina** (5-metoxi-N-acetil-triptamina). La producción de melatonina en la glándula pineal requiere la incorporación de *triptofano* desde circulación general. Este aminoácido es convertido en 5-hidroxitriptofano por acción de la triptofano hidroxilasa, y posteriormente descarboxilado a *serotonina* (5-HT) por la enzima

L-aminoácido aromático descarboxilasa. La 5-HT pineal puede ser liberada al espacio extracelular, o bien utilizada como precursora de componentes biológicamente activos. La monoamina oxidasa (MAO) presente en los pinealocitos convierte a la 5-HT en 5-hidroxiindol acetaldehído, un intermediario inestable que es rápidamente oxidado a 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), o reducido a 5-hidroxitriptofol por una enzima alcohol deshidrogenasa. La conversión de 5-HT en melatonina involucra dos pasos enzimáticos. Primeramente, una N-acetilación que requiere como co-sustrato a la acetil coenzima A; y luego, la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina al grupo 5-hidroxi de la N-acetil 5-HT por una hidroxindol-O-metiltransferasa. Los componentes 5-HIAA, 5-hidroxitriptofol y 5-hidroxitriptofano, también son susceptibles a la metilación por acción de esta enzima.

La melatonina sería secretada desde la glándula pineal vía difusión simple. Su liberación a la circulación general presenta fluctuaciones diarias y anuales, detectándose los mayores niveles plasmáticos de esta hormona durante el período de oscuridad. Así, la producción y secreción cíclica de la melatonina y otras sustancias por la glándula pineal, regularía la producción y liberación de las hormonas hipotálamicas, y consecuentemente, a la adenohipófisis, jugando un papel importante en el control de otros procesos rítmicos en el organismo (Cardinali, 1981). En particular, se ha investigado ampliamente el control pineal del eje reproductivo. En hámsteres hembras y machos, la privación de luz por ceguera o por exposición a fotoperíodos no estimulatorios (menores de 12.5 horas de luz por día) produce una marcada regresión de los órganos reproductivos (Berndtson y Desjardins, 1974; Tamarkin y col., 1976a). Sin embargo, no se observa dicha involución gonadal en animales pinealectomizados, indicando que el efecto de la oscuridad sobre el sistema neuroendócrino es mediado por la glándula pineal. Estudios realizados en otras especies fotoperiódicas tales como hurones (Herbert y Klinowska, 1978; Boissin-Agasse y col., 1988; Sisk, 1990) y ovejas (Legan y col., 1977; Ebling y col., 1989; Barrell y col., 1992), señalan también un control pineal de la actividad sexual. La regulación pineal de la función reproductiva resulta del

control ejercido por la melatonina sobre la unidad hipotálamo-hipofisaria, y en consecuencia, sobre la producción y liberación de gonadotrofinas. No obstante, estudios *in vitro* realizados con fragmentos testiculares aislados y células de Leydig, han demostrado que la melatonina inhibe la producción de testosterona (T), señalando una modulación local de la funcionalidad testicular por parte de esta hormona pineal que es independiente de la actividad hipofisaria (Ellis, 1972; Valenti y col., 1995; Giusti y col., 1997).

1.5. TRACTO GENITAL MASCULINO

El tracto genital masculino de los mamíferos comprende un conjunto de órganos y conductos (Fig. 2). Según sus funciones, pueden ser clasificados en tres grupos:

- los **testículos**, glándulas endócrinas productoras de andrógenos y factores que proporcionan el medio adecuado para el desarrollo de la espermatogénesis;
- las **vías deferentes** (*conductos eferentes, epidídimo, conducto deferente y uretra*) involucradas en el transporte, maduración y/o almacenamiento de los espermatozoides;
- y las **glándulas sexuales accesorias** (*vesículas seminales, próstata, glándulas coagulantes, glándulas bulbouretrales y glándulas uretrales*) cuyas secreciones constituyen la fracción principal del líquido seminal (Setchell y Brooks, 1988).

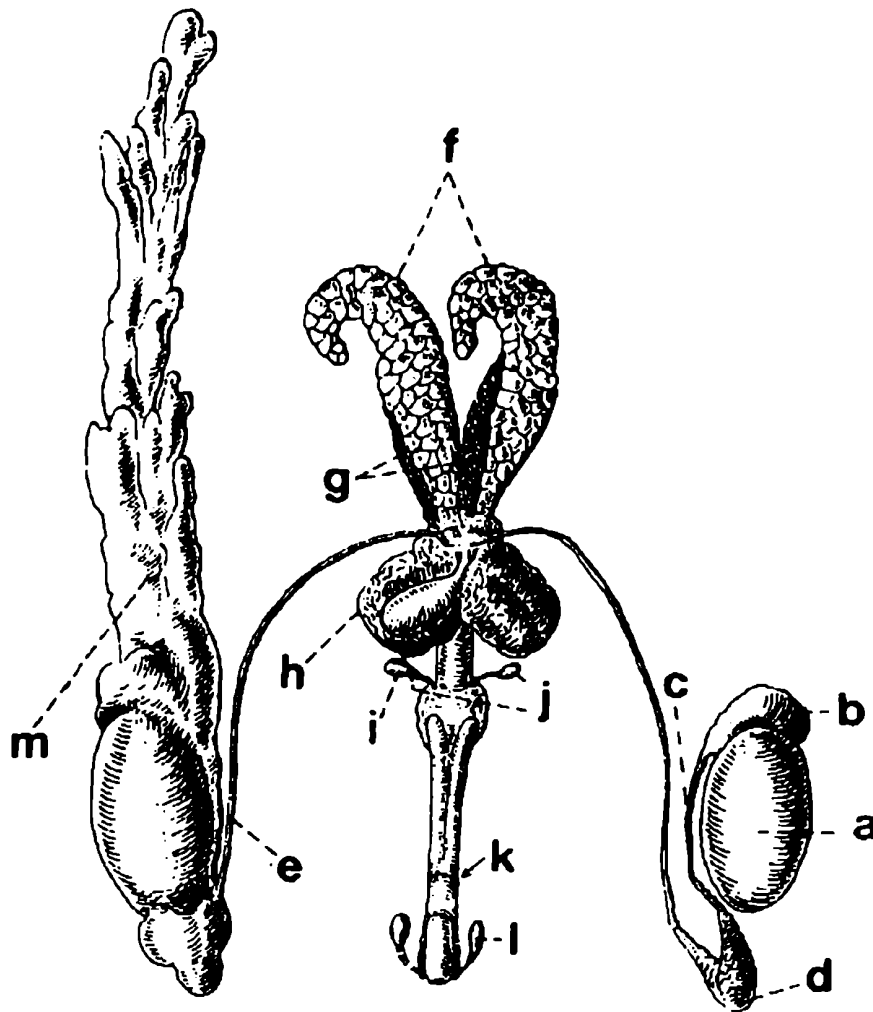


Figura 2. ESQUEMA DEL TRACTO GENITAL MASCULINO DE LA RATA

a: testículo; b: cabeza del epidídimo; c: cuerpo del epidídimo; d: cola del epidídimo; e: conducto deferente; f: vesículas seminales; g: glándulas coagulantes; h: próstata; i: vejiga; j: glándulas bulbouretrales; k: pene; L: glándulas prepuciales; m: tejido adiposo.

1.5.1. Testículo

En los mamíferos, los testículos (gr. *orchis* o *didymis*) se encuentran de a pares ubicados fuera del abdomen, en el escroto, y rodeados por una cápsula de tejido conectivo, la *túnica albugínea*. Desde la túnica albugínea se extiende un engrosamiento hacia el interior del órgano, *el mediastino testicular o cuerpo de Highmore*, del cual emergen tabiques de tejido conectivo que separan el tejido glandular en 200-300 *lobulillos testiculares*. Cada lobulillo contiene varios **túbulos seminíferos**, representantes del compartimiento productor de espermatozoides del testículo. Los túbulos seminíferos se continúan en *túbulos rectos* que desembocan en la *rete testis*, un sistema de conductillos ubicado en el mediastino. La túnica albugínea está recubierta en su parte externa por una capa de *mesotelio*, y contacta en profundidad con una capa de tejido conectivo vascular laxo, la *túnica vascular*. Ésta se comunica con el **intersticio**, que rodea los túbulos seminíferos y contiene a las **células intersticiales o de Leydig**, que presentan función endocrina (de Kretser y Kerr, 1994).

1.5.1.1. Túbulos seminíferos

Los túbulos seminíferos poseen un diámetro aproximado de 200-250µm con longitudes que varían según la especie. La pared de los túbulos seminíferos está compuesta por cuatro capas. A partir de la luz tubular, la primer capa corresponde a la membrana basal, la cual se encuentra rodeada por células mioides responsables de los movimientos peristálticos del túbulo. La tercer capa está formada por fibras de colágeno; mientras que, la zona más externa de los túbulos seminíferos está integrada por células endoteliales que revisten los sinusoides linfáticos del tejido intersticial. Por dentro de la membrana basal, los túbulos se encuentran revestidos por un epitelio estratificado que contiene dos tipos de células: las denominadas **células de sostén, nodrizas o de Sertoli**, y las **células espermátogénicas** que

comprenden espermatogonias, espermatoцитos primarios y secundarios, espermátides y espermatozoides (Setchell y col., 1994).

1.5.1.1.1. Células de Sertoli

Las células de Sertoli son significativamente mas escasas que las células espermatogénicas y están distribuídas entre ellas a intervalos regulares. Su citoplasma es irregular debido a que emiten numerosas prolongaciones laterales finas entre las células germinales. El núcleo de las células de Sertoli es oval o bien con marcadas aristas, presentando un profundo repliegue en la membrana nuclear. Se observan de modo característico gotas de lípidos en el citoplasma, un retículo liso desarrollado, y numerosas mitocondrias, lisosomas y vacuolas. En la región basal hay uniones estrechas entre las células de Sertoli adyacentes, las que, junto con la membrana basal y la capa de células mioides constituyen la llamada *barrera hematotesticular* (Dym y Fawcett, 1970). Dicha barrera restringe el pasaje de sustancias del sector intersticial al interior tubular y viceversa. Se ha comprobado que las células de Sertoli proveen de 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, 1991c). Además, actúan como fagocitos permitiendo la degradación de los cuerpos citoplasmáticos residuales que se desprenden de las espermátides (Clegg y Macmillan, 1965a), y presentan una importante actividad secretoria (Bardin y col., 1994).

1.5.1.1.1.1. Mecanismo de acción de FSH en las células de Sertoli

La actividad fisiológica de las células de Sertoli se encuentra básicamente regulada por la acción de la FSH mediante la interacción de esta hormona hipofisaria con receptores de membrana. Cuando el ligando específico se une a la superficie celular, el complejo hormona-receptor interacciona con una *proteína estimuladora capaz de unirse específicamente a nucleótidos de guanina (Gs)*. Las

proteínas G son una familia de proteínas ligadoras del nucleótido guanosina trifosfato (GTP) que interaccionan con señales extracelulares, y transmiten dicha señal a través de la membrana a un efector intracelular. Así, la proteína Gs activa al *sistema adenilato ciclasa*, el cual responde sintetizando el nucleótido adenosina 3',5' monofosfato cíclico (AMPc) (Casey y Gilman, 1988). Posteriormente, se activa la *enzima proteína quinasa AMPc dependiente (PKA)*, que fosforila proteínas estructurales y enzimas (Ireland y col., 1986). La PKA puede controlar la síntesis de proteínas a nivel transcripcional, mediante la fosforilación de activadores de este proceso, entre ellos *la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB)*. La región regulatoria de los genes activables por FSH contiene una corta secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) conocida como *elemento de respuesta al AMPc (CRE)*. Esta secuencia es reconocida por el CREB previamente fosforilado por la PKA estimulándose, en consecuencia, la transcripción de dichos genes (Deutsch y col., 1988). Este evento lleva a una cascada de respuestas que incluye la síntesis de factores de transcripción adicionales y la activación de enzimas o proteínas estructurales. Si bien se ha descrito la vía del fosfatidilinositol en las células de Sertoli (Quirk y Reichert, 1988), no existen evidencias claras de su activación por FSH. Se ha propuesto un mecanismo de interconexión entre las vías de la adenilato ciclasa y fosfatidilinositoles, que involucraría la fosforilación de la unidad catalítica de la adenilato ciclasa por una proteína quinasa C (PKC) (Yoshimasa y col., 1987). Estos hallazgos permiten especular una posible interacción entre los sistemas de transducción de señales en la célula de Sertoli. La intensidad y duración de la respuesta de la célula de Sertoli a FSH está modulada por un serie de mecanismos, que incluyen a la *enzima fosfodiesterasa*, que degrada el AMPc sintetizado; *fosfatasas*, que hidrolizan el grupo fosfato de las proteínas fosforiladas previamente por quinasas; e *inhibidores de las proteínas quinasas* (Conti y col., 1983).

La célula de Sertoli experimenta marcados cambios estructurales y funcionales durante el proceso de maduración sexual. La respuesta de las células de Sertoli a la FSH varía de acuerdo al estadio de desarrollo del animal. En el período fetal y en la primera semana de vida, esta hormona hipofisaria estimula la

proliferación de las células de Sertoli. Dos a tres semanas luego del nacimiento, las células de Sertoli responden en menor medida a la FSH (Orth, 1982) variando, en consecuencia, la función primaria de esta hormona. Durante la etapa prepuberal, la FSH resulta esencial en la diferenciación final de la célula de Sertoli, puesto que participa en la formación de la barrera hemato-testicular (Posalaky y col., 1981), y en la iniciación del primer ciclo espermatogénico. La FSH también es requerida para la normal actividad secretoria de las células de Sertoli de proteínas tales como ceruloplasmina, transferrina, glicoproteínas sulfatadas 1 y 2, la proteína ligadora de andrógenos (ABP), un polipéptido mitogénico, un factor inhibidor de la meiosis, inhibina y activina (Hansson y col., 1976; Sanborn y col., 1986; Bardin y col., 1994; Griswold, 1988). Al alcanzar la edad adulta, la respuesta de las células de Sertoli a la FSH se modifica nuevamente (Hansson y col., 1976). En esta etapa, existe un gran aumento en la actividad fosfodiesterasa, alterándose en consecuencia, la acumulación de AMPc y la estimulación de la expresión de proteínas específicas (Means y col., 1980).

1.5.1.1.1.2. *Inhibina y activina*

La **inhibina** fue purificada por primera vez a partir de fluído folicular bovino. Esta proteína está compuesta por dos cadenas polipeptídicas, designadas *subunidades α y β* , unidas por puentes disulfuro (Robertson y col., 1985). La subunidad α es obtenida luego del clivaje del dominio amino-terminal de su precursor: la *pro- α inhibina* (Robertson y col., 1989; Sugino y col., 1989). Se han descripto dos tipos diferentes de sub-unidades β (β_A y β_B), las cuales determinan la existencia de distintas formas de inhibina: *inhibina A* e *inhibina B* (Ling y col., 1986; Vale y col., 1986). La célula de Sertoli presenta una importante expresión de inhibina B, principalmente en los estadios XIII-I del ciclo del epitelio seminífero, que son los más sensibles a FSH. Así, la producción de $\alpha\beta_B$ estaría regulada por esta hormona hipofisaria; mientras que, la expresión de la inhibina A que ocurre mayoritariamente en los estadios X-XI, sería independiente de la FSH y estaría modulada por otros

factores paracrinós aportados por el epitelio (Parvinen y col., 1986). Las diversas formas de la sub-unidad β , se combinan para dar tres dímeros distintos de **activina**: activina A ($\beta_A\beta_A$), activina B ($\beta_B\beta_B$), y activina AB ($\beta_A\beta_B$). Recientemente se aisló, de hígado humano, un ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que codifica para un tercer tipo de sub-unidad β (β_C) (Hotten y col., 1995); y en *Xenopus laevis* se obtuvo un ADN complementario (ADNc) codificante de la sub-unidad β tipo D (Oda y col., 1995). En 1993, Winter y col., detectaron que las células de Sertoli de rata producen importantes concentraciones de activina *in vitro*.

Las sub-unidades β_A y β_B , presentan un 30% de homología con la sub-unidad β del factor de crecimiento transformante (TGF), razón por la cual las inhibinas y activinas han sido clasificadas como miembros de la superfamilia de factores de crecimiento y diferenciación (Mason y col., 1985).

Es interesante remarcar que, las células de Leydig adultas expresan ARNm correspondientes a la sub-unidad α ; mientras que, existe información contradictoria sobre la detección de polipéptidos β , y en consecuencia de dímeros de activina e inhibina en este tipo celular (Roberts y col., 1989; Shaha y col., 1989; Veeramachaneni y col., 1989; Bergh y Cajander, 1990; Ogawa y col., 1991; de Winter y col., 1992b; Mather y Krummen, 1992; Vannelli y col., 1992; Vliegen y col., 1993). Así, las células de Sertoli serían la principal fuente testicular de inhibina y activina. Además de su conocido rol en la modulación de la secreción hipofisaria de gonadotrofinas (Ling y col., 1986; Vale y col., 1986), estas proteínas ejercen también una regulación autocrina/paracrina sobre la proliferación celular (Vale y col., 1989; Kaipia y col., 1994) y los principales procesos gonadales: esteroidogénesis y espermatogénesis (Hsueh y col., 1987; van Dissel-Emiliani y col., 1989; Mather y col., 1990; Maudit y col., 1991; Mather y Krummen 1992; Winter y col., 1993), habiéndose detectado sitios de unión específicos para inhibina y activina en distintas poblaciones celulares del testículo (de Winter y col., 1992a; Kaipia y col., 1992; Feng y col., 1993; Kaipia y col., 1993; Krummen y col., 1994).

1.5.1.1.2. Ciclo espermatogénico

La **espermatogénesis** es un proceso ordenado que conduce al desarrollo de espermatozoides haploides a partir de células precursoras diploides ubicadas en los túbulos seminíferos del testículo. La ocurrencia regular de este proceso se conoce como *ciclo espermatogénico*. Este ciclo se subdivide en un número fijo de estadios, cada uno de los cuales presenta una organización única de los distintos tipos de células germinales en diferentes etapas de su desarrollo (Clermont y Perey, 1957; Le Blond y Clermont, 1952). Los estadios se denominan con números romanos, encontrándose 14 de ellos en la rata, 6 en el hombre, y 16 en el hámster (Fig. 3). En muchas especies, cada estadio se extiende en una porción determinada del túbulo, milimétrica, denominada *segmento*. Un segmento queda contenido entre otros dos, de números de estadio más bajo y más alto. Toda la fila de segmentos, con los distintos estadios en orden numérico, constituye la *onda espermática del epitelio seminífero*. La duración del ciclo espermatogénico es fija, siendo de 12.8 días en la rata, 7.90 días en el hámster y 64 días en el hombre (Clermont y col., 1959; Geneser, 1988b; Van Haaster y de Rooij, 1993). Las células germinales se ubican en el epitelio de los túbulos seminíferos según su estadio evolutivo, encontrándose a las espermatogonias en la porción más basal, seguidas por espermatocitos y espermátides en dirección luminal. Las espermatogonias representan el punto de partida de la espermatogénesis. En el humano, pueden distinguirse dos tipos de espermatogonias: A y B, que presentan entre sí marcadas diferencias morfológicas y funcionales. Las espermatogonias tipo A son células troncales que sufren sucesivas mitosis. Parte de las células obtenidas por división mitótica, permanecerán en reposo como células germinales de reserva, mientras que otras se diferenciarán a espermatogonias B. Estas células diferenciadas no retroceden al estadio de célula troncal, originando por mitosis nuevas espermatogonias tipo B que finalmente maduran a espermatocitos primarios.

Los espermatoцитos primarios entran en la primer fase meiótica del ciclo celular generando espermatoцитos secundarios haploides. Durante la segunda división meiótica se producen espermátides redondeadas que posteriormente se transformarán en espermatozoides en la *espermiogénesis*. Este evento involucra complejas alteraciones estructurales para obtener células elongadas con un flagelo movilizable por la presencia de numerosas mitocondrias en la pieza intermedia de la cola del espermatozoide. En la rata, la aparición del primer espermatozoide en el lumen tubular es observada aproximadamente a los 45 días de edad (Clermont y Perey, 1957). En forma similar, el hámster alcanza la pubertad entre los 42 y 56 días posteriores a su nacimiento (Festing, 1972). La FSH en combinación con los andrógenos, actuando a través de receptores específicos presentes en las células de Sertoli, resultan esenciales en la iniciación y mantenimiento del proceso espermatogénico. No se han detectado proteínas ligadoras de gonadotrofinas u hormonas sexuales en las células germinales (Bremner y col., 1994); indicando que la comunicación intercelular entre los componentes del compartimiento tubular, es fundamental para lograr una gametogénesis normal (Gondos y Berndston, 1993).

1.5.1.2. Tejido intersticial

El compartimiento intersticial está compuesto por una malla irregular de tejido conectivo laxo que ocupa los espacios entre los túbulos seminíferos y contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios testiculares. En el mismo también se observan fibroblastos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, monocitos y mastocitos (Nistal y col., 1984; Ritchie y col., 1984; Niemi y col., 1986; Russell, 1996). Sin embargo, el componente celular más importante de este tejido está representado por las *células intersticiales* o *células de Leydig*, que constituyen la parte endócrina del testículo, puesto que sintetizan y secretan hormonas sexuales masculinas, esenciales para el mantenimiento de la espermatogénesis, los caracteres sexuales secundarios y el trofismo de todo el tracto reproductivo.

1.5.1.2.1. Células de Leydig

Las células de Leydig se encuentran generalmente agrupadas en cúmulos relacionados con capilares o bien cercanos a la pared de los túbulos seminíferos. Son células poligonales o fusiformes, con un diámetro de 8-12 μm en la rata, que presentan a menudo proyecciones que fueron descritas por algunos autores como filapodios o microvellosidades (Ohata, 1979; Schulze, 1984). Su núcleo es grande y redondo, de localización excéntrica y presentan uno o dos nucleolos prominentes (Christensen, 1975). El citoplasma acidófilo, contiene lisosomas, peroxisomas, vesículas pinocíticas, cuerpos multivesiculares, un retículo endoplasmático liso y un aparato de Golgi muy desarrollados, y múltiples mitocondrias (Ewing y Zirkin, 1983; Russell, 1996). Las células de Leydig se desarrollan, bajo el estímulo de la LH, a partir de precursores que han sido definidos en la literatura como células mesenquimáticas, células mioides peritubulares y macrófagos (Clegg y Macmillan, 1965b; Christensen, 1975; Hardy y col., 1993; de Krester y col., 1994). El 95% de la T circulante es producida por las células de Leydig. Se cree que la forma activa de la T es la 5α -dihidrotestosterona (DHT), y que la especial sensibilidad a la T de ciertos tejidos, se debe a que sus células son capaces de reducirla a DHT. En la actualidad es reconocido que las células de Leydig sintetizan también otras sustancias bioactivas involucradas en la regulación paracrina y autocrina de la función testicular. Así, proveen numerosas hormonas y factores potencialmente activos tales como oxitocina (Guldenaar y Pickering, 1985), péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina (POMC) (Bardin y col., 1984), prostaglandinas (Abayaskeara y col., 1988), leucotrienos (Sullivan y Cooke, 1985), activina (Lee y col., 1988), inhibina (Lau y Li, 1987; Garde y col., 1988; Vliegen y col., 1993), renina-angiotensina (Parmetier y col., 1983; Sharpe, 1984), factor liberador de corticotrofina (CRF) (Thompson y col., 1987), β -endorfinas (Spera y col., 1988), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Suarez Quian y Niklinski, 1990), sustancia P (Chiwakata y col., 1991), factor de crecimiento insulínico I y II (Dombrowicz y col., 1992), GH (de Krester y col., 1969) y TGF (Teerds y Dorrington, 1993).

1.5.1.2.1.1. Biosíntesis de andrógenos

Las células de Leydig son la principal fuente de hormonas sexuales en el macho; aunque la corteza adrenal también contribuye a los niveles circulantes de estas hormonas, y se ha descrito la producción local de pequeñas cantidades de esteroides en sistema nervioso central (Baulieu y Robel, 1990).

El colesterol es el precursor obligado en la síntesis de andrógenos. Las fuentes celulares de colesterol son:

- la síntesis celular *de novo*,
- las lipoproteínas plasmáticas transportadoras de colesterol, y
- las gotas citoplasmáticas de ésteres de colesterol que actúan a modo de reservas intracelulares.

En la rata, el 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 paso limitante en el camino biosintético del colesterol corresponde a la producción irreversible de mevalonato catalizada por la enzima β -hidroxi-metil-glutaril coenzima A (CoA) reductasa. La actividad de esta enzima se encuentra altamente regulada por el aporte de colesterol dietario, por un mecanismo de inhibición alostérico vía mevalonato, y por la acción conjunta de quinasas y fosfatasas. En las células testiculares existe un equilibrio entre el colesterol libre y los ésteres de colesterol. Dicho equilibrio es regulado por la enzima acilCoA colesterol aciltransferasa que esterifica al colesterol, y por la enzima colesterol éster hidrolasa o esterasa que cataliza la reacción inversa (Naghshineh y col., 1978).

La síntesis de andrógenos comienza con la movilización de los ésteres de colesterol localizados en las gotas citoplasmáticas como respuesta al estímulo gonadotrófico (Hall, 1963), siendo éste un punto de regulación clave en dicho camino biosintético. Las enzimas e intermediarios involucrados en el camino biosintético de los andrógenos se encuentran esquematizados en la Fig. 4.

Dicha biosíntesis involucra la conversión del colesterol a pregnenolona, catalizada por un complejo multienzimático dependiente del citocromo P-450, ubicado en la membrana interna mitocondrial (Shikita y Hall, 1973), que escinde la cadena lateral del colesterol (SCC) entre los carbonos 20 y 22. En el retículo endoplasmático liso, la pregnenolona es convertida en andrógenos de 19 carbonos. Esta conversión puede ocurrir por dos caminos diferentes: Δ^4 o Δ^5 (Sweet y col., 1985). Esta terminología designa la posición que el enlace insaturado mantiene durante la transformación de intermediarios a T. Así, la pregnenolona puede ser sustrato de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ^5 - Δ^4 isomerasa (3 β -HSD) dando origen a la progesterona a través del camino Δ^4 ; y posteriormente, la progesterona es transformada en androstenediona por el complejo enzimático 17 α hidroxilasa C17-20 liasa, dependiente del citocromo P-450 (P-450c17). Pero también, la pregnenolona puede seguir la vía Δ^5 obteniéndose primeramente dehidroepiandrosterona por acción del complejo P-450c17 (Hall, 1994) y luego, por isomerización, androstenediona.

La elección del camino esteroideogénico no está librada al azar. El camino Δ^4 fue el primero en ser identificado en el testículo de rata, y estudios posteriores han demostrado que la conversión a través de intermediarios Δ^5 posee muy poca significancia en esta especie (Samuels, 1960; Bell y col., 1968; Kwan y col., 1988). En cambio, en el testículo de humanos y primates superiores, la síntesis de T se realiza a través del camino Δ^5 (Rajfer y col., 1987; Rey y col., 1995); mientras que, en cerdos, conejos y perros (Hall y col., 1964; Roukenen y Vihko, 1974), se emplea el camino Δ^5 en distintas proporciones.

El paso final en la síntesis de T está regulado por la enzima microsomal 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β HSD), que cataliza la conversión de androstenediona a T. Dicha reacción es reversible siendo su dirección regulada por la concentración de sustrato y producto (Oshima y Ochi, 1973). Esta enzima posee dos sitios activos (Samuels y col., 1975) y presenta múltiples isoformas (Luu-The y col., 1990; Peltoketo y col., 1992).

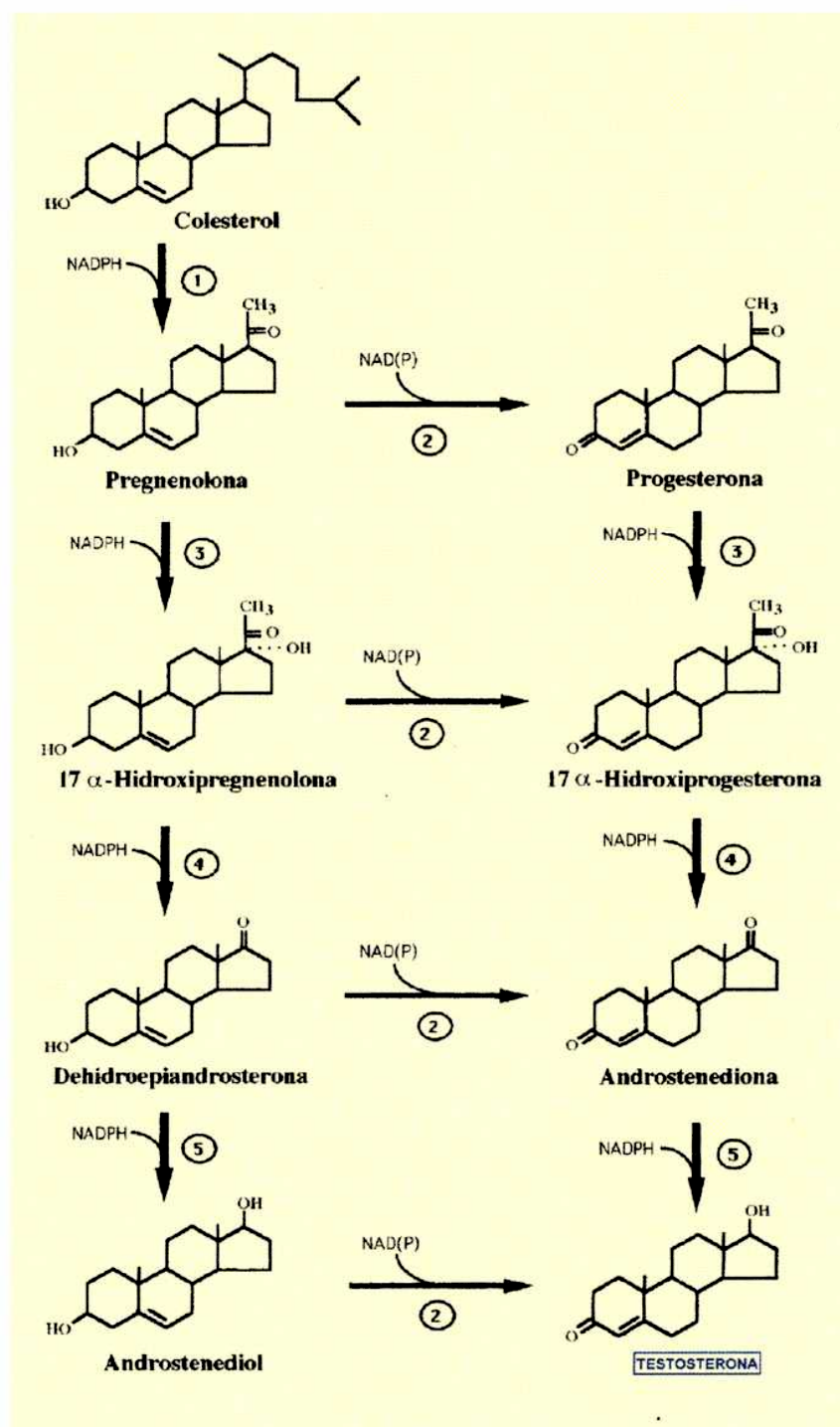


Figura 4. BIOSINTESIS DE ANDROGENOS TESTICULARES

1: Complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol; 2: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/4-5 isomerasa; 3: 17 α -hidroxilasa; 4: 17,20-liasa; 5: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Los niveles séricos de T resultan de un balance entre la producción de esta hormona y su desaparición de la circulación vía excreción y transformación metabólica (Sundaram y Kumar, 1996). Algunos esteroides se excretan libres. Sin embargo, el catabolismo y excreción de la mayoría de los andrógenos, involucra la inicial transformación de los mismos en compuestos de mayor solubilidad en agua a través de su conjugación con glucurónidos y sulfatos en la posición 3 ó 17. Con excepción de los esteroides fenólicos, las reacciones catabólicas son reductivas y ocurren mayoritariamente en el hígado; aunque la próstata y la piel también contribuyen significativamente al metabolismo degradativo de los andrógenos (Deslypere y col., 1982; Rittmaster y col., 1988). Los 3α -hidroxiesteroides aparecen principalmente conjugados como glucurónidos; mientras que, la mayoría de los 3β -hidroxiesteroides son excretados en forma de sulfatos. Una gran parte de los metabolitos de los andrógenos son eliminados a través de la orina. Los compuestos 3α -hidroxi- 5α -androstano-17-ona (androsterona) y 3α -hidroxi- 5β -androstano-17-ona (etiocolanolona) son los metabolitos urinarios más abundantes excretados mayoritariamente como glucuronidos (Fortherby y James, 1972).

Sin embargo, las transformaciones metabólicas no siempre están asociadas con una disminución en la actividad biológica. La metabolización de la T a través de la 5α -reducción irreversible origina DHT, y una notoria amplificación de sus acciones biológicas (Kumar y col., 1992). A su vez, la DHT puede ser metabolizada a 5α -androstano $3\alpha/\beta$, 17β -diol (Diol) por acción de las enzimas $3\alpha/\beta$ hidroxiesteroide óxido reductasa, que requieren nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato reducido (NADPH) como cofactor (Wilson y Gloyna, 1970; Shimazaki y col., 1972) (Fig. 5). En testículos de animales inmaduros y púberes, se describe una importante actividad de las enzimas 5α -reductasa y 3α -hidroxiesteroide óxido-reductasa, sintetizándose metabolitos 5α -reducidos tales como Diol (Rivarola y Podestá, 1972; Rivarola y col., 1972; Peng y col., 1979). En el caso de especies fotoperiódicas, a través de 5β -reducción se obtienen concentraciones importantes de compuestos 5β -reducidos de función desconocida (Martini, 1982). Por otro lado, la T y la androstenediona son interconvertibles vía 17β -HSD. Estas dos hormonas pueden

estar sujetas a hidroxilaciones, pero dichas reacciones no contribuyen significativamente al metabolismo general. No obstante, la T y la androstenediona pueden actuar como sustratos durante la aromatización a estrógenos ocurrida en gónadas, cerebro y algunos tejidos periféricos (Mooradian y col., 1987).

1.5.1.2.1.2. Regulación de la síntesis de andrógenos

La principal regulación fisiológica de la síntesis gonadal de andrógenos es ejercida por la adenohipófisis a través de la secreción pulsátil de LH; aunque otras hormonas y factores producidos localmente, también estarían involucrados en este proceso mediante un control autocrino y/o paracrino entre las células de Leydig y los restantes componentes testiculares (Campos y col., 1990a; Campos y col., 1990b; Ritta y col., 1991; Mather y Krummen, 1992; Tinajero y col., 1992; Verhoeven, 1992; Boujrad y col., 1995). La FSH ejerce también un efecto modulador sobre la actividad de las células de Leydig mediante la secreción de proteínas específicas (Saez y col., 1991). Por otra parte, las hormonas hipofisarias PRL y ACTH serían capaces de influenciar el estado funcional de estas células esteroideogénicas (Liptrap y Raeside, 1975; Juniewicz y Johnson, 1981; Juniewicz y Johnson, 1983; Bartke y col., 1985a; Calandra y col., 1982). La acción estimuladora de la LH sobre la producción de andrógenos se ejerce a través de su unión a receptores específicos ubicados en la membrana de las células de Leydig, cuya estructura ha sido recientemente dilucidada (Loosfelt y col., 1989; McFarland y col., 1989).

Dicha interacción ligando-receptor induce un cambio conformacional en la proteína G, que activa una adenilato ciclasa, dependiente de GTP y Mg^{+2} , ocasionando un aumento en la síntesis de AMP_c (Duffau y col., 1973). El AMP_c obtenido se une a la subunidad regulatoria de una PKA con la subsiguiente liberación de la subunidad catalítica de la misma.

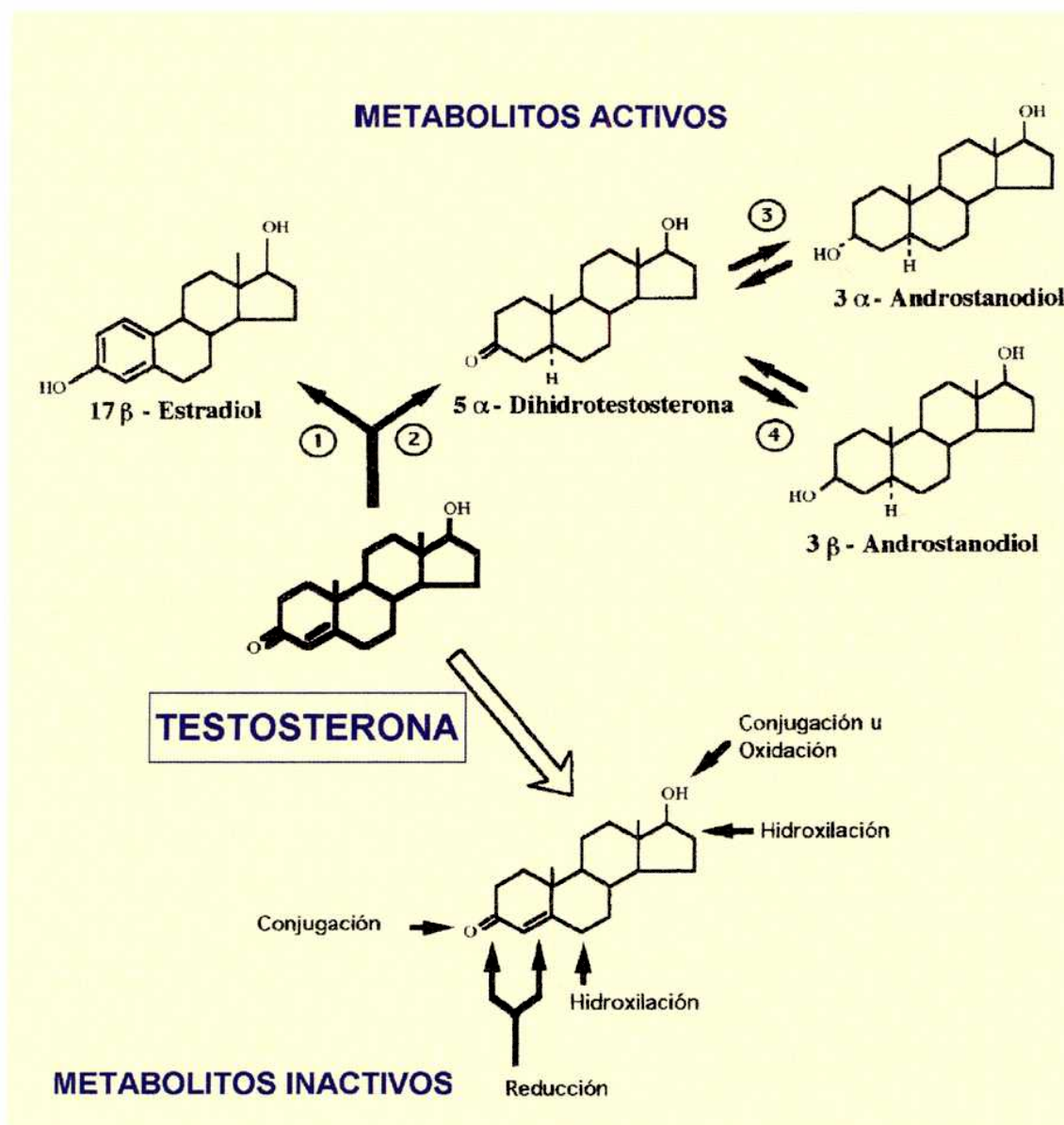


Figura 5. METABOLISMO DE LA TESTOSTERONA

1: Complejo de la aromatasa; 2: 5 α -reductasa; 3: 3 α -hidroxiesteroide óxido reductasa;
4: 3 β -hidroxiesteroide óxido reductasa

Esta subunidad catalítica activa, fosforila proteínas intracelulares, en sus residuos de treonina y serina, que intervienen en la síntesis de esteroides regulando la expresión génica y traducción de enzimas claves del proceso (Podestá y col., 1976; Hall y col., 1979; Pon y col., 1986; Rommerts y Cooke, 1988; Epstein y Orme-Johnson, 1991).

Si bien la función del AMP_c como segundo mensajero en la acción de LH se encuentra bien establecida, recientemente se han descrito mensajeros alternativos (Hall, 1994) y respuestas rápidas, que involucran cambios en el flujo iónico transmembrana, depósitos intracelulares de calcio, actividad de la proteína calmodulina, y alteraciones en el metabolismo y recambio de fosfolípidos (Rommerts, 1990).

Clark y col. (1994) en la línea MA-10 de células de Leydig tumorales de ratón, y Sugawara y col. (1995) en tejidos humanos, han purificado y caracterizado a una proteína regulatoria aguda de la esteroidogénesis conocida como StAR. Las células de Leydig, en respuesta al estímulo hormonal trófico, sintetizarían una proteína citoplasmática precursora de StAR de 37KDa. Este precursor se asociaría a proteínas chaperonas que impedirían el plegado y consecuentemente, su transporte hacia la mitocondria. La proteína de 37KDa sería entonces incorporada a esta organela subcelular a través de su interacción con un receptor específico presente en la membrana externa mitocondrial. Posteriormente, se formarían puntos de contacto entre las membranas externa e interna de la mitocondria, y ocurriría el primer evento de clivaje, obteniéndose una forma intermediaria de la proteína StAR de 32KDa. Esta fusión de membranas, facilitaría el transporte del colesterol hacia la membrana interna mitocondrial. Finalmente, las membranas se fisionarían, y la proteína de 32KDa sufriría un segundo clivaje originándose un producto de 30KDa incapaz de participar en el transporte de colesterol. Así, el ingreso de colesterol en la mitocondria, estaría controlado a través de la continua síntesis y procesamiento de StAR, y la formación de sitios de contacto entre las dos membranas de la organela (Stocco, 1996).

Existe otro importante grupo de proteínas involucradas en la regulación de la producción de andrógenos, entre las cuales podemos citar a un transportador proteico de colesterol que moviliza dicho compuesto desde las gotas lipídicas citoplasmáticas a la mitocondria (SCP₂) (Chanderbhan y col., 1982; Vahouny y col., 1983; Vahouny y col., 1984; Trzeciak y col., 1987; Van Noort y col., 1988; Rennert y col., 1991; Pfeifer y col., 1993); un polipéptido activador de la esteroidogénesis (SAP) (Pedersen y Brownie, 1983; Pedersen, 1984; Pedersen, 1987; Frustaci y col., 1989; Mertz y Pedersen, 1989); una proteína inductora de la esteroidogénesis (SIP) (Khan y col., 1988; Khan y col., 1991; Stocco y Khan, 1992); y al receptor periférico de benzodiacepinas (PBR) presente en altas concentraciones en la membrana mitocondrial externa de tejidos esteroidogénicos (Anholt y col., 1986; Calvo y col., 1990; Krueger y Papadopoulos, 1992; Papadopoulos, 1993). Ligandos exógenos del PBR (Yanagibashi y col., 1989; Barnea y col., 1989; Amsterdam y Suh, 1991) y su ligando endógeno, el péptido inhibidor de la unión de diazepam o endozepina (DBI) (Costa y Guidotti, 1991; Cavallaro y col., 1992; Papadopoulos y col., 1991a; Papadopoulos y col., 1991b) estimularían la producción de andrógenos mediante la formación de un complejo poro en la membrana mitocondrial, a través del cual el colesterol podría ingresar a la organela (Papadopoulos y col., 1994). Sin embargo, información reciente indica que, el tratamiento de tejidos esteroidogénicos con ligandos de PBR podría también inhibir la síntesis de esteroides (Shibata y col., 1986; Holloway y col., 1989; Thomson y col., 1992; Python y col., 1993).

1.5.1.2.2. Otros componentes celulares del tejido intersticial

El tejido intertubular presenta, en íntima asociación con las células de Leydig, otros tipos celulares dentro de los cuales se incluyen fibroblastos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, monocitos y mastocitos (Nistal y col., 1984; Ritchie y col., 1984; Niemi y col., 1986; Russell, 1996).

Los macrófagos intersticiales, endocíticamente activos, establecen contactos especializados con las células de Leydig, y participarían en la destrucción de las células intersticiales ocurrida durante lesiones testiculares (de Kretser y Kerr, 1994).

Los fibroblastos del tejido intersticial han sido postulados como precursores de las células de Leydig funcionalmente activas. Alternativamente, la desdiferenciación de las células de Leydig, origina células funcional y morfológicamente semejantes a los fibroblastos intertubulares (de Kretser y Kerr, 1994).

El daño tisular del compartimiento intersticial, genera un aumento significativo en el número de células mononucleadas tales como monocitos, linfocitos y células plasmáticas (de Kretser y Kerr, 1994). En testículos humanos, se ha descrito la presencia de mastocitos en el tejido intertubular. Contrariamente, en la rata y el hámster, los mastocitos han sido localizados exclusivamente en la periferia del testículo, en el tejido areolar de la túnica albuginea (Mayerhofer y col., 1989b; de Kretser y Kerr, 1994). Estas células producen histamina y 5-HT, que son secretadas al espacio intertubular y participarían en la regulación de la función testicular (Mayerhofer y col., 1989b; Tinajero y col., 1993a).

1.5.1.3. Relaciones paracrinas, autocrinas e intracrinas en el testículo

Si bien la función testicular se halla básicamente regulada por LH y FSH, que ejercen su efecto trófico sobre las células de Leydig y Sertoli respectivamente; la intensidad y duración de las respuestas a las gonadotrofinas están moduladas por complejas interacciones paracrinas, autocrinas e intracrinas (Pollanen y col., 1990; Saez, 1994).

Así, los diferentes tipos celulares del testículo se regulan mutuamente a través de factores difusibles que migran de un compartimiento a otro.

Entre los principales factores involucrados en la interacción celular Leydig-Sertoli podemos citar: *interleuquinas* (Okuda y col., 1994), *factores de crecimiento* (Holmes y col., 1986; Morera y col., 1988; Skinner y col., 1989; Le-Magueresse-Battistoni y col., 1994; Le-Magueresse-Battistoni y col., 1995), una sustancia simil

arginina vasopresina (Sharpe y Cooper, 1987; Foo y col., 1991), *oxitocina* (Sharpe y Cooper, 1987; Foo y col., 1991), *endotelina tipo 1* (Fantoni y col., 1993); *péptidos derivados del POMC* (Dave y col., 1985; Sharpe y Cooper, 1987) y factores liberadores de origen testicular tales como *GnRH* (Damber y col., 1985; Sharpe, 1982; Sharpe y Cooper, 1987).

Por otra parte, los macrófagos testiculares secretan *citoquinas* y *factores de crecimiento* que estimularían la proliferación y diferenciación de las células de Leydig inmaduras (Huhtaniemi y col., 1986; Teerds y col., 1989; Khan y col., 1992a, Khan y col., 1992b; Bergh y col., 1993; Hales, 1996); y sintetizan diversos compuestos capaces de inhibir la esterodogénesis gonadal (Orava, 1989; Warren y col., 1990; Sun y Risbridger, 1994; Hales, 1996; Risbridger, 1996).

Los mastocitos gonadales producen y secretan histamina y 5-HT, neurotransmisores involucrados en la regulación paracrina de la esteroidogénesis testicular (Mayerhofer y col., 1989b; Tinajero y col., 1993a).

1.5.2. Epidídimo

El sistema de conductos transportadores de espermatozoides del testículo está compuesto por los *túbulos seminíferos*, que se continúan en los *túbulos rectos*, y finalmente desembocan en la *rete testis*. Desde allí parten numerosas vías, los *conductillos eferentes*, que abandonan el testículo y convergen en un pasaje común, el **conducto del epidídimo**.

El epidídimo es un órgano elongado, muy sinuoso y sumamente enrollado que se encuentra compactado dentro de una membrana que lo envuelve.

Consta de una porción superior, la *cabeza*, que recibe todos los conductillos eferentes; se continúa en un segmento medio conocido como *cuerpo* y posteriormente en una extremidad inferior, la *cola*, que desemboca a la altura del polo testicular inferior en el *conducto deferente*. Los distintos segmentos del epidídimo presentan diferencias histológicas, bioquímicas y funcionales.

El epidídimo presenta un *tejido intersticial* integrado por fibroblastos, capilares, vasos linfáticos, macrófagos y fibras; revestido por un *epitelio cilíndrico pseudoestratificado* compuesto por dos tipos celulares: *células principales* y *células basales*. Las células principales son la expresión de las funciones absortivas del epitelio epididimario. El 99% del líquido que abandona los túbulos seminíferos es reabsorbido en los conductillos eferentes y en el segmento inicial del epidídimo rico en células principales. Estas células son muy altas en la zona de la cabeza y disminuyen su altura gradualmente hacia la cola. Sobre la superficie luminal se encuentran estereocilias inmóviles, muy largas, que aumentan la superficie de absorción. La membrana celular apical forma numerosas invaginaciones tubulares entre las estereocilias; y en el citoplasma apical, se encuentran vesículas y vacuolas. Puede observarse un aparato de Golgi supranuclear grande y un retículo endoplasmático rugoso bien desarrollado en el citoplasma basal de las células principales. Las células basales son pequeñas y redondeadas o piramidales. Se encuentran en la parte más basal del epitelio, y se desconoce su función (Robaire y Hermo, 1988).

La principal actividad del epidídimo corresponde a la síntesis y secreción, por parte de su epitelio, de productos que contribuyen a la maduración de los espermatozoides, a través de cambios en su morfología, motilidad y metabolismo.

El epidídimo es un órgano estrictamente andrógeno-dependiente. La depleción androgénica provoca una profunda atrofia, y la interrupción de la actividad secretoria epididimaria (Brooks, 1981).

1.5.3. Vesículas seminales

Las vesículas seminales se desarrollan a partir del conducto deferente y presentan fundamentalmente la misma estructura. Forman dos cuerpos que macroscópicamente se visualizan como tubos sinuosos unidos por tejido conectivo. Estas glándulas sexuales están formadas por tres túnicas: **la túnica mucosa**, **la túnica muscular** y **la túnica adventicia**.

En la parte externa de las vesículas seminales se localiza la túnica adventicia unida a masas de tejido conectivo que fijan las partes sinuosas y plegadas del tubo. La túnica muscular está formada por una capa interna circular y una externa longitudinal, siendo considerablemente mas delgada que la del conducto deferente. La túnica mucosa forma pliegues finos ramificados anastomosados, que se extienden hacia el interior de la luz. Su *lámina propia* es fina y se compone de tejido conectivo laxo; mientras que, el *epitelio* varía en aspecto, pero frecuentemente es cilíndrico pseudoestratificado, compuesto por células cilíndricas bajas y células basales redondeadas. Las células epiteliales contienen un retículo endoplasmático rugoso y un complejo de Golgi bien desarrollados, gránulos secretorios citoplasmáticos, y son estimuladas por andrógenos. Así, luego de la castración, las vesículas seminales reducen su tamaño, y el epitelio se vuelve atrófico cesando su actividad secretoria (Levey y Szego, 1955; Mariotti y Mawhinney, 1982; Setchell y col., 1994).

Las vesículas seminales fueron así denominadas por la creencia equivocada de que eran receptáculos o reservorios de esperma (Setchell y col., 1994).

Actualmente, se sabe que son glándulas cuya secreción espesa forma parte del esperma. La composición del fluido vesicular es especie-específico, pero en general contiene compuestos de bajo peso molecular (sales, fructosa utilizada por los espermatozoides como fuente de energía, prostaglandinas, y pequeñas cantidades de flavinas), y una importante cantidad y variedad de proteínas. También se ha detectado actividad de proteasas en las secreciones de vesículas seminales que conducirían a la formación de los derivados peptídicos presentes en el eyaculado (Ostrowski y col., 1982; Geneser, 1988b; Norvitch y col., 1989; Fawcett, 1991c; Setchell y col., 1994).

1.5.4. Próstata

La próstata (gr. *prostatas*, puesto delante de otro) es la glándula sexual accesoria del aparato reproductor masculino de mayor tamaño. La próstata rodea la

primer porción de la uretra, y es recorrida en su parte posterior por los dos conductos eyaculadores. Histológicamente se compone de **numerosas glándulas tubuloalveolares** que desembocan en **conductos excretores** independientes. Dichas glándulas están incluidas en un **estroma** compuesto fundamentalmente por *células musculares lisas*, separadas por *fibras de tejido conectivo*. La **cápsula** prostática, delgada pero de fuerte consistencia, presenta las mismas características que el estroma al cual se encuentra unida. Los **alvéolos**, de forma irregular, se encuentran revestidos por un epitelio seudoestratificado, presentan evaginaciones y contienen un importante número de gránulos de secreción. Un rasgo característico de los alvéolos prostáticos, es la aparición de los denominados *cuerpos amiláceos*, formados mayoritariamente por almidón. Los conductos excretores poseen un epitelio cilíndrico simple, que se transforma en epitelio de transición en la desembocadura de la uretra. El epitelio está rodeado por una membrana basal, y descansa sobre una fina *lámina propia*, rica en capilares, que se continúa con el estroma circundante.

La anatomía macroscópica permite dividir a la próstata en tres **lóbulos** diferentes (*lóbulo medio, lóbulo lateral y lóbulo posterior*), todos de forma piramidal, y situados, respectivamente, en posición anterior, lateral y posterior con relación a los ejes determinados por el curso de los conductos eyaculadores a través de la glándula. Estos lóbulos se fusionan en sus bordes a medida que progresa el desarrollo sexual, careciendo en el adulto, de límites histológicos definidos. Por esta razón, existe actualmente una tendencia a abandonar estas designaciones regionales, y distinguir en la próstata **tres zonas concéntricas** (*zona periférica, zona interna y zona central*) que rodean, en parte, la porción prostática de la uretra (Geneser, 1988b; Fawcett, 1991c; Setchell y col., 1994).

La secreción prostática, junto con la de las vesículas seminales, sirve como diluyente y vehículo para transportar a los espermatozoides durante la eyaculación. La misma contiene una gran cantidad de ácido cítrico, razón por la cual presenta un pH ligeramente ácido, y enzimas tales como la fibrinolisisina, diastasa, beta glucuronidasa y fosfatasa ácida (Geneser, 1988b; Fawcett, 1991c).

2. ENDOCRINOLOGIA REPRODUCTIVA EN EL HAMSTER

En ciertas especies de roedores, la función reproductiva es modulada a través de la información fótica. Así, el **fotoperíodo** (cantidad de horas diarias con luz) es una señal primaria que, como se ha detallado previamente, actúa vía retina, sistema nervioso central y glándula pineal, influenciando el proceso de maduración sexual, y sincronizando los ciclos reproductivos anuales durante la fase puberal-adulta.

El **hámster** es una especie con reproducción estacional, y consecuentemente la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal sufre continuas fluctuaciones entre una fase de máxima actividad, coincidente con el inicio de la estación reproductiva anual, y una etapa de quiescencia o reposo que involucra la preparación para el período de hibernación. La Fig. 6 esquematiza los cambios ocurridos en la actividad sexual y tamaño gonadal, durante el ciclo reproductivo anual del hámster.

2.1. ESPECIES

Diferentes especies de hámsteres son actualmente empleadas como "modelos experimentales" en el estudio del desarrollo sexual y el rol ejercido por el fotoperíodo en el control de la función reproductiva, las cuales presentan características anatómicas y fisiológicas distintivas. El hámster **(Syrian) Dorado (Mesocricetus auratus)** proviene de Aleppo, Siria. Las primeras citas literarias referidas al hámster Dorado fueron publicadas por Alexander Russell en *The natural History of Aleppo*, en 1756. En abril de 1839, George Robert Waterhouse, presentó en *The London Zoological Society*, una detallada descripción morfológica del mismo, definiendo al hámster Dorado como una nueva especie oriunda de Siria (Murphy, 1985). Otras especies de hámsteres ampliamente utilizadas en las investigaciones científicas son el hámster **(Siberian) Djungarian (Phodopus sungorus)**, proveniente de Siberia; y el hámster **(Chinese) (Cricetulus griseus)**, originario de China (Murphy, 1985).

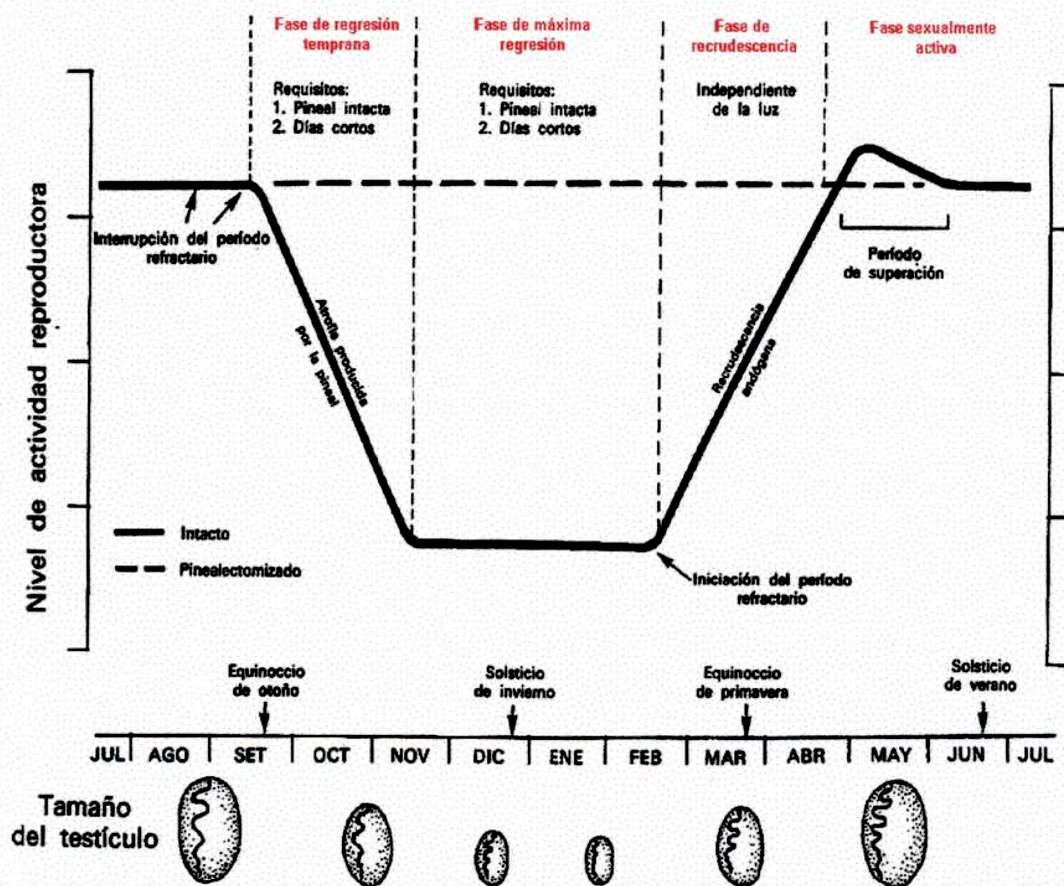


Figura 6. CICLO REPRODUCTIVO ANUAL EN EL HAMSTER

El esquema ilustra las modificaciones ocurridas en el nivel de actividad sexual y en el tamaño testicular, durante el ciclo reproductivo anual del hámster macho adulto.

2.2. DESARROLLO SEXUAL

El hámster alcanza su capacidad fertilizante entre los 45 y 60 días de edad (Bartke, 1985).

Aunque el sistema reproductivo del hámster Dorado es particularmente sensible al fotoperíodo, la adquisición de la capacidad reproductiva no es influenciada por el mismo. En cambio, en el hámster Djungarian, fotoperíodos cortos (FC) bloquean el inicio de la pubertad y la actividad sexual durante la vida adulta (Hoffmann, 1978c; Darrow y col., 1980).

El período de pubertad es precedido, tanto en la especie Dorado y como en la Djungarian, por un significativo aumento en los niveles circulantes de gonadotrofinas y PRL (Vomachka y Greenwald, 1979; Yellon y Goldman, 1984). Paralelamente, la concentración sérica de T presenta un marcado incremento a partir de los 50 días de edad (Vomachka y Greenwald, 1979; Yellon y Goldman, 1984).

Las alteraciones edad-relacionadas en los niveles plasmáticos de hormonas hipofisarias y testiculares durante el desarrollo sexual del hámster macho, difieren de los cambios descritos en otras especies de roedores. Así, en comparación con la rata, el hámster muestra un aumento más pronunciado en los niveles séricos de LH, modificaciones tempranas de la concentración de PRL, y ausencia de elevación de la T plasmática durante la fase perinatal (Steinberger y Ficher, 1969; Swerdloff y col., 1971; Negro-Vilar y col., 1973a; Döhler y Wuttke, 1975; MacKinnon y col., 1976; Corbier y col., 1978). Con respecto al ratón, el hámster exhibe un mayor y pronunciado incremento puberal de la PRL sérica, combinado con un discreto aumento de los niveles circulantes de gonadotrofinas y T. No obstante, resulta difícil hacer comparaciones válidas entre hámsteres y ratones, como consecuencia de la vasta cantidad de cepas de ratones existentes, y de las diferencias endócrinas observadas entre ellas (Sinha y col., 1974; Bartke y Dalterio, 1975; Selmanoff y col., 1977; Barkley, 1979).

Durante el proceso de maduración sexual del hámster macho, la concentración de T plasmática fluctúa entre los 0.75 ng/ml y los 6 ng/ml. Este rango de variabilidad en los niveles de T es significativamente mayor que el observado en el hombre (Judd, 1979), comparable al hallado en la rata (Bartke y col., 1973; Ellis y Desjardins, 1982), y considerablemente menor que los cambios detectados en el ratón (Bartke y col., 1973; Bartke y Dalterio, 1975). En concordancia con los resultados obtenidos en otras especies (Boccabella, 1963; Clermont y Harvey, 1967), también en el hámster, la T es el principal regulador hormonal del crecimiento y funcionalidad de los órganos reproductivos, la espermatogénesis y la conducta sexual (Lubicz-Nawrocki, 1974; Campbell y col., 1978; Ellis y Turek, 1979). Sin embargo, la capacidad de producir T es mucho menor en los testículos del hámster adulto que en las gónadas de la rata, conejo, cerdo y perro (Ewing y col., 1979). Esta característica podría resultar de la menor cantidad de retículo endoplasmático liso, organela que contiene la mayor parte de las enzimas esteroidogénicas, que presentan las células de Leydig del hámster (Zirkin y col., 1980).

La T es metabolizada en estructuras neuroendócrinas periféricas sensibles a andrógenos, mediante $5\alpha/\beta$ -reducción y aromatización. En especies fotoperiódicas, existe una importante actividad 5β -reductasa obteniéndose metabolitos de función desconocida. Sin embargo, no puede descartarse la probabilidad de que estos compuestos 5β -reducidos participen en el control de algunas conductas sexuales y socio-sexuales (Martini, 1982).

En el caso particular del hámster Dorado estudios metabólicos indican que, en testículos inmaduros, la mayor parte de los esteroides formados a partir de la T y androstenediona son compuestos $5\alpha/5\beta$ -reducidos, principalmente, 5β -Diol. La 5β -reducción de los 4-ene-3-cetoesteroides tendría lugar en las células de Sertoli bajo la influencia de FSH, mientras que la 5α -reducción ocurriría en las células intersticiales regulada por LH y FSH (Yabumoto y col., 1985). En cambio, en testículos de hámsteres adultos existe escasa actividad de ambas reductasas y

consecuentemente, significativos niveles de T (Terada y col., 1980; Tsuji y col., 1984).

2.3. CAMBIOS ESTACIONALES

2.2.1. Regresión reproductiva foto-inducida

Tanto en el hámster Dorado como en la especie Djungarian, la actividad reproductiva en animales púberes y adultos, es regulada por la información fótica (Hoffmann, 1978a; Darrow y col., 1980; Bartke, 1985).

En su hábitat natural, el hámster es activo sexualmente durante la primavera; experimentando hacia comienzos del otoño, una profunda involución gonadal (Mogler, 1958; Czyba y col., 1971; Vendrely y col., 1971; Reiter, 1974). Sin embargo, cuando los animales son mantenidos en cautiverio con iluminación artificial de 14 hs diarias, la actividad reproductiva se extiende a todo el año, permanenciando sus niveles séricos de gonadotrofinas, PRL y T prácticamente sin cambios durante la vida adulta (Bartke, 1985).

La exposición de hámsteres adultos a oscuridad total o a fotoperíodos menores de 12.5 hs de luz/día, origina importantes modificaciones en la unidad hipotálamo-hipofisaria que desencadenan una drástica **regresión testicular** (Turek y col., 1975b; Matt y Stetson, 1979; Bartke, 1985). La extirpación quirúrgica de la glándula pineal evita dicha involución reproductiva; mientras que, la administración de melatonina en animales pinealectomizados mimetiza la respuesta a fotoperíodos restrictivos (Reiter y col., 1970; Reiter, 1980). La permanencia en FC durante dos a tres meses induce un significativo descenso en los niveles circulantes de LH, FSH y PRL, junto a una disminución en el contenido testicular de los receptores de LH (Bex y Bartke, 1977), FSH (Klemcke y col., 1987) y PRL (Bartke y col., 1987). La regresión testicular puede ser completamente evitada si, durante la exposición a FC, los animales son tratados con combinaciones de PRL y GnRH, o bien implantados con fragmentos hipofisarios bajo la cápsula renal, un procedimiento

que eleva crónicamente los niveles periféricos de PRL (Chen y Reiter, 1980; Bartke y col., 1980a; Bartke y col., 1983). Sin embargo, la administración de LH y FSH en animales involucionados restablece sólo parcialmente la función testicular (Reiter y col., 1975; Bex y Bartke, 1977). Estos resultados sugieren que la habilidad de las gónadas para responder a las gonadotrofinas es afectada durante la fase de regresión; y enfatiza la importancia de la PRL como mediadora entre la señal inhibitoria ambiental y la actividad gonadal.

Como consecuencia de este hipogonadismo hipogonadotrófico, se detecta una caída en la producción testicular de andrógenos (Chandrashekar y Bartke, 1989), y la supresión total de la espermatogénesis (Desjardins y col., 1971; Gravis y Weaker, 1977).

La involución reproductiva foto-relacionada, origina marcados cambios morfológicos en los diferentes compartimientos testiculares (Gravis y col., 1977; Sinha Hikim y col., 1988a) (Fig. 7, panel c). Estas alteraciones incluyen una notoria reducción del peso testicular (Reiter, 1980), resultante de la disminución del área intersticial y del volúmen tubular (Sinha Hikim y col., 1988a). Los túbulos seminíferos sufren un significativo descenso en el contenido de células germinales presentando sólomente espermatogonias y espermatoцитos primarios (Sinha Hikim y col., 1988b). En cambio, el número de células de Sertoli permanece estable (Sinha Hikim y col., 1989a), y la cantidad de células de Leydig fluctúa sólo levemente durante la exposición a FC (Sinha Hikim y col., 1989b). No obstante, estas poblaciones celulares manifiestan notorios cambios morfométricos durante la permanencia en fotorestricción. La regresión testicular foto-inducida se asocia con una drástica disminución en el área superficial y el volúmen de las células de Sertoli y de sus principales organelas. Sólomente sus componentes estructurales involucrados en procesos degradativos (lisosomas y vacuolas digestivas) no presentan alteraciones volumétricas entre hámsteres gonadalmente activos e inactivos (Sinha Hikim y col., 1989a). Comparativamente, las células de Leydig provenientes de hámsteres involucionados manifiestan un significativo descenso de tamaño, relacionado con un menor volúmen de sus estructuras subcelulares

(nucleolo, mitocondrias, peroxisomas, vesículas, aparato de Golgi y retículos endoplasmáticos) (Sinha Hikim y col., 1989b); que explicaría, en parte, la severa supresión de la esteroidogénesis en hámsteres expuestos a FC. Dicha deficiencia androgénica es responsable de la atrofia observada en las glándulas sexuales accesorias (Desjardins y col., 1971; Chan y Ng, 1994) y pérdida de la libido (Morin y col., 1977).

2.2.2. Recrudescencia testicular espontánea y foto-estimulada

La transferencia de hámsteres regresionados a fotoperíodo normal (14 hs diarias de luz; FN), incrementa los niveles séricos de gonadotrofinas y PRL, restablece el peso testicular, y restaura las funciones endócrinas y gametogénicas (Berndtson y Desjardins, 1974; Matt y Stetson, 1979). A este proceso de reactivación reproductiva resultante del pasaje de animales involucionados a fotoperíodos estimulatorios se lo denomina **recrudescencia foto-estimulada**.

Alternativamente, en hámsteres expuestos a FC se observa que, si las condiciones de escasa luminosidad persisten, luego de un cierto tiempo, la actividad hipotalámica-hipofisaria-testicular es restablecida espontáneamente. Este evento de recuperación gonadal como consecuencia de la permanencia prolongada en fotoperíodo restrictivo es conocido como **recrudescencia espontánea**. Así, la regresión reproductiva originada por una disminución en la longitud de los días, es seguida por un período de insensibilidad que involucra la aparición de mecanismos refractarios que tornan al animal incapaz de responder al fotoperíodo inhibitorio (Watson-Whitmyre y Stetson, 1988). Este fenómeno señalaría que, en hámsteres salvajes, la restauración de la actividad sexual durante la primavera, ocurriría en respuesta a relojes internos independientemente del aumento en las horas diarias de luminosidad (Bartke, 1985). En tal sentido, Lerchl y Nieschlag (1992) han demostrado que, en la fase de recrudescencia espontánea se observa un cambio en el patrón de secreción de la melatonina pineal. Así, el hámster Djungarian presenta dos pulsos de liberación de melatonina durante la etapa oscura, en lugar

del perfil tipo C característico del período de regresión (con un prolongado pico secretorio que abarca todo el período de oscuridad). Comparativamente, el hámster Dorado experimenta, durante la reactivación espontánea, un avance de fase en la secreción nocturna de melatonina (Lerchl y Nieschlag, 1992).

La recrudescencia reproductiva espontánea involucra una temprana restauración en los niveles periféricos de FSH (Matt y Stetson, 1979; Turek y col., 1975a), y una posterior elevación en la concentración sérica de LH y PRL hacia las 18 semanas de permanencia en FC (Matt y Stetson, 1979; Klemcke y col., 1981). Simultáneamente, a los cambios ocurridos en los niveles hormonales periféricos, se ha detectado un significativo aumento del tamaño testicular asociado a fenómenos de neovascularización (Mayerhofer y col., 1989a), un incremento en el número de receptores testiculares de FSH y LH (Klemcke y col., 1981; Klemcke y col., 1987), una mayor producción gonadal de T (Klemcke y col., 1981), y el restablecimiento de los ciclos espermatogénicos (Heindel, 1988; Milette y col., 1988). Estos resultados se correlacionan con la recuperación del tamaño de las células de Sertoli y Leydig, y del volumen de sus organelas; aunque el número total de células nodrizas y espermatogénicas no varía durante la fase de recrudescencia (Bartke, 1985; Sinha Hikim y col., 1993) (Fig. 7, panel b). Adicionalmente, la elevación de la concentración plasmática de T en esta etapa, gatilla la restauración del peso y funcionalidad de las glándulas sexuales accesorias andrógeno-dependientes (Desjardins y col., 1971).

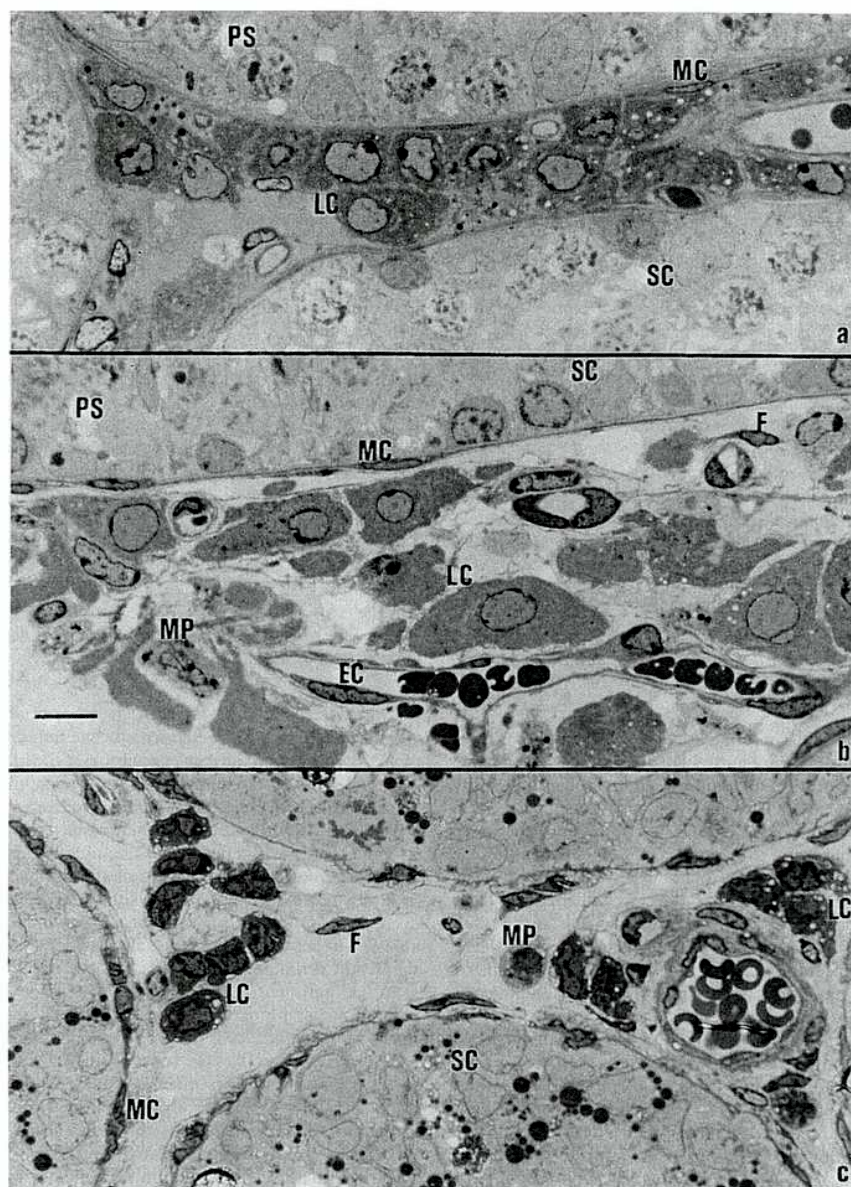


Figura 7. CORTES HISTOLOGICOS EN TESTICULO DEL HAMSTER.

La figura muestra el intersticio y túbulo seminífero en:

a: testículos activos (hámsteres adultos en fotoperiodo normal); b: testículos en recrudescencia y c: testículos regresionados (hámsteres adultos en fotoperiodo corto).

LC: células de Leydig; MC: células mioideas; EC: células endoteliales; F: fibroblastos; MP: macrófagos; SC: células de Sertoli; PS: espermatozoides. Longitud de la barra: 10µm. Extraído de Johnson y col. (1987).

3. POLIAMINAS

3.1. ESTRUCTURA Y FUNCION

Las **poliaminas** (PA) son compuestos alifáticos, nitrogenados, no proteicos y de bajo peso molecular presentes tanto en células eucariontes como procariontes (Heby, 1981; Scalabrino y Ferioli, 1982). Las PA más abundantes en los mamíferos son: *putrescina* (*Put*), *espermidina* (*Esd*) y *espermina* (*Esp*) (Fig. 8).

La distribución de estas poliaminas difiere marcadamente entre los distintos tejidos de un organismo. Asimismo, diversos informes bibliográficos citan alteraciones especie-específicas en la concentración tisular de PA. Además, los niveles de PA son modificados en respuesta a una variedad de factores ambientales y situaciones fisiológicas tales como la edad y el estado hormonal del animal (Heby, 1981; Scalabrino y Ferioli, 1981; Pegg y McCaan, 1982).

El crecimiento, duplicación y diferenciación de células eucariotas requiere la presencia y biosíntesis de PA (Tabor y Tabor, 1984; Scalabrino y col., 1991). Sin embargo, se han observado también altas concentraciones de PA en tejidos que no están en crecimiento, pero que son activos en síntesis proteica, como es el caso del páncreas, próstata y glándula mamaria (Oka y col., 1981; Dorn y col., 1985).

Recientemente se ha propuesto que las PA podrían participar como mensajeros químicos de diversas hormonas actuando a modo de señales endócrinas, parácrinas y/o autócrinas, entre las diferentes poblaciones celulares (Scalabrino y col., 1991).

Puesto que, los grupos amino primarios y secundarios de las PA están positivamente cargados a pH fisiológico, estos compuestos orgánicos pueden interactuar con constituyentes celulares de carga negativa, tales como ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos (Marton y Morris, 1987; Schuber, 1989) controlando importantes aspectos del metabolismo celular (Tabor y Tabor, 1984; Scalabrino y col., 1991). Así, las PA modulan la actividad de topoisomerasas y ADN/ácido ribonucleico (ARN) polimerasas, estabilizan la asociación de las

subunidades ribosomales, promueven la unión de los ribosomas al retículo endoplásmico (Raina y Jänne, 1975), protegen a las membranas de posibles lisis, facilitan la fusión de membranas, controlan sistemas de transporte involucrados en la movilización de compuestos entre el medio extracelular y el citoplasma (Goyns, 1982; Marton y Morris, 1987; Schuber, 1989), y regulan específicamente la estructura y función mitocondrial (Nichitta y Williamson, 1984; Thomas y col., 1986; Marcote y col., 1989). Además, las PA participan también en el control del contenido celular de nucleótidos cíclicos y pueden modular eventos de fosforilación/desfosforilación proteica a través de la activación de quinasas y/o mediante modificación del sustrato (Cochet y Chambaz, 1983; Cohen, 1985).

Por otra parte, los derivados acetilados de las PA: *mono-N-acetilputrescina* (*A-put*), *N¹-acetilpermidina* (*N¹A-esd*), *N⁸-acetilpermidina* (*N⁸A-esd*), y *N¹-acetilpermina* (*N¹A-esp*) (Fig. 8), contribuirían en el mantenimiento homeostático del pool intracelular de PA, evitando el aumento descontrolado de la concentración tisular de estos policationes, que provoca serios daños celulares resultantes de la interacción de los mismos con sitios aniónicos presentes en macromoléculas y estructuras sub-celulares (Casero y Pegg, 1993; Kramer y col., 1993).

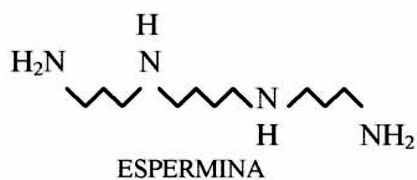
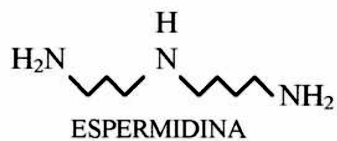
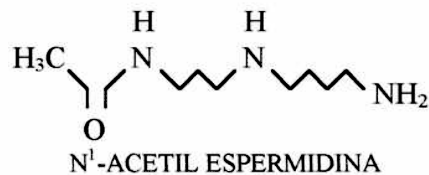
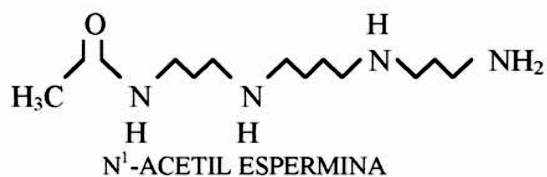
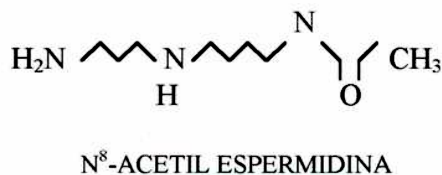
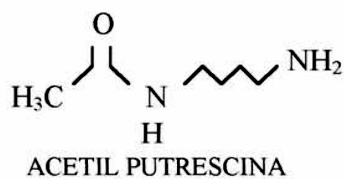
POLIAMINAS**METABOLITOS INTERMEDIARIOS**

Figura 8: ESTRUCTURA DE LAS PRINCIPALES POLIAMINAS.

3.2. BIOSINTESIS Y CATABOLISMO

La biosíntesis de PA en células eucariontes involucra una serie de precursores tales como arginina, ornitina y S-adenosilmetionina (Fig. 9). La ornitina es obtenida principalmente durante el ciclo de la urea por acción de la enzima arginasa que utiliza al aminoácido arginina como precursor. Posteriormente, la ornitina es convertida a Put en una reacción catalizada por la *enzima ornitina decarboxilasa* (ODC; EC 4.1.1.17) (Tabor y Tabor, 1976; Williams-Ashman y Canellakis, 1979). Durante la formación de Esd a partir de Put a través de la actividad *Esd sintetasa*, y en la síntesis de Esp catalizada por la enzima *Esp sintetasa* que emplea como sustrato a la Esd, la S-adenosilmetionina es decarboxilada por la enzima *S-adenosilmetionina decarboxilasa* (SamDC; EC 4.1.1.50) sirviendo así como donante de grupos propilaminos (Pegg y McCann, 1982). Así, ambas sintetetasas son en realidad aminopropiltransferasas, que catalizan reacciones irreversibles en las cuales se genera el compuesto *5'-metil-tioadenosina (MTA)* que es rápidamente degradado en las células.

La Put, Esd y Esp pueden sufrir reacciones de acetilación, oxidación y conjugación originando diferentes metabolitos.

Las reacciones de interconversión entre las PA y sus derivados acetilados, están catalizadas por dos enzimas: la *acetil-CoA Esd/Esp N¹-acetiltransferasa (AT)*, y la *PA oxidasa (PAO)* dependiente de flavina (Morgan, 1985; Morgan, 1989). La primera de estas enzimas posee localización citoplasmática y emplea acetil-CoA para convertir la Esd y Esp, en N¹A-esd y N¹A-esp, respectivamente. Posteriormente, ambos compuestos acetilados son sustratos de la PAO (Seiler, 1987; Seiler y Heby, 1988), generándose Esd y Put. En condiciones normales, la PAO posee mayor actividad que la AT citosólica, razón por la cual el contenido de acetil-poliaminas (A-PA) es generalmente bajo en las células eucariontes. La Put y Esd pueden ser alternativamente acetiladas por una AT nuclear originando A-put y N⁸A-esd; mientras que, la Esp al ser una molécula simétrica, es incapaz de generar derivados N⁸-acetilados. La deacilación de la A-put y la N⁸A-esd regenera

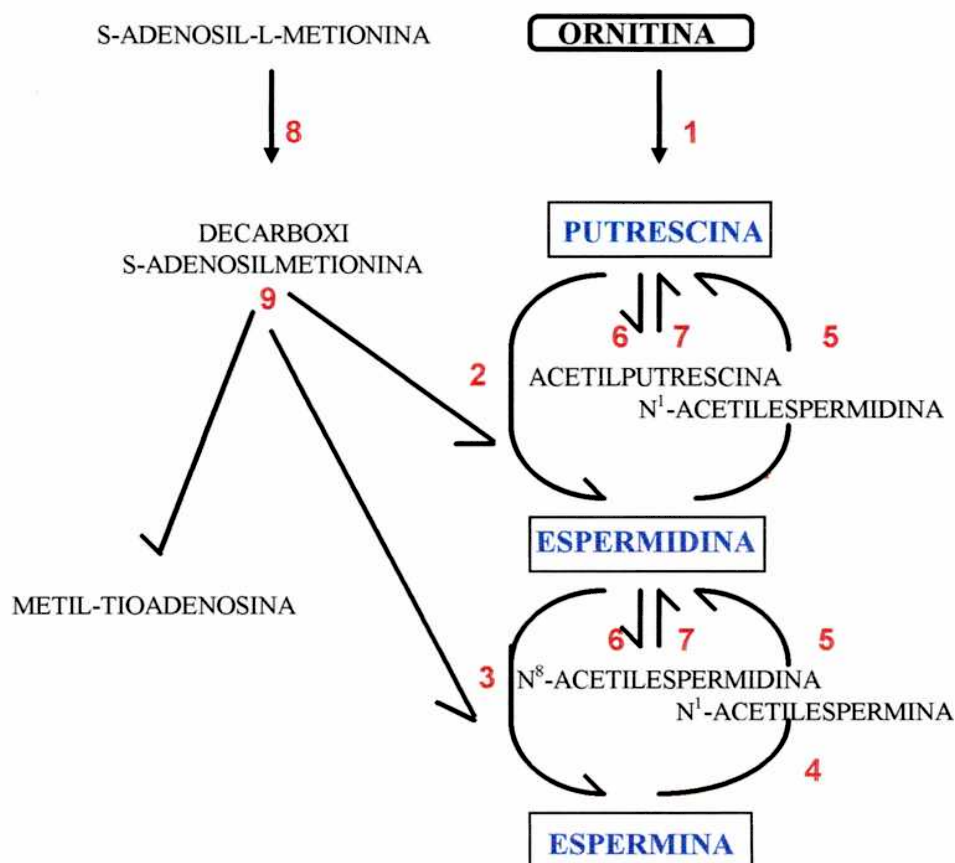


Figura 9. BIOSINTESIS DE POLIAMINAS

1: ornitina decarboxilasa; 2: espermidina sintetasa; 3: espermina sintetasa; 4: poliamina acetilasa; 5: poliamina oxidasa; 6: espermidina/espermina N⁸-acetil transferasa; 7: N⁸-acetil espermidina/espermina desacetilasa; 8: S-adenosil metionina decarboxilasa; 9: aminopropiltransferasa.

Put y Esd. Así, el sistema AT/oxidasa regula los niveles intracelulares de PA, evitando el aumento descontrolado del contenido tisular de Esd y Esp, potencialmente tóxico para las células.

La función de las PA se halla estrechamente relacionada con su naturaleza iónica. Como la acetilación de las PA resulta en la disminución de su carga neta, fue inicialmente propuesto que este proceso conduciría a la pérdida de la actividad biológica de estas policationes. Sin embargo, Canellakis y col (1989), han establecido claras evidencias de que ciertos efectos de las PA son expresados a través de sus formas acetiladas.

Cada intermediario del ciclo de interconversión, puede ser sustrato de MAOs (EC 1.4.3.4) y/o diamino oxidasas (DAOs; EC 1.4.3.6) dependientes de Cu^{+2} . Los aldehídos producidos en las reacciones catalizadas por estas oxidasas no pueden ser reconvertidos en PA, y en consecuencia son oxidados, a nivel sérico, en sus correspondientes ácidos, contribuyendo a la aparición, en sangre y orina, de una serie de metabolitos tales como carboxietilpoliaminas, ácido espérmico, putreanina, β -alanina y ácido γ -aminobutírico (GABA) (Seiler y col., 1981). El conjunto de estas reacciones constituyen el denominado *catabolismo terminal de las PA*. En el caso particular de la Put, su oxidación por una DAO origina γ -aminobutiraldehído. En la mitocondria, este compuesto es sustrato de una aldehído deshidrogenasa que forma GABA. En aquellos compartimientos que carecen de esta enzima, como por ejemplo la circulación general, el γ -aminobutiraldehído es transformado en productos de excreción urinaria, probablemente a través de reacciones no enzimáticas. Como se mencionara anteriormente, la Put puede ser también acetilada generándose A-put. Este derivado acetilado puede ser excretado, o actuar como sustrato de las enzimas MAO, aldehído deshidrogenasa y A-PA deacetilasa originando GABA (Seiler y Eichentopf, 1975) (Fig. 10).

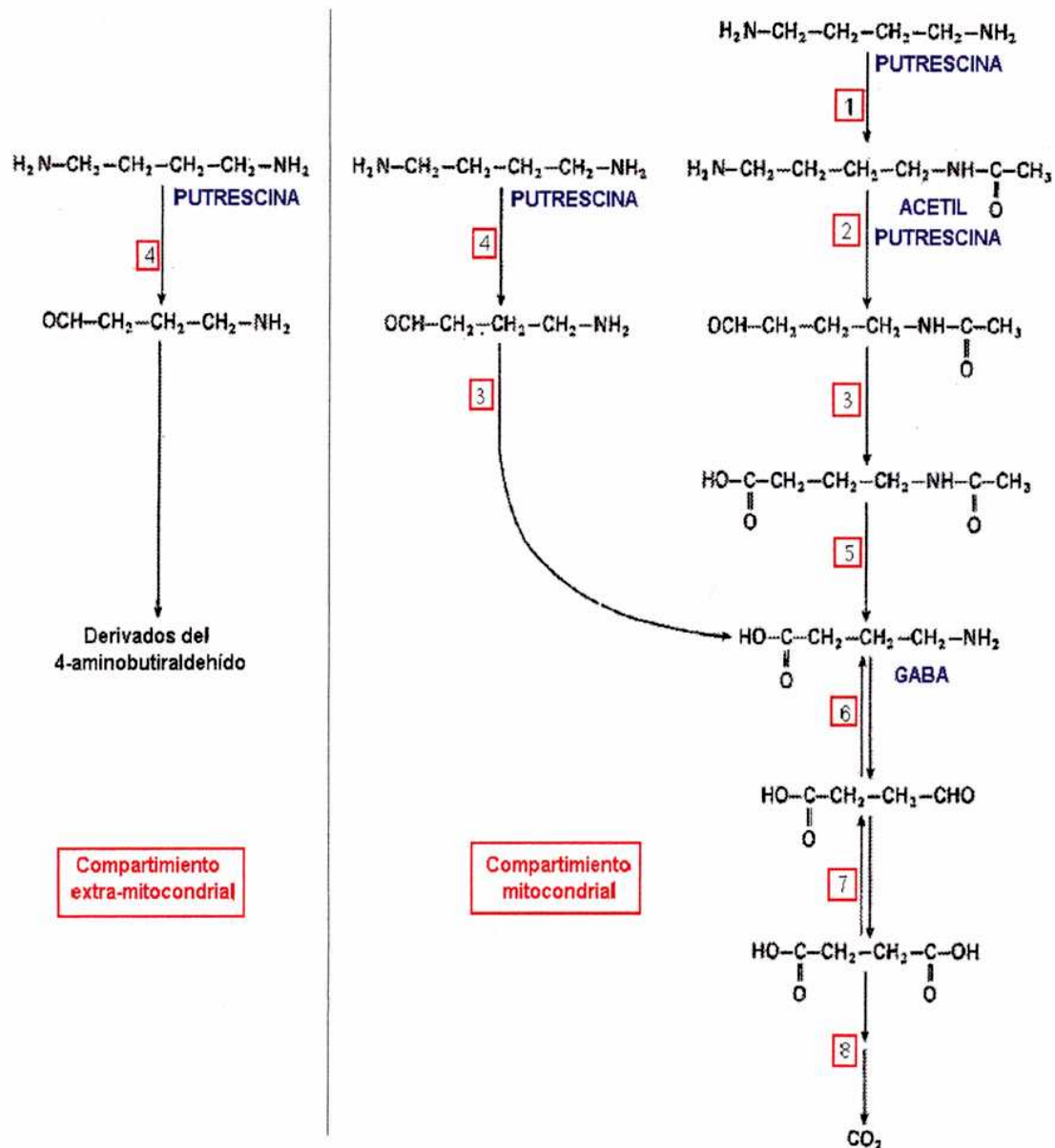


Figura 10. METABOLISMO DE LA PUTRESCINA

1: acetil CoA-1,4 diaminobutano N-acetiltransferasa; 2: monoamino oxidasa; 3: aldehído deshidrogenasa; 4: diamino oxidasa; 5: deacetilación; 6: 4-aminobutirato aminotransferasa; 7: succínico semialdehído deshidrogenasa; 8: ciclo del citrato.

3.2.1. Regulación del metabolismo de las Poliaminas

La biosíntesis de PA es mayoritariamente controlada a través de la modulación de las actividades de las dos carboxilasas, ODC y SamDC, y la AT; mientras que, las otras enzimas (sintetasas y PAO) parecen ser reguladas fundamentalmente por la disponibilidad de sustrato.

La AT se halla presente en las células en bajas concentraciones. Esta enzima es negativamente regulada por la MTA e inducida por agentes tóxicos, ésteres de forbol, hormonas, factores de crecimiento (Pegg, 1988) y PA (Seiler y Heby, 1988). De esta forma, se sugirió que la inducción de la AT representaría un mecanismo de eliminación de PA, una vez excedido cierto umbral de concentración. La AT posee una vida media corta (15 a 45 minutos) modulada por la acumulación de su ARNm, la traducción del mismo y la velocidad de recambio de la proteína (Casero y Pegg, 1993).

La SamDC es regulada a nivel transcripcional y traduccional. La vida media de esta enzima es de aproximadamente 1 hora (Calandra y col., 1996). En células eucariotes, la actividad SamDC depende de la presencia de Put (Pegg, 1974); mientras que Esd y Esp, reducen los niveles de su ARNm (Hölttä y Pohjanpelto, 1986).

La actividad ODC se encuentra regulada *in vivo* e *in vitro*, por una variedad de factores y hormonas. Entre ellos pueden citarse la LH, FSH, nucleótidos cíclicos (Reddy y Vिलее, 1975; Scalabrino y col., 1991), prostaglandinas (Madhubala y Reddy, 1980), catecolaminas (Madhubala y Reddy, 1981), EGF (Stastny y Cohen, 1972), TGF (Nakhla y Tam, 1985) y el sistema arginina vasopresina (Reddy y col., 1986). A su vez, aminos primarias, análogos de sustrato, drogas farmacológicas y las propias PA, son capaces de controlar la transcripción, estabilidad del ARNm, traducción, eventos de modificación post-traduccional y/o la degradación de la enzima ODC (Bey y col., 1987; Kameji y col., 1993). En la mayoría de los tejidos de mamíferos, la actividad basal de la ODC es la más baja de las involucradas en la biosíntesis de PA (Calandra y col., 1996), y por consiguiente, puede ser

considerada la enzima clave en el control de la velocidad global de esta vía metabólica. En cultivos celulares, la inducción de la actividad ODC y la acumulación de Put, se inician en la fase G1 del ciclo celular; y serían un prerequisite indispensable para la posterior duplicación del ADN y división celular (Sunkara y col., 1981). La ODC presenta una vida media de 10 a 20 minutos (Raina y Jänne, 1975), siendo la enzima de mayor velocidad de recambio entre las conocidas (Tabor y Tabor, 1984). Su degradación se encuentra asociada a la aparición de una proteína de peso molecular de 22 KDa conocida como *antienzima* (Heller y col., 1976). La síntesis de esta proteína es inducida por PA. Esta antienzima es sensible a ciclohexamida pero no a actinomicina D, indicando que su regulación se efectúa a nivel post-transcripcional (Mitchell y col., 1985). La antienzima forma, con alta afinidad, complejos reversibles e inactivos con la ODC (Murakami y col., 1985), los cuales disminuyen los niveles de enzima libre y aceleran la degradación de la misma (Murakami y Hayashi, 1985). A su vez, la acción de la proteína inhibidora es modulada por otra proteína, una *anti-antienzima*, que no modifica la actividad ODC, pero presenta una alta afinidad por la antienzima, razón por la cual es capaz de liberar a la ODC de su forma complejada inactiva (Calandra y col., 1996).

Así, el pool intracelular de PA se encuentra regulado por un balance entre su biosíntesis, su interconversión a derivados acetilados y su excreción. Por otra parte, la presencia en membrana plasmática de transportadores específicos, permite la incorporación de poliaminas desde el medio extracelular. Un aumento en la velocidad de crecimiento celular es usualmente acompañado por un incremento en el transporte transmembrana de PA exógenas. Asimismo, factores tróficos tales como hormonas y factores de crecimiento, estimulan la incorporación de PA (Seiler y Dezeure, 1989).

3.3. POLIAMINAS EN ORGANOS REPRODUCTIVOS

3.3.1. Testículo

Estudios previos indican que, las gonadotrofinas son capaces de modular la actividad ODC y SamDC testicular (Francis y col., 1981; Pegg y McCann, 1982; Osterman y col., 1983; Madhubala y col., 1987; Swift y Dias, 1987; Shubada y Tsai, 1990). Francis y col. (1981), detectaron un efecto estimulador de FSH sobre la actividad ODC en células de Sertoli bovinas. Sin embargo, en células de Sertoli de rata, FSH inhibe la actividad enzimática (Madhubala y col., 1987). Esta hormona hipofisaria, regula diferencialmente las actividades ODC y SamDC en células de Sertoli provenientes de ratas de 18 días de edad (Pegg y McCann, 1982). Por otra parte, LH es un potente estimulador de la actividad ODC en células de Leydig (Osterman y col., 1983) y en testículos de ratas intactas o hipofisectomizadas (de las Heras y Calandra, 1992). Asimismo, se ha descrito un efecto estimulador de la PRL sobre la actividad ODC en diferentes sistemas biológicos. En este contexto, nuestro Laboratorio ha señalado previamente, un rol regulatorio ejercido por la PRL hipofisaria sobre la actividad ODC en células intersticiales de ratas puberales (de las Heras y Calandra, 1992).

La mayor proporción de la actividad ODC testicular queda circunscripta al epitelio seminífero donde es regulada por FSH (Madhubala y col., 1987; Shubada y Tsai, 1990). Sin embargo, un remanente de la actividad enzimática puede ser también localizado en el compartimento intersticial y modulado por LH (Madhubala y Reddy, 1983) y PRL (de las Heras y Calandra, 1992).

Por otra parte, se ha propuesto que las PA podrían interferir en la interacción de FSH con sus receptores testiculares específicos. Dias y col. (1983) detectaron un efecto directo de las PA sobre la unión de FSH a las células de Sertoli, asociado al peso molecular y número de grupos aminos presentes en estas poliproteínas. De esta manera, los cambios citoplasmáticos de los niveles de PA podrían modular la funcionalidad de las células de Sertoli, alterando la interacción FSH-receptor.

Además, las PA son sustratos fisiológicos de transglutaminasas intra y extracelulares, enzimas responsables del entrecruzamiento de proteínas estructurales de la membrana, y miembros activos en la internalización del complejo hormona-receptor (Folk y col., 1980; Williams-Ashman y Canellakis, 1980; Lorand y Conrad, 1984).

Weiner y col. (1990), han descripto, en cultivos primarios de células de Sertoli de rata, que la T es también capaz de regular la actividad ODC, disminuyendo los niveles del ARNm de la enzima.

Es interesante destacar que se han establecido ritmos circadianos en la actividad de las decarboxilasas y en los niveles gonadales de PA. Al respecto, de las Heras y Calandra (1986), determinaron que, la actividad ODC en testículos prepuberales de rata fluctúa durante las 24hs diarias. Recientemente, se ha descripto un ciclo diario en el contenido testicular de Put, alcanzándose los máximos niveles hacia las 6hs; mientras que, la Esd y la Esp no experimentan modificaciones circadianas detectables (Sabry y Matsuzaki, 1991).

La concentración testicular de PA totales varía con la edad (Shubada y col., 1989b). Los niveles gonadales de Put son máximos a los 13 días de edad; mientras que, las concentraciones de Esd y Esp son elevadas en ratas de 31 a 35 días. Asimismo, en células de Sertoli, la enzima ODC presenta su máxima actividad a los 13 días, coincidentemente con la división mitótica de estas células; y decrece luego con la edad hasta alcanzar un nadir a los 40 días. En células germinales e intersticiales de rata, la actividad enzimática incrementa paralelamente con la edad hasta los 22 días, momento en el cual ocurre la primera división meiótica de los espermatocitos, y después declina. La actividad SamDC en testículo total, células de Sertoli, germinales e intersticiales presenta un marcado aumento a los 20 días de edad (Shubhada y col., 1989a). Así, la elevada actividad ODC en células de Sertoli y germinales estaría asociada a eventos de proliferación celular ocurridos en etapas tempranas del desarrollo puberal; mientras que, el aumento de la actividad SamDC se relacionaría con la maduración de las células de Sertoli y la meiosis de las células germinales (Calandra y col., 1996).

Alcivar y col. (1989), y Hakovirta y col. (1993), han estudiado el efecto de las PA sobre la síntesis de ADN, la condensación meiótica de la cromatina, la morfología y el número de células espermatogénicas a lo largo del ciclo del epitelio seminífero. Estos estudios sugieren que las PA estimularían la síntesis de ADN principalmente en el estadio de espermatogonia tardía. Por otra parte, se ha observado un aumento en el ARNm de ODC, en poblaciones enriquecidas en espermatoцитos, en el estadio paquitene, y en espermátides redondas (Alcivar y col; 1989). Asimismo, Kaipia y col (1990), han detectado una alta expresión de esta enzima en espermatoцитos paquiténicos en estadios VII-X , y diploténicos en el estadio XI.

3.3.2. Epidídimo y glándulas sexuales accesorias

Los andrógenos son los principales reguladores de la función epididimaria (Brooks, 1981). En tal contexto, nuestro Laboratorio ha demostrado originalmente que la actividad ODC epididimaria es marcadamente andrógeno-dependiente (de las Heras y Calandra, 1987), y que la síntesis de PA en el epidídimo de rata requiere un entorno androgénico (de las Heras y col., 1992). El tratamiento de ratas prepuberales con diferentes antiandrógenos selectivos, provoca una disminución significativa en los niveles de PA y en el peso del epidídimo (Rulli y col., 1995). En cambio, la actividad SamDC epididimaria es relativamente insensible a los esteroides gonadales, pudiendo coexistir en el epidídimo, fracciones con distinto grado de dependencia androgénica (de las Heras y Calandra, 1991). Mientras que la enzima ODC se encuentra localizada preferencialmente en las células principales del epitelio epididimario, que presentan un alto número de receptores androgénicos; la actividad SamDC ha sido también descrita en otros tipos celulares hormonalmente menos comprometidos.

Aunque se ha detectado una importante actividad biosintética, una fracción significativa de las PA presentes en el epidídimo podría tener un origen gonadal, y

llegar a este órgano conjuntamente con otros compuestos y fluidos secretados por el testículo.

La concentración de PA epididimarias en la rata, presenta alteraciones a lo largo de la ontogenia. La enzima ODC alcanza su máxima actividad a los 25 días de edad, y luego declina permaneciendo constante entre los 45 y 60 días. En epidídimos de ratas adultas, la PA en mayor concentración es la Esd, seguida por la Esp, y en menor grado la Put (de las Heras y Calandra, 1987; de las Heras y col., 1992).

Las vesículas seminales, como se ha detallado previamente, son órganos andrógeno-dependientes. Esta glándula que contiene moderadas concentraciones de PA, y presenta una discreta actividad de las enzimas ODC y SamDC, no realiza una activa secreción de estas poliproteínas (Piik y col. 1977). Se ha postulado que, en las vesículas seminales, las PA controlarían eventos proliferativos, particularmente durante el crecimiento tisular inducido por andrógenos (Calandra y col., 1996).

Paralelamente a los andrógenos, la PRL es también requerida para el mantenimiento estructural y funcional de las vesículas seminales (Ayata y col., 1989). Datos de nuestro Laboratorio demuestran que, en ratones adultos deficientes genéticamente en PRL y en ratas portadoras de un tumor secretante de esta hormona, la hiperprolactinemia aumenta significativamente la actividad ODC en comparación con el grupo control (Gonzalez y col., 1991; Gonzalez y col., 1994). En consecuencia, esta hormona hipofisaria jugaría un importante rol en el control del pool tisular de PA en las vesículas seminales, modulando consecuentemente, el crecimiento y la diferenciación glandular.

La próstata produce y secreta importantes cantidades de PA (Pegg y Williams-Ashman, 1968) que participarían en el control del crecimiento tisular (Russell y Durie, 1978). La ODC, SamDC (Jänne y Williams-Ashman, 1971; Pegg y Williams-Ashman, 1968) y las diferentes sintetasas (Jänne y col., 1971), han sido

caracterizadas en este tejido. Las PA son elaboradas mayoritariamente en las células epiteliales de la próstata, las cuales exhiben un importante grado de andrógeno-dependencia (Blackshear y col., 1989).

La principal PA encontrada en todos los lóbulos de la próstata es la Esp, mientras que la Esp y la Put presentan concentraciones tisulares menores (Fjösne y col., 1990). En la rata, el lóbulo ventral de la próstata produce y secreta PA al fluido seminal (Mann, 1964); mientras que, bajos niveles de estas policiones fueron detectados en los lóbulos dorsal y lateral. Asimismo, se ha establecido una distribución compartamental de las actividades ODC y SamDC en la próstata, que se correlaciona con las diferencias morfológicas y funcionales descriptas entre los distintos lóbulos (Price, 1963; Lundmo y col., 1985). La actividad ODC es mayor en la próstata ventral, mientras que la actividad SamDC predomina en el lóbulo dorsal (Fjösne y col., 1988).

Los distintos lóbulos de la próstata responden diferencialmente a la acción de PRL (Prins, 1989). En particular, Rui y Purvis (1987) han indicado que la PRL ejerce una activación selectiva en la actividad ODC del lóbulo lateral.

En el plasma seminal humano y de rata se detectan niveles de Esp (Mann, 1974) estadísticamente superiores a los descriptos en otros tejidos y fluidos del organismo. La principal fuente de PA del líquido seminal es la próstata. El rol fisiológico de las PA en el semen es aún incierto. Mientras que algunos estudios describen ausencia de efectos significativos de las PA sobre la viabilidad y motilidad de los espermatozoides (Mendez, 1989), otros establecen una correlación entre los niveles de Esp y la cantidad de gametas presentes en el semen (Fair y col., 1972), o la motilidad de las mismas (White, 1954).

Hölttä y col (1975) y Mendez (1989), describieron que, las PA seminales son oxidadas generando mono- y di-aldehídos que serían tóxicos para los espermatozoides e interferirían en la utilización de la fructosa como fuente energética en estas células (Pulkkinen y col., 1975). Por otra parte, se ha descripto la presencia de una proteína transportadora de Esp en la membrana de los

espermatozoides, y se postuló que, la unión de esta amina a la superficie celular protegería a las gametas contra la acción de productos citotóxicos (Rubinstein y Breitbart, 1990).

4. NEUROENDOCRINOLOGIA Y REPRODUCCION

4.1. ORGANIZACION DEL SISTEMA NERVIOSO

4.1.1. Sistema nervioso central

4.1.1.1. Ontogenia y ciclo reproductivo anual

Tanto la organización neuroendócrina básica del hipotálamo como el desarrollo del sistema neurosecretorio han sido detalladamente descritos por Coggeshall (1964), Crosby y Showers (1969), Christ (1969), Knigge y Silverman (1974) y Altman y Bayer (1978).

La hipótesis de un control inhibitorio del desarrollo sexual ejercido por ciertas áreas del cerebro, fue inicialmente postulada en trabajos de Donovan y van der Werff ten Bosch (1965). Lesiones realizadas tanto en el hipotálamo anterior (Gellert y Ganong, 1960; Schiavi, 1964; Advis y Ramirez, 1977) como en el posterior (Schiavi, 1964), inducen una pubertad precoz. También estructuras extrahipotalámicas tales como el hipocampo (Riss y col., 1963) y la corteza cerebral (Rose-E-Silva y col., 1982) estarían involucradas en el control de la maduración sexual. El sistema opioide jugaría un activo rol inhibiendo la liberación de gonadotrofinas antes de la pubertad (Blank y col., 1979). Así, la adquisición de la actividad reproductiva dependería de una disminución en la actividad opioide, pero también de una mayor prevalencia de factores estimulatorios (Bhanot y Wilkinson, 1983; Sirinathsinghji y col., 1985). La naturaleza de estos factores estimulatorios es aún incierta. El sistema catecolaminérgico, serotoninérgico (Brown, 1971; Moguilevsky y col., 1985; Müller y col., 1972; Sarkar y col., 1981) y aminoácidos

activos tales como el ácido N-metil aspártico, el ácido glutámico (Glut) y el ácido homocisteico (Price y col., 1978; Price y col., 1979; Ondo y col., 1976) han sido asociados con el inicio de la pubertad. Las señales estimuladoras mencionadas actuarían alterando el patrón de secreción de GnRH hipotalámico. Wray y Hoffman (1986) han demostrado que la morfología de las neuronas productoras de GnRH cambia durante el desarrollo juvenil. Estas variaciones morfométricas podrían inducir alteraciones en la liberación hipotalámica de GnRH, y consecuentemente, modificar la secreción de las hormonas adenohipofisarias asociadas con la regulación del crecimiento y funcionalidad de los testículos. Por otra parte, la maduración testicular involucra cambios en el biosíntesis de andrógenos. La secreción hipofisaria de FSH, y la producción de T son estímulos básicos para el inicio de la espermatogénesis (Setchell, 1982). La T y la inhibina testicular efectúan una retroalimentación negativa a nivel hipotalámico-hipofisario, atenuando la liberación de gonadotrofinas (Ramírez y Mc Cann, 1965). Recientemente, Rulli y col. (1996), han señalado que, en ratas prepúberes, el entorno androgénico altera no sólo la cantidad sino también la calidad de FSH sintetizada en la hipófisis, mediante la formación de una amplia variedad de isoformas que difieren en las estructuras de los oligosacáridos unidos al polipéptido. Dicha heterogeneidad de la molécula de FSH podría proveer al organismo de un mecanismo de regulación fina adicional que contribuiría al control de la función reproductiva. A partir de la pubertad, la unidad hipotálamo-hipofisaria se vuelve progresivamente menos sensible a la regulación negativa testicular (Ramírez y Mc Cann, 1965; Negro-Vilar y col., 1973b; Nazian y Mahesh, 1979). Estos cambios de sensibilidad permitirían el aumento en la secreción de FSH y LH, a pesar de la significativa producción de T durante el desarrollo puberal. Sin embargo, esta hipótesis no explica el perfil divergente observado en la secreción de FSH y LH durante el proceso de maduración sexual. Por esta razón, diversos autores han postulado que, en la eclosión de la madurez sexual, existiría también una activación de la liberación de GnRH independiente de la retroalimentación negativa por esteroides (Ojeda y Urbanski, 1994).

Recientemente, en especies fotosensibles, se han observado alteraciones de la función neuroendócrina asociadas al ciclo reproductivo anual. Experimentos realizados con precursores e inhibidores de la biosíntesis de catecolaminas indican que, FC inducen un aumento en la concentración hipotalámica de GnRH, asociado con una disminución en los niveles dopaminérgicos centrales; mientras que, la recrudescencia testicular, incrementa el contenido de norepinefrina y disminuye los niveles hipotalámicos de GnRH a los niveles basales detectables en el grupo control mantenido en condiciones normales de luminosidad (Steger y col., 1982; Steger y col., 1984). Así, fotoperíodos restrictivos reducirían la actividad de las neuronas adrenérgicas y dopaminérgicas del hipotálamo, inhibiendo la liberación de GnRH a la circulación portal. En cambio, el aumento del contenido hipotalámico de norepinefrina como consecuencia de alteraciones en su recambio, estimularía la secreción de GnRH; y consecuentemente, la liberación hipofisaria de LH y FSH responsables de la recrudescencia testicular (Bartke, 1985).

Aminoácidos endógenos tales como el glutamato estarían también involucrados en la modulación fotoperiódica de la funcionalidad de las neuronas generadoras de GnRH (Urbanski, 1990; Colwell y col., 1991; Ebling y col., 1995). Al respecto, Urbanski y col. (1993), demostraron que, el efecto inhibitorio del FC sobre la actividad testicular, puede ser bloqueado o revertido a través del tratamiento crónico con agonistas glutamatérgicos.

Urbanski y col (1992) describieron la visualización de un pericario considerablemente mayor en las neuronas GnRH de hámsteres expuestos a FC, que el detectado en neuronas de hámsteres inmaduros y el correspondiente a animales controles adultos mantenidos en fotoperíodo estimulatorio. Así, las neuronas GnRH de hámsteres en condiciones restrictivas de luminosidad serían capaces de sintetizar importantes cantidades del neuropéptido. Esto indicaría que, durante el desarrollo puberal, aumenta la capacidad de síntesis y secreción de GnRH; mientras que, los bajos niveles de gonadotrofinas circulantes observados en animales en regresión, resultan de una inhibición en la secreción, pero no en la síntesis de esta hormona hipotalámica.

Es poco probable que, la fotopercepción actúe directamente sobre la actividad secretoria de las neuronas hipotalámicas productoras de GnRH. Existen numerosas evidencias que señalan a la glándula pineal, como el sitio primario de acción del fotoperíodo sobre la función neuroendócrina. Los pinealocitos poseen una amplia variedad de receptores a neurotransmisores entre los que se incluyen catecolaminas, benzodiacepinas, dopamina, GABA y glutamato (Champney, 1989; Ebaldi, 1987; Kus y col., 1993); que responden al control neural ejercido por el ganglio cervical superior, en íntimo contacto con la células fotoreceptoras de la retina. Así, la producción y secreción de melatonina por la glándula pineal, regularía la síntesis y liberación de las hormonas hipotalámicas, y consecuentemente, la actividad adenohipofisiaria.

Pickard y Silverman (1979) han establecido que, a pesar de las alteraciones ocurridas a nivel hipotalámico, el fotoperíodo no modifica la sensibilidad de la hipófisis a la estimulación con GnRH.

La severa disminución en los niveles circulantes de GnRH y gonadotrofinas durante la fase de regresión, conduce a una significativa reducción en la producción gonadal de andrógenos. Estos cambios en los niveles periféricos de LH, FSH y T en animales expuestos a FC, son acompañados por alteraciones en la sensibilidad de la unidad hipotalámico-hipofisaria a la retro-regulación ejercida por los esteroides testiculares. Dichas modificaciones se ponen de manifiesto a través de la falta de operatividad del sistema compensatorio que usualmente eleva la secreción hipofisaria de gonadotrofinas cuando la liberación gonadal de T es reducida (Bartke, 1985). Asimismo, experimentos realizados por Tamarkin y col (1976a), Matt y Stetson (1979) y Ellis y Turek (1979) indican que, durante la fase de recrudescencia, la unidad hipotalámica-hipofisaria experimenta una marcada disminución en su sensibilidad a la retro-regulación negativa testicular.

4.1.2. Sistema nervioso periférico

El **sistema nervioso periférico** ha sido tradicionalmente descripto como un **sistema motor eferente** que conecta al sistema nervioso central con las vísceras. Sin embargo, el sistema nervioso periférico no es exclusivamente eferente, ya que la mayoría de los nervios viscerales contienen también fibras **sensoriales aferentes** entremezcladas con las fibras motoras, que llevan información desde los receptores localizados en la perifería del cuerpo hacia el sistema nervioso central (Loewy, 1990).

El sistema eferente está constituido por un *sistema nervioso somático* y un *sistema nervioso autónomo*.

Las fibras nerviosas de la parte somática del sistema nervioso periférico van desde el cerebro o médula espinal hasta las fibras musculares esqueléticas, en donde controlan el movimiento de los músculos empleando como principal neurotransmisor a la acetilcolina. El sistema nervioso somático es un sistema "voluntario", ya que la movilidad de los músculos esqueléticos se encuentra bajo el control cerebral. En cambio, el sistema nervioso autónomo, controla las funciones involuntarias del cuerpo. Este sistema presenta fibras nerviosas que se originan en el cerebro o médula espinal, igual que lo hacen los nervios del sistema somático; pero a diferencia de ellos, las sinapsis de las fibras autónomas se producen fuera de la médula en unos grupos de células denominados *ganglios*. De este modo, el sistema autónomo está integrado por dos neuronas efectoras: la *neurona preganglionar*, que vá desde la médula a los ganglios; y la *neurona postganglionar*, que inerva a los tejidos periféricos.

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

Muchos tejidos se encuentran inervados por fibras simpáticas y parasimpáticas, siendo sus acciones antagónicas.

Todas las fibras preganglionares, tanto simpáticas como parasimpáticas, liberan acetilcolina en las sinapsis con las células postganglionares. En cambio, las fibras postganglionares parasimpáticas, liberan acetilcolina en sus terminaciones; mientras que, las fibras simpáticas, secretan norepinefrina.

Aunque la norepinefrina y la acetilcolina son los neurotransmisores "clásicos" del sistema nervioso autónomo, recientemente se han identificado un número importante de factores y péptidos a los cuales se les atribuyen también funciones neurotransmisoras y/o neuromoduladoras (Hökfelt y col., 1977; Schulzberg y Lindh, 1988; Gershon y col., 1977; Furness y Costa, 1978).

4.1.2.1. Inervación del tracto genital masculino

El testículo, el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias reciben inervación simpática y parasimpática del sistema nervioso autónomo, y poseen también un sistema sensorial aferente. El sistema motor eferente que inerva a los órganos reproductivos, deriva de plexos nerviosos preentrales. En la rata, existen 5 plexos nerviosos prevertebrales, interconectados, que rodean a las arterias: *el plexo celíaco o solar*, *el intermesentérico o aórtico*, *el mesentérico caudal inferior y posterior*, *el hipogástrico* y *el plexo pélvico* (Fig. 11).

El plexo celíaco posee inervación simpática desde los nervios torácicos y lumbares; mientras que los demás plexos reciben solamente nervios espláncnicos lumbares. El plexo celíaco cuenta también con el aporte parasimpático del nervio vago. El plexo intermesentérico, que se encuentra ventral y ventrolateralmente a la aorta, conecta al plexo celíaco con los plexos de ubicación caudal (el plexo caudal mesentérico, el hipogástrico y el plexo pélvico). El plexo mesentérico rodea la arteria homónima y contiene uno o más ganglios. En la mayoría de las especies, el nervio hipogástrico es una única fibra originada en el borde posterior del ganglio mesentérico caudal, que lo comunica con el plexo pélvico.

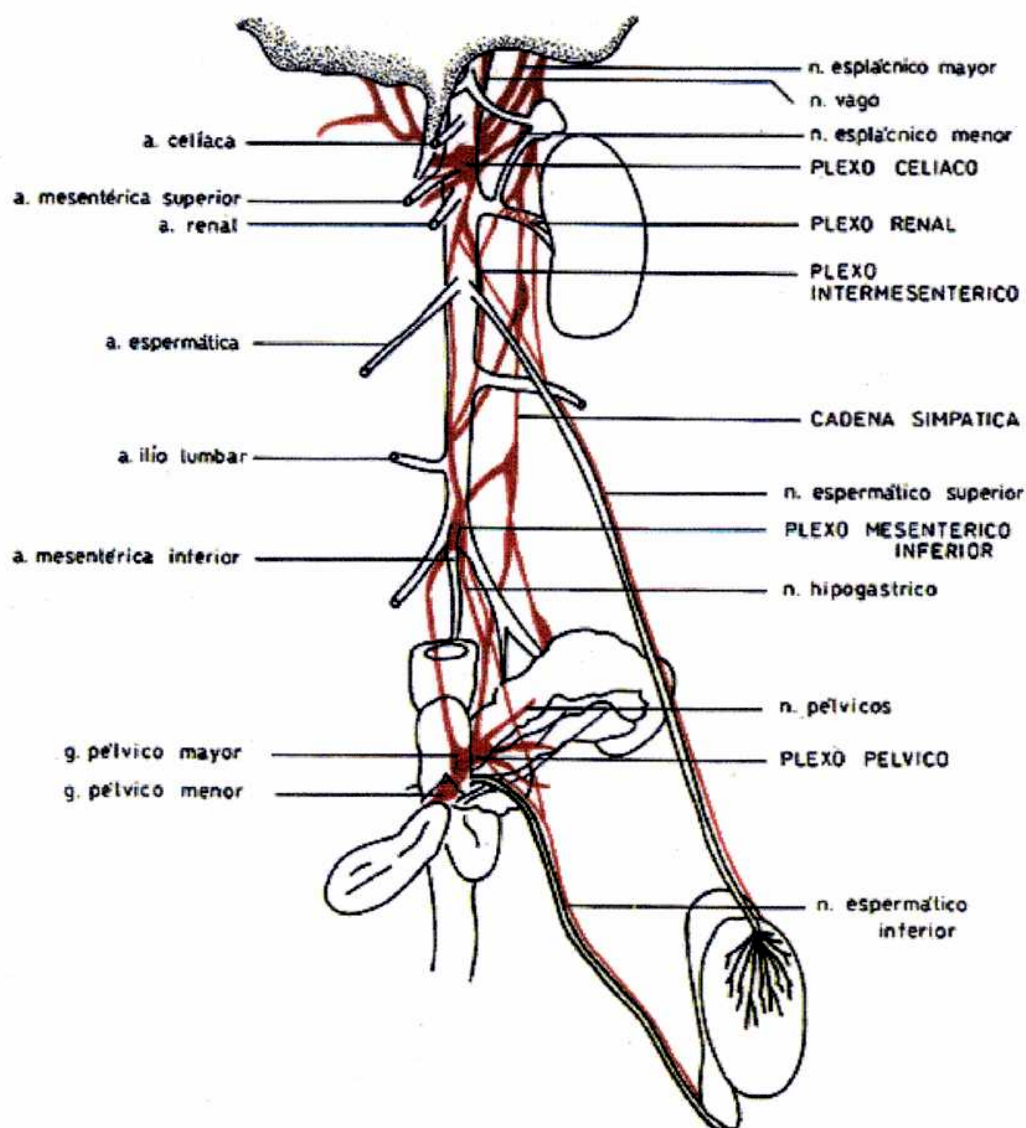


Figura 11. INERVACION DEL TESTICULO DE RATA

El esquema ilustra la disposición anatómica de la cadena simpática, los plexos prevertebrales y los nervios espermáticos que inervan el testículo.

a: arteria; n: nervio

En cambio, en el hombre, una red de nervios localizada luego de la bifurcación de la aorta constituye el plexo hipogástrico. El plexo pélvico no sólo recibe la innervación simpática del nervio hipogástrico, sino que también arriban a él los nervios pélvicos parasimpáticos que se originan en los nervios sacros.

Se han descripto ganglios periféricos en diferentes especies. Frecuentemente, se reconoce un pequeño ganglio, el *ganglio espermático*, cercano al origen de la arteria testicular proveniente de la aorta. Este ganglio recibe ramificaciones provenientes de otros ganglios y de los plexos intermesentérico, celíaco y mesentérico caudal; así como una innervación directa del nervio simpático lumbar. En la rata, el ganglio pélvico mayor o hipogástrico, ubicado en el ligamento lateral de la vejiga contiguo a la próstata, provee innervación al recto, uretra, pene, lóbulo dorsal de la próstata, vejiga y conducto deferente.

Existen también fibras sensoriales aferentes en todas las vías nerviosas descriptas en los párrafos precedentes. Estas fibras se encuentran a lo largo del nervio pélvico penetrando en la médula a través de los nervios sacros; o bien, recorren el nervio hipogástrico y otros plexos proximales; pasando luego por los nervios esplácnicos y de la cadena simpática, para alcanzar finalmente la médula espinal a través de las raíces dorsales de los nervios espinales (Setchell y col., 1994).

4.1.2.1.1. *Innervación del testículo, epidídimo y conducto deferente*

Empleando la denervación quirúrgica y/o química, se ha podido trazar el recorrido de las distintas fibras nerviosas que llegan al testículo.

En el humano los nervios espermáticos que arriban al testículo se presentan en tres grupos: el *nervio espermático superior*, el *intermedio* y el *inferior*. Las fibras espermáticas superiores provienen de los nervios intermesentéricos y del plexo renal, descienden a lo largo de la arteria testicular y terminan en la gónada. El nervio espermático intermedio se origina en la porción superior del plexo hipogástrico y se extiende hasta el canal inguinal interno, por donde penetra al cordón espermático. Las ramas terminales de este nervio innervan el epidídimo y la

porción proximal del conducto deferente. El nervio espermático inferior se origina principalmente en el plexo pélvico, y en menor grado en el plexo mesentérico inferior, inervando el conducto deferente y el epidídimo, aunque provee también de algunas fibras al testículo. En la rata, a diferencia del humano, no se encuentra el nervio espermático intermedio. Estudios recientes, cuestionan la importancia del ganglio paraaórtico como fuente de inervación testicular en la rata (Rauchenwald y col., 1995). Estos autores han detectado que el testículo recibe inervación contralateral y bilateral; y a través de la técnica de marcado retrógrado, han localizado una importante cantidad de neuronas en los ganglios accesorios y pélvico principal.

Estudios histoquímicos han revelado la presencia de abundantes fibras nerviosas simpáticas en el testículo, principalmente en la túnica albugínea y vascular (Setchell y col., 1994). 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. Coincidentemente, la denervación testicular produce una disminución significativa en el contenido capsular de catecolaminas (Campos y col., 1990a). Por otra parte, Bell y McLean (1973), han descrito un moderado número de fibras colinérgicas distribuidas uniformemente en la cápsula gonadal, que no se asocian al recorrido de los vasos sanguíneos. Campos y col (1990b) observaron que el corte de las fibras espermáticas superiores, produce una marcada caída en el contenido de 5-HT en la cápsula y el intersticio testicular de la rata. En la cápsula gonadal del gato, se ha encontrado también, el polipéptido intestinal vaso activo (VIP), en asociación con vasos sanguíneos; mientras que, en la rata, no se ha podido detectar su presencia (Zhu y col., 1995).

A través del estudio histológico de cortes de testículos normales se ha demostrado la presencia de finos nervios en el mediastino testicular y en el tejido conectivo intertubular (Dayan, 1970). Estas fibras se encuentran próximas a vasos sanguíneos (Baumgarten y Holstein, 1967; Baumgarten y col., 1968), y se ha sugerido que estarían relacionadas con el control de la irrigación gonadal y el tono

vascular (Setchell, 1978). No se han observado fibras que penetren la membrana de los túbulos seminíferos. Sin embargo, se ha descrito la presencia de nervios adrenérgicos cercanos a las células mioides que rodean a los túbulos en la rata y en humanos, los cuales regularían la contractilidad tubular y el transporte de espermatozoides hacia los conductos eferentes y el epidídimo (Baumgarten y Holstein, 1967; Nistal y col., 1982; Koji y col., 1986; Yamamoto y col., 1987). En el hombre, gato, mono rhesus y perro, se han encontrado fibras nerviosas cercanas a las células de Leydig (Okkels y Sand, 1940; Campenhout, 1949; Baumgarten y Holstein, 1967; Nistal y col., 1982); mientras que, en la rata, se han detectado nervios sólo en la cápsula, y no en el parénquima testicular (Zhu y col., 1995).

4.1.2.1.2. Inervación de las glándulas sexuales accesorias

Las glándulas accesorias se encuentran inervadas por fibras provenientes del plexo pélvico. Estos nervios arriban a los órganos ipsilaterales; mientras que, un entrecruzamiento fibrilar en la línea media permite la inervación de los órganos contralaterales. Las neuronas que inervan las glándulas sexuales accesorias contienen fundamentalmente epinefrina, norepinefrina y/o acetilcolina. La existencia de *fibras postganglionares cortas* con sus cuerpos celulares localizados en ganglios cercanos, es una característica distintiva de los glándulas sexuales accesorias. Colectivamente estos nervios conforman el *sistema neuronal adrenérgico corto* o *sistema neuronal corto urogenital*, y serían responsables de la inervación de la musculatura lisa ganglionar.

El sistema vascular de estos órganos reproductivos accesorios, se encuentra inervado por *fibras postganglionares largas* que viajan a través de los vasos sanguíneos. La mayoría de las especies presentan también numerosos *ganglios preterminales intrínsecos*, integrados por células ganglionares aisladas o agrupadas, asociadas con nervios que se ramifican dentro de las glándulas accesorias. Estos ganglios son abundantes en la cápsula y capa muscular; mientras que, son escasos en el tejido conectivo subepitelial (Setchell y col., 1994).

4.2. NEUROTRANSMISORES

4.2.1. GABA

El neurotransmisor GABA es sintetizado, a nivel central y en órganos periféricos, a partir del Glut por acción de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD; EC 4.1.1.15) (Fig. 12).

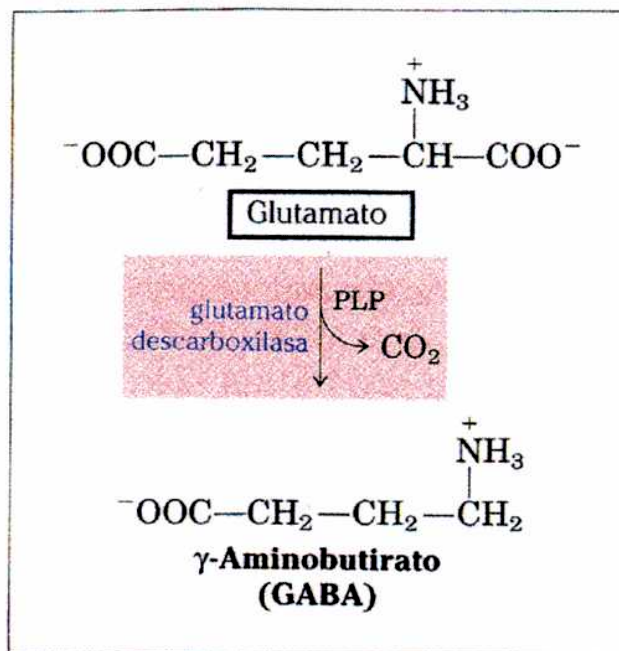


Figura 12. BIOSÍNTESIS DE GABA A PARTIR DE GLUTAMATO
PLP: fosfato de piridoxal

A su vez, el Glut puede ser obtenido a partir de una aminación reductiva catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa que emplea α -cetoglutarato e ión amonio como precursores; o bien, mediante la actividad hidrolítica de la enzima γ -glutamyl-transpeptidasa (γ GT) sobre su sustrato fisiológico el glutathione (Agrawal y Vanha-Perttula, 1988).

No obstante, como se ha descrito previamente, GABA puede ser también producido a partir de Put por acción directa de las enzimas DAO y aldehído deshidrogenasa, o bien, por previa acetilación de la Put y posterior actividad de las enzimas MAO, aldehído deshidrogenasa y A-PA deacetilasa (Andersson y Henningsson, 1980; Andersson y col., 1980; Seiler, 1980; Caron y col., 1988).

El catabolismo tisular de este neurotransmisor, involucra su transformación a succínico semialdehído (SSA) por medio de la enzima 2-oxoglutarato aminotransferasa o GABA transaminasa (GABA-T; EC 2.6.1.19). Finalmente, el SSA es convertido, por acción de la succínico semialdehído dehidrogenasa (SSADH), en ácido succínico (SA), un compuesto intermediario en el ciclo del ácido cítrico (Seiler y Eichentopf, 1975).

Se han descrito varias proteínas transportadoras de GABA tanto a nivel central (Liu y col., 1993) como periférico (Aanesen y col., 1995; Aanesen y col., 1996). Dichas proteínas co-transportan Na^+ y Cl^- a través de la membrana celular. La diversidad farmacológica de transportadores gabaérgicos ha sido demostrada por su diferente afinidad a reconocidos inhibidores. Entre los principales bloqueantes del transporte de GABA podemos citar los siguientes: L 2,4-ácido diamino-n-butírico (DABA), cis 3-ácido carboxílico aminociclohexano (ACHC), 4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo 4,5-piridin 3-ol (THPO), ácido nipecótico, β -alanina y guvacina (Krogsgaard-Larsen, 1981; Liu y col., 1993; Aanesen y col., 1995; Aanesen y col., 1996).

Estudios farmacológicos, inmunológicos y moleculares, han permitido identificar tres tipos diferentes de receptores gabaérgicos de membrana: GABA_A , GABA_B y GABA_C .

El receptor GABA_A posee un canal de cloro, un sitio de unión para GABA que es estimulado por el agonista muscimol e inhibido competitivamente por bicucullina, una zona de reconocimiento para el ligando picrotoxina (un antagonista no-competitivo de la unión del neurotransmisor), y sitios de afinidad para barbitúricos, benzodiazepinas y hormonas esteroideas que modulan su actividad (Krogsgaard-Larsen, 1981; Macdonald y Olsen, 1994; McKernan y Whiting, 1996) (Fig. 13). La presencia de un canal iónico activado por ligandos, permite agrupar al receptor GABA_A, al receptor de acetilcolina nicotínico y al receptor de glicina, dentro de una misma superfamilia (Stephenson, 1988). El receptor GABA_A se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro, fundamentalmente en la corteza cerebral frontal y el cerebelo (Stephenson, 1988). No obstante, este tipo de receptor gabaérgico ha sido también identificado en diferentes órganos periféricos entre los que se encuentran el útero, las glándulas adrenales, las células de Leydig, y espermatozoides (Erdö, 1985; Erdö y Wekerle, 1990; Ritta y col., 1991; Wistrom y Meizel, 1993; Blackmore y Bleasdale, 1994). El receptor GABA_A ha sido mayoritariamente descrito como un tetrámero formado por dos cadenas polipeptídicas α , de peso molecular 53KDa; y por dos sub-unidades β de 58KDa. La sub-unidad α es la responsable de la unión de benzodiazepinas al receptor; mientras que, el agonista muscimol, reconoce al polipéptido β . Cada una de estas sub-unidades posee, un extremo N-terminal extracelular con sitios de glicosilación, cuatro dominios hidrofóbicos trans-membrana (M1, M2, M3 y M4), una secuencia aminoacídica intracelular, que en la sub-unidad β posee un sitio de fosforilación; y un corto extremo C-terminal extracelular. Las cuatro copias de la hélice M2 determinan el canal de cloro. Recientes estudios farmacológicos, fisiológicos y moleculares han permitido describir nuevas sub-unidades del receptor GABA_A. Así, los diferentes tipos (α , β , γ , δ y ρ) y combinaciones de las cadenas polipeptídicas determinan una amplia diversidad molecular y funcional de receptores gabaérgicos tipo A (Stephenson, 1988; Seeburg y col., 1990; Burt y Kamatchi, 1991; Wisden y Seeburg, 1992; Macdonald y Olsen, 1994; McKernan y Whiting, 1996).

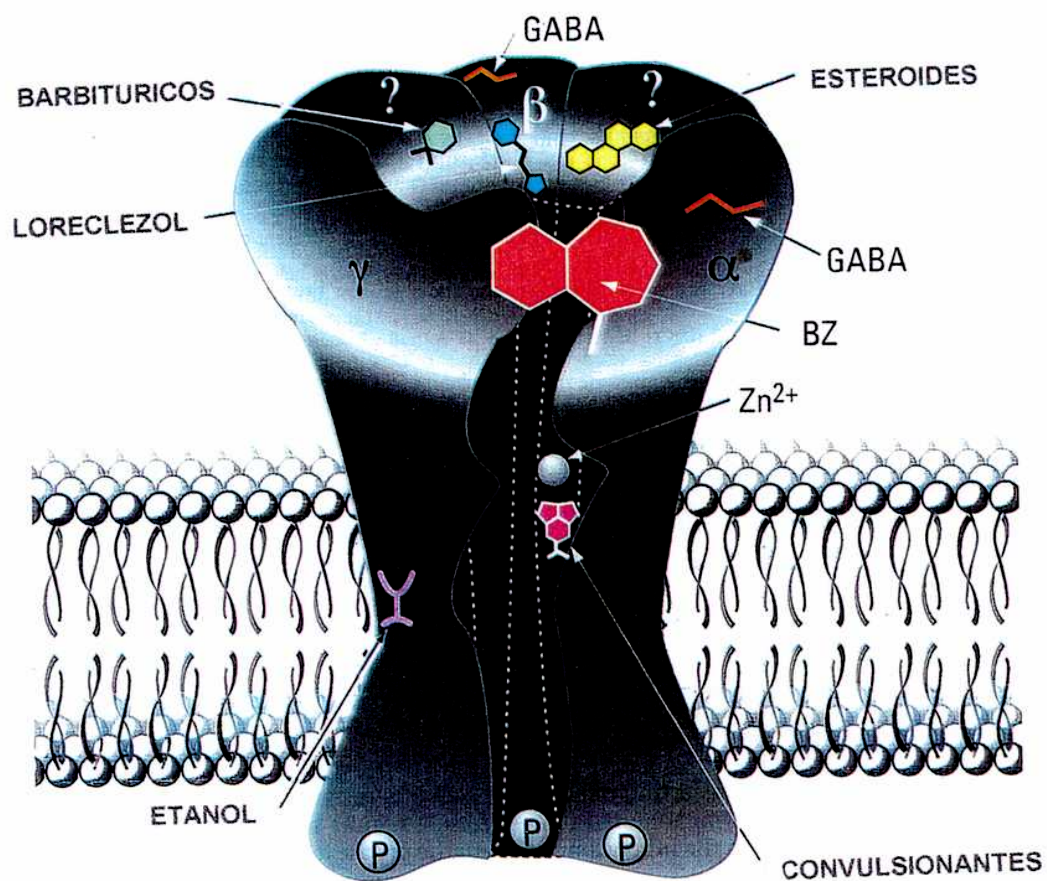


Figura 13. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL RECEPTOR GABA_A

El receptor GABA_B ha sido purificado y caracterizado como una proteína de peso molecular de 80KDa (Nakayasu y col., 1993), que une específicamente a los ligandos baclofen y ácido 3-aminopropanofosfínico (APPA) (Bowery y col., 1980; Ong y col., 1990). Los antagonistas más ampliamente utilizados en la determinación de estos receptores gabaérgicos son el faclofen y el 2-hidroxi-saclofen (Curtis y col., 1988; Kerr y col., 1987; Kerr y col., 1988; Lambolez y col., 1992; Buhl y col., 1994). Los receptores tipo B son bicucullina insensibles; y las benzodiazepinas y barbitúricos no interactúan con ellos (Stephenson, 1988). Estudios farmacológicos han permitido establecer una amplia distribución de estos receptores tanto a nivel central como periférico (Kerr y col., 1987; Kerr y col., 1988; Curtis y col., 1988; Ong y col., 1990; Andrade y col., 1986; Ritta y col., 1991; Häusler y col., 1993). La determinación de receptores GABA_B es dependiente de cationes bivalentes (Stephenson, 1988), encontrándose los mismos asociados a la actividad de canales de Ca⁺² y/o K⁺ (Newberry y Nicoll, 1984; Andrade y col., 1986; Holz y col., 1986; Dutar y Nicoll, 1988; Ohmori y col., 1990). Los receptores gabaérgicos B, se encuentran acoplados a sistemas intracelulares de segundos mensajeros, que involucran la actividad de GTPasas (Asano y col., 1985; Andrade y col., 1986; Ohmori y col., 1990) y la inhibición de la formación de AMPc vía reducción de la actividad adenilato ciclasa (Wojcik y Neff, 1984; Nishikawa y Kuriyama, 1989). Adicionalmente, los receptores B están positivamente acoplados al recambio de fosfoinosítoles, los cuales generan 1,2 diacilglicerol e inositol-1,4,5-trifosfato (Crawford y Young, 1988; Godfrey y col., 1988).

Recientemente se ha descrito una tercer clase de receptor de GABA, el tipo C, insensible a bicucullina y baclofen; y localizado mayoritariamente en las neuronas retinales (Qian y Dowling, 1993; Dong y col., 1994; Lukasiewicz y col., 1994; Bormann y Feigenspan, 1995). El receptor GABA_C es específicamente activado por los enantiómeros cis/trans del ácido 4-aminocrotónico (CACA y TACA) y del ácido carboxílico 2-aminometil-ciclopropano (CAMP y TAMP); y es fuertemente antagonizado por el ácido acético 4-imidazólico (Bormann y Feigenspan, 1995). Este receptor es un canal de cloro constituido por difentes tipos

de sub-unidades polipeptídicas ρ (Bormann y Feigenspan, 1995; Enz y col., 1995). Mientras que ρ_1 es selectivamente expresada en la retina, la sub-unidad ρ_2 es localizada también en otras partes del sistema nervioso central tales como el hipocampo y la corteza (Enz y col., 1995). Los receptores serotoninérgicos tipo 2 (5-HT₂) y los glutamatérgicos metabotrópicos que, vía una proteína G y activación de la fosfolipasa C, elevan los niveles intracelulares de diacilglicerol; inducen la fosforilación de los receptores GABA_C a través de una PKC, modulando de este modo la actividad gabaérgica por reducción de la corriente transmembrana de cloruro (Bormann y Feigenspan, 1995).

4.2.2. Serotonina

La 5-HT es sintetizada a partir del aminoácido triptofano. En una primer etapa la enzima triptofano hidroxilasa, dependiente de O₂, pteridina y Fe⁺², cataliza la formación de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) (Hamon y col., 1981). Posteriormente, el 5-HTP es decarboxilado a 5-HT por una decarboxilasa no específica que actúa sobre L-aminoácidos aromáticos utilizando como co-factor al fosfato de piridoxal. La 5-HT así sintetizada se almacena en vesículas secretorias en forma de complejos no difusibles con ATP.

El catabolismo de esta monoamina ocurre a nivel mitocondrial. La 5-HT sufre desaminación oxidativa por acción de una MAO para formar 5-hidroxi indolacetaldehído. Este compuesto es rápidamente degradado por la aldehído dehidrogenasa que genera 5-HIAA, principal metabolito de la 5-HT. El hidroxiiindolacetaldehído puede ser también catabolizado, aunque en menor proporción, a 5-hidroxitriptofol vía actividad aldehído reductasa (Fig. 14).

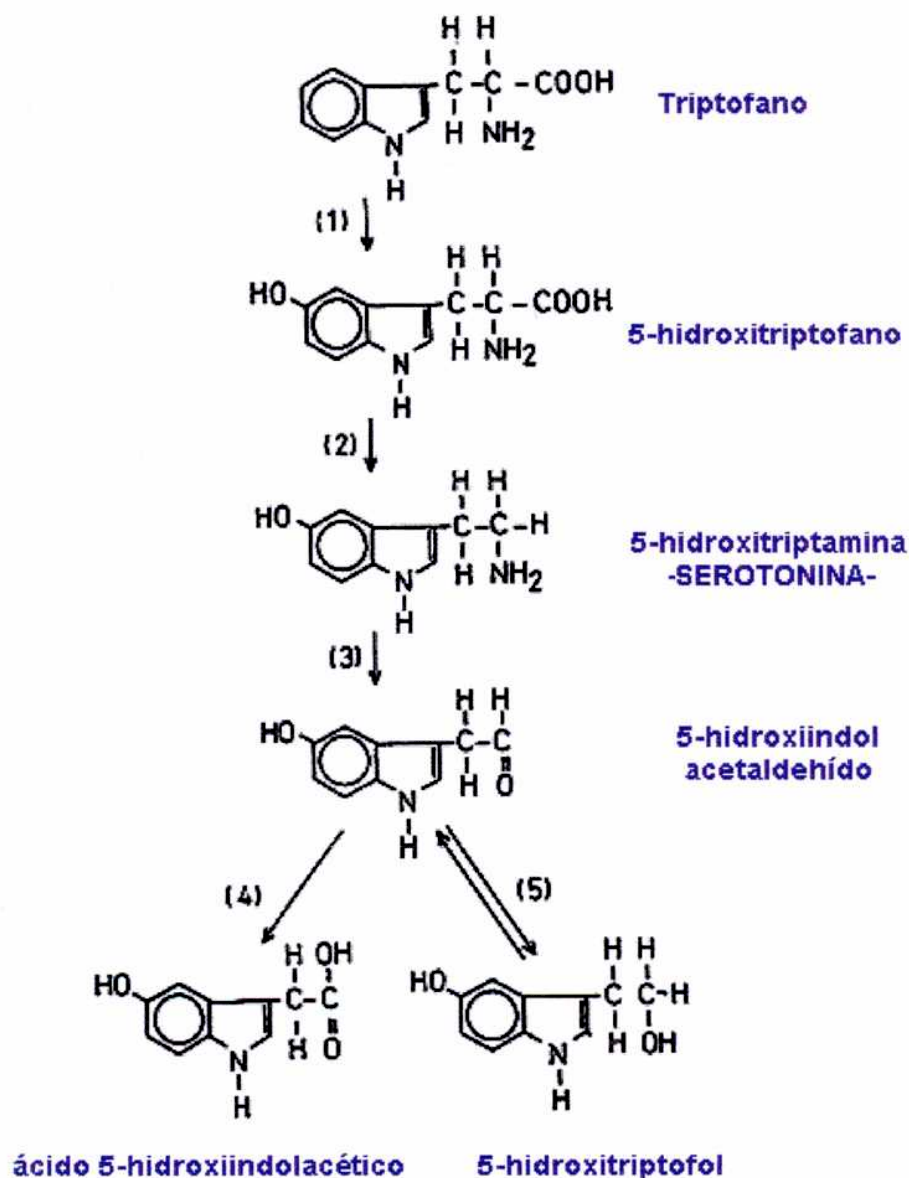


Figura 14. BIOSINTESIS Y CATABOLISMO DE SEROTONINA

(1): triptofano hidroxilasa; (2) decarboxilasa de aminoácidos aromáticos; (3) monoaminoxidasa; (4) aldehído deshidrogenasa; (5) aldehído reductasa.

La clasificación original de los receptores serotoninérgicos, dividía a estas moléculas proteicas de membrana en dos tipos: D y M, según el bloqueo de su actividad por los antagonistas dibenzilina y morfina, respectivamente. Los recientes progresos en la farmacología molecular han permitido recategorizar a los receptores de 5-HT en cuatro familias diferentes (5-HT₁; 5-HT₂; 5-HT₃ y 5-HT₄), cada una integrada por múltiples subtipos proteicos que presentan propiedades bioquímicas, farmacológicas y fisiológicas similares (Peroutka y Snyder, 1979; Schmidt y Peroutka, 1989; Dinan, 1996). En los últimos años, estudios de clonación molecular han revelado la existencia de nuevos receptores serotoninérgicos (5-HT_{5a}, 5-HT_{5b}, 5-HT₆ y 5-HT₇) de los cuales aún se desconocen sus características farmacológicas y fisiológicas (Dinan, 1996).

La Tabla 1 resume los principales agonistas y antagonistas empleados en la determinación de la vasta diversidad de receptores serotoninérgicos existentes.

Los subtipos de receptores de 5-HT activan diferentes sistemas de señales intracelulares. Los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D}, inhiben la acción estimuladora de la forskolina sobre la adenilato ciclasa, a través de su interacción con una proteína capaz de unirse específicamente a nucleótidos de guanina (Gi). Los receptores 5-HT_{1c} y 5-HT₂, activan a la PKC y fosfolipasa C; mientras que, los receptores 5-HT₃ se encontrarían asociados a canales iónicos activables por ligandos específicos (Hartig, 1989; Dufau y col., 1993; Dinan, 1996).

Los receptores de 5-HT han sido localizados en el hipotálamo y otras áreas del cerebro (Kulich y col., 1981; Fuller, 1981; Hadjiconstantinou y col., 1982; Holmes y col., 1982; Naumenko, 1985; Calogero y col., 1989; Dinan, 1996), en la hipófisis (Spinedi y Negro-Vilar, 1983; Calogero y col., 1995; Dinan, 1996), y diferentes tejidos periféricos (Humphrey, 1984; Leysen, 1984; Lefebvre y col., 1992; Tinajero y col., 1992; Dufau y col., 1993; Dinan, 1996).

		AGONISTAS	ANTAGONISTAS
5-HT ₁	5-HT _{1A}	buspirona: 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)-tetralina (8-OH-DPAT); N,N-dipropil -5-caboxamido triptamina; oximetazolina; espiroxitrina; urapidil; ipsapirona; 2-(2,6-dimetoxi-fenoxietil) aminometil-1,4-benzodioxano (WB 4101); 5-metoxymetiltriptamina (MDMT).	pindolol; propranolol; espiperona: 4-iodo-N-[2-[4-(metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-N-2-piridinil-benzamida (p-MPPI); 1-(2-metoxifenil)-4-[4-(2-phtalimido)butil] piperazina (NAN-190); S(-)-5-fluoro-8-hidroxi-DPAT (S(-)-UH-301).
	5-HT _{1B}	anpirtolina: 7-trifluorometil-4-(4-metil-1-piperazinil)-pirrolo[1,2-a] quinoxalina (CGS-12066A); oximetazolina.	
	5-HT _{1C}	2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI); 2,5-dimetoxi-4-bromo anfetamina (DOB); oximetazolina.	cinanserina; clozapina; ciproheptadina; ketanserina; mesulergina; metilsergida; pirenperona; ritanserina.
	5-HT _{1D}	N-[4-[[5-[3-(2-aminoetil)-1H-indol-5-il]-1,2,4-oxadiazol-3-il]metil]fenil] metanesulfonamida (L-694,247); oximetazolina; sumatriptan.	metergolina.
	5-HT _{1E}	-----	metiotepina.
	5-HT _{1F}	-----	metiotepina.
5-HT ₂		2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI); 2,5-dimetoxi-4-bromo anfetamina (DOB); α-metil-5-HT.	cinanserina; ciproheptadina; ketanserina; mesulergina; metergolina; metilsergida; pirenperona; risperidona; ritanserina; espiperona; sulpirida.
5-HT ₃		1-(m-clorofenil)-biguadina; trimetil-5-HT; 2-metil-5HT; 1-fenil-biguadina; quipazina.	metoclopramida; 3-tropanil-indol-3-carboxilato; 3-tropanil-3,5-diclorobenzoato (MDL72222).
5-HT ₄		(1S-cis)-4-amino-5-cloro-N-[(hexahidro-1H-pirrolizina-1-il)metil]-2-metoxibenzamida; zacoprida.	
5-HT ₆		-----	clozapina; metiotepina.
5-HT ₇		-----	clozapina.

Tabla 1. CLASIFICACION DE RECEPTORES SEROTONINERGICOS

4.2.3. Neuromodulación de la función gonadal

La descripción de fibras nerviosas en el testículo condujo, a la determinación bioquímica de neurotransmisores en la gónada.

En 1968, Kormano y Pentilla establecieron mediante técnicas espectrofluorométricas la presencia de 5-HT en el testículo y el epidídimo de ratas adultas. Zieher y col (1971), y Lombard-des Gouttes y col (1974), describieron la presencia testicular de aminas biógenas (5-HT, dopamina, norepinefrina e histamina). Trabajos realizados en nuestro Laboratorio han permitido detectar una distribución compartamental de las catecolaminas (Campos y col., 1990a) y la 5-HT (Campos y col., 1990b) en el testículo de la rata. Tanto la norepinefrina como la 5-HT presentan concentraciones significativas en cápsula, líquido intersticial y células de Leydig de rata, siendo no detectables en el compartimiento tubular. También se ha determinado la presencia de dopamina en cápsula y líquido intersticial, aunque en niveles menores que los descritos para norepinefrina. La epinefrina no fue identificada en ninguno de los compartimientos testiculares estudiados (Campos y col., 1990a; Campos y col., 1990b).

Nuestro Laboratorio ha descrito también la presencia de GABA en parénquima testicular de rata, detectándose los máximos niveles durante la etapa prepuberal (Ritta y col., 1987).

Ha sido establecido que, un gran número de factores endógenos, entre ellos algunos neurotransmisores, son capaces de influenciar la actividad testicular afectando la funcionalidad de las células de Leydig y Sertoli (Cooke y col., 1982; Moger & Murphy, 1983; Verhoeven, 1980). La denervación quirúrgica o química del testículo en etapas tempranas del proceso de maduración sexual, interfiere con el normal desarrollo gonadal y con el mecanismo hipertrófico compensatorio característico de la hemicastración; provocando también la degeneración y reducción del epitelio germinal en perros, cobayos y gatos (Kuntz, 1919; Marconi, 1923; King y Langworthy, 1940; Coujard, 1954; Nagai y col., 1982; Martin y col., 1984). Estos resultados sugieren que la inervación simpática participaría en el

crecimiento testicular, y en especial, en el desarrollo de los túbulos seminíferos. Las primeras evidencias de que la innervación testicular modularía la producción de andrógenos fueron aportadas por Frankel y Ryan (1981), quienes demostraron que la sección de los nervios gonadales bloquea parcialmente el aumento de T plasmática inducido por estrés. Mientras que, la denervación bilateral del nervio espermático superior no afecta los niveles periféricos de T, el peso testicular, la espermatogénesis, ni el comportamiento sexual de la rata (Frankel y Ryan, 1981); la vasectomía, que involucra la sección del nervio espermático inferior, inhibe parcialmente el aumento de la concentración de T en la vena testicular de ratas hemicastradas (Frankel y col., 1984). La administración de antagonistas β -adrenérgicos, disminuye los niveles de T presentes en la vena testicular y el líquido intersticial (Moger y Anakwe, 1986); en cambio, la infusión de agonistas β -adrenérgicos por la arteria testicular en perros, provoca un aumento en la concentración plasmática de T (Eik-Nes, 1969). Asimismo, la inyección sistémica del β -agonista isoproterenol, en ratas recién nacidas durante un lapso de 49 días, provoca una hipertrofia de las células de Leydig, y un aumento del peso testicular (Bergh y col., 1987). Estos resultados sugieren una estimulación catecolaminérgica mediada por receptores tipo β de la esteroidogénesis gonadal. Sin embargo, en otra serie de experimentos, la administración intravenosa, subcutánea o intra-arterial de epinefrina, actuando vía adrenoreceptores α y β , disminuyó notoriamente los niveles de T en humanos y ratas (Levin y col., 1967; Damber y Janson, 1978; Goetz y col., 1983). Las diferencias de especies y la aplicación de distintas dosis de catecolaminas, y de sus agonistas y antagonistas; podrían explicar, en parte, la disparidad de resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* previamente citados. La administración sistémica o local de altas dosis de epinefrina y norepinefrina, produce una profunda vasoconstricción de la arteria testicular en ratas, mientras que, dosis menores no producen variaciones significativas del flujo (Free y Jaffe, 1972; Damber y col., 1982). En consecuencia, las alteraciones detectadas en los niveles plasmáticos de T inducidas por catecolaminas (Levin y col., 1967; Damber y Janson, 1978) o por estrés (Bliss y col., 1972), no podrían asociarse a eventuales

cambios en el flujo sanguíneo testicular, dado que, se requirieron altas dosis de estos neurotransmisores para modificarlo.

Estudios *in vitro* han demostrado que las catecolaminas tienen un efecto estimulador sobre la producción testicular de andrógenos en células intersticiales y de Leydig provenientes de ratas, ratones y cerdos (Cooke y col., 1982; Moger y col., 1982; Moger y Murphy, 1983; Anakwe y Moger, 1984a; Anakwe y Moger, 1986; Renier y col., 1987). Sin embargo, estos investigadores señalaron que, preparaciones celulares frescas no responden a las catecolaminas; requiriéndose la permanencia de un determinado tiempo en cultivo, para adquirir la capacidad estimuladora adrenérgica sobre la producción de andrógenos. Por esta razón, algunos autores sostienen que, los resultados de los citados experimentos corresponderían a un *fenómeno del cultivo*, sin relevancia fisiológica (Mayerhofer, 1996). La co-incubación de isoproterenol y bajas concentraciones de LH, produce un efecto estimulador aditivo; en cambio, el agregado de este agonista β -adrenérgico en presencia de altas concentraciones LH, no modifica significativamente el estímulo de la gonadotropina (Anakwe y Moger, 1984a). Estos resultados permiten suponer que, la LH y el isoproterenol regularían la producción de andrógenos en cultivos de células de Leydig a través del mismo mecanismo, la formación de AMPc. El antagonista β -adrenérgico propanolol, anula el efecto estimulador de las catecolaminas sobre la esteroidogénesis gonadal (Anakwe y Moger, 1984b; Poyet y Labrie, 1983), a través de su interacción con β -receptores tipo II (Anakwe y col., 1985; Poyet y Labrie, 1987). Compuestos α -adrenérgicos tales como, clonidina y fenoxibenzamina, y el α -antagonista fentolamina, no afectan la producción gonadal de T y AMPc en cultivos primarios de células de Leydig (Anakwe y Moger, 1984a; Renier y col., 1987). En cambio, fenilefrina, un agonista de receptores α -adrenérgicos, aumenta la liberación de T basal y estimulada por la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) en preparaciones de células de Leydig purificadas en Percoll (Wanderley y col., 1989). En el hámster Dorado, Mayerhofer y col (1989c; 1992), demostraron que el estímulo catecolaminérgico sobre la producción de andrógenos en incubaciones de fragmentos testiculares,

varía según el estado funcional de la gónada. Mientras que, tanto en animales inmaduros como adultos regresionados o activos, las catecolaminas incrementan la respuesta esteroidogénica a hCG; sólo en testículos de hámsteres prepuberales y adultos involucionados, estos neurotransmisores fueron capaces de aumentar la síntesis gonadal basal de T. Así, la influencia catecolaminérgica sobre la función testicular, cobraría una significativa importancia en los períodos de ausencia o reducida secreción hipofisaria de gonadotrofinas (antes de la pubertad y en animales expuestos a FC). Por otra parte, la potenciación del efecto estimulador de hCG por catecolaminas, permite especular que estos neurotransmisores participarían en el aumento de los niveles plasmáticos de T observado en situaciones de stress agudo (Frankel y Ryan, 1981). La estimulación catecolaminérgica en la producción de T en el hámster Dorado, no modifica los niveles de AMPc (Mayerhofer y col., 1991), desconociéndose cual/es segundos mensajeros intervienen en dicha respuesta. La regulación de la esterodogénesis testicular por catecolaminas, sería mediada, en testículos inactivos, únicamente por adrenoreceptores tipo α (Mayerhofer y col., 1989c); mientras que, en hámsteres Dorados de 17 días de edad, participarían α_1 y β receptores (Mayerhofer y col., 1992). A diferencia de lo previamente descrito para el hámster Dorado; en la especie *Djungarian*, tanto los testículos de animales expuestos a FN, como los provenientes de animales adultos mantenidos en FC, son igualmente capaces de responder al estímulo catecolaminérgico sobre la producción basal e inducida por hCG de T (Mayerhofer y col., 1993). Se ha estudiado también el efecto de drogas adrenérgicas en el sector tubular. El isoproterenol estimula la aromatización de T en cultivos de células de Sertoli de ratas (Verhoeven, 1980) vía receptores tipo β_1 (Heindel y col., 1981). Sin embargo, estudios de unión con ^{125}I -pindolol, indican que preparaciones de células de Sertoli frescas, no presentan receptores β -adrenérgicos. Así, durante el cultivo de las células de Sertoli, las mismas adquirirían β -receptores respondiendo a sus agonistas correspondientes (Kierzenbaum y col., 1985). Por otra parte, Miyake y col. (1986), describieron la existencia de α -adrenoreceptores en las células mioideas de los túbulos seminíferos,

productoras de numerosos agentes paracrinicos moduladores de la actividad de las células de Sertoli (Skinner, 1991).

La participación del sistema nervioso parasimpático en el control de la actividad testicular ha sido escasamente estudiada. Kasson y col. (1985) analizando el efecto de diversas drogas colinérgicas sobre la producción de andrógenos en cultivos primarios de células testiculares provenientes de ratas adultas hipofisectomizadas; detectaron que los agonistas nicotínicos, pero no los muscarínicos, son capaces de provocar una significativa disminución en la biosíntesis de andrógenos estimulada por hCG, a través de la inhibición selectiva de la actividad 17 α -hidroxilasa.

En el testículo de humanos, rata y hámster, se ha detectado la presencia sub-capsular de mastocitos en íntima asociación con fibras nerviosas y vasos sanguíneos (Nistal y col., 1984; Mayerhofer y col., 1989b; Zhu y col., 1995). Los mastocitos producen principalmente histamina. En 1989, Mayerhoffer y col. (b), describieron, en testículos de hámsteres Dorados en regresión, que la histamina posee un efecto estimulatorio sobre la producción de progesterona y T mediado por receptores tipo H1; mientras que, en animales adultos gonadalmente activos, este neurotransmisor no modifica la síntesis y secreción androgénica. En la rata, los mastocitos testiculares contienen además, concentraciones significativas de otro neurotransmisor: la 5-HT (Aguilar y col., 1995). No obstante, existen fuentes gonadales alternativas de 5-HT en la rata, entre las cuales podemos citar a las células de Leydig (Tinajero y col., 1993a; Tinajero y col., 1993b), y una importante innervación serotoninérgica que aporta el 34% de los niveles testiculares del neurotransmisor (Campos y col., 1990b).

Las primeras evidencias de que la 5-HT podrían afectar la función testicular surgieron en los años '50 cuando se detectó que la administración exógena de dicha indolamina provocaba una notable reducción en el peso testicular (Salgado y Green, 1955). En 1962, Bocabella y col., realizaron un detallado análisis del efecto de 5-HT sobre la histología testicular, observando que la inyección diaria de 20mg/kg de 5-HT a ratas adultas inducía una caída significativa en el peso gonadal,

con lesiones importantes a nivel de los túbulos seminíferos que involucraban la pérdida de los estadios celulares más avanzados del ciclo espermatogénico, sin cambios morfológicos evidentes en el sector intersticial. Debido a que, el tratamiento simultáneo con un vasodilatador prevenía dichos cambios morfológicos, las lesiones observadas fueron atribuidas a la isquemia provocada por la 5-HT. En 1973, Liu y Kinson describieron daños semejantes en el compartimiento tubular, demostrando además, que la 5-HT destruye el tejido intersticial que rodea a los túbulos y provoca una disminución significativa en los niveles circulantes de andrógenos. Esta caída en los niveles plasmáticos de T observada luego de la administración de 5-HT, fue inicialmente atribuida a la supresión de LH y FSH (Reiter y Fraschini, 1969; Kamberi y col., 1971). Sin embargo, Kalla (1979) estableció que el tratamiento con 5-HT de ratas hipofisectomizadas suplementadas con gonadotrofinas, provoca igualmente un importante descenso de la concentración plasmática e intratesticular de T. Así, existiría una acción directa de la 5-HT sobre la producción de andrógenos, no mediada por modificaciones en las gonadotrofinas hipofisarias o en los factores liberadores hipotalámicos. Experimentos *in vitro* realizados por Vermes y col. (1979), señalan un efecto inhibitorio de la 5-HT sobre la producción de T en células intersticiales de rata, que resultaría del bloqueo de las actividades enzimáticas 17α -hidroxilasa, C17-20 liasa y 17α -reductasa (Ellis, 1972).

En 1992, Tinajero y col., establecieron que el efecto inhibitorio de la 5-HT sobre la esterodogénesis gonadal en la rata, es mediado por receptores $5-HT_2$ de alta y baja afinidad. La LH hipofisaria induce la secreción de 5-HT desde las células de Leydig mediante un mecanismo que involucra la actividad de una proteína Gs y de la enzima adenilato ciclasa productora de AMPc (Tinajero y col., 1993a). Posteriormente, este neurotransmisor efectúa una estimulación autocrina de la síntesis de CRF vía una PKC y fosfoinositoles. El CRF producido por las células de Leydig inhibe la producción de andrógenos basal y estimulada por hCG. Así, en la rata, la 5-HT participa en un ciclo autoregulatorio negativo que limita la producción de T en respuesta al estímulo gonadotrófico (Dufau y col., 1993).

Ritta y col., (1987; 1991) determinaron que GABA, con una acción netamente inhibitoria a nivel central, es capaz de estimular la producción de T en testículos enteros de rata y en células intersticiales aisladas, a través de la interacción con receptores gabaérgicos de membrana tipos A y B, los cuales coexisten en las células de Leydig (Ritta y col., 1991).

El VIP y el neuropéptido Y (NPY) son co-localizados en las fibras noradrenérgicas que inervan el testículo (Setchell, 1978; Allan y col., 1989; Rauchenwald y col., 1995). En cultivos testiculares de ratas neonatales, el péptido VIP influencia positivamente la biosíntesis de andrógenos (Kasson y col., 1986). Recientemente, Usdin y col. (1994), han clonado y caracterizado al receptor VIP tipo 2 en células de Sertoli y germinales, pero no han podido identificar sitios de unión para este neurotransmisor en células de Leydig.

Miembros de la familia de los opiodes son localmente producidos en el testículo (Ackland y col., 1992; Spiteri-Grech y Nieschlag, 1993), regulando auto/paracrinamente la producción de andrógenos en las células de Leydig (Sharpe y Cooper, 1987).

Las células de Leydig producen significativos niveles de los neuropéptidos vasopresina y oxitocina (Bartke, 1985; Nicholson y Hardy, 1992). La oxitocina estimula la producción de T en células de Leydig de rata vía receptores específicos (Sharpe y Cooper, 1987; Spiteri-Grech y Nieschlag, 1993; Bathgate y Sernia, 1994; Frayne y Nicholson, 1995); mientras que, la activación de receptores de vasopresina, inhibe la esteroidogénesis gonadal (Sharpe y Cooper, 1987; Spiteri-Grech y Nieschlag, 1993). Sin embargo, se ha observado que, la aplicación de oxitocina *in vivo* a través de implantes intratesticulares, causa una importante reducción tanto en la T plasmática como testicular (Nicholson y col., 1991).

OBJETIVOS

El propósito de este trabajo de Tesis fue contribuir en el esclarecimiento de los mecanismos que controlan, tanto a nivel central como periférico, la función reproductiva masculina. Con tal fin, el *Hámster*, un roedor fotosensible, fue seleccionado como modelo experimental para el estudio de los eventos bioquímicos asociados con el desarrollo sexual, y la influencia del fotoperíodo sobre la actividad hipotálamo-hipófiso-testicular.

Los objetivos fundamentales de las experiencias presentadas a continuación fueron los siguientes:

- I. Realizar un estudio comparativo de los aspectos endócrinos relevantes en el proceso de desarrollo sexual en dos especies de hámsteres evolutivamente emparentadas: el hámster (Syrian) Dorado (*Mesocricetus auratus*) y el hámster (Siberian) Djungarian (*Phodopus sungorus*).
- II. Efectuar un estudio detallado de los eventos endócrinos más sobresalientes en el desarrollo puberal y la transición involución-reactivación por modificaciones en el fotoperíodo, a fin de establecer homologías y diferencias entre ambos procesos.
- III. Establecer modificaciones relacionadas con la edad y el fotoperíodo, en la capacidad esteroideogénica testicular y producción gonadal *in vitro* de T, DHT y Diol en el hámster Dorado.
- IV. Realizar un estudio comparativo entre la concentración sérica de FSH e inhibina B, a fin de evaluar los mecanismos involucrados en la regulación endócrina de la adenohipófisis y el testículo durante la permanencia en fotorestricción.
- V. Evaluar el metabolismo de las PA, factores tróficos y diferenciativos, en testículo y glándulas sexuales accesorias, con el propósito de analizar los mecanismos refractarios que se ponen en juego durante la recrudescencia espontánea,

tomando a los hámsteres insensibles a la fotoinhibición, y permitiendo, en consecuencia, el restablecimiento de la función reproductiva.

VI. Analizar si, conjuntamente a la regulación neural de la actividad reproductiva ejercida desde el sistema nervioso central, existe una modulación local de la función sexual, mediada por la presencia de neurotransmisores en órganos reproductivos masculinos. A tal fin se estudió:

- la presencia de GABA en testículos de hámsteres de las especies Dorado y Djungarian a lo largo del proceso de desarrollo sexual, y modificaciones especie-específicas en sus niveles.
- la presencia de 5-HT en testículos de hámsteres Dorados en diferentes estadios del desarrollo reproductivo.
- el contenido gonadal de GABA y 5-HT en hámsteres Dorados, y modificaciones en sus niveles dependientes del fotoperíodo.
- el metabolismo testicular de GABA y 5-HT.
- la presencia de GABA en epidídimo y vesículas seminales de hámsteres Dorados durante el desarrollo sexual.
- el contenido epididimario y vesicular GABA en hámsteres Dorados, y modificaciones en sus niveles relacionadas con la información fótica.
- el origen endógeno de GABA en epidídimos y vesículas seminales del hámster.
- el rol de GABA, 5-HT y CRF sobre la producción *in vitro* de T, DHT y Diol, en condiciones basales y en respuesta al estímulo de hCG.
- el mecanismo de acción de 5-HT en la regulación de la producción de andrógenos testiculares.

MATERIALES Y METODOS

1. DROGAS Y REACTIVOS

Los compuestos radiactivos [1,2-³H]-testosterona (actividad específica (AE): 60 Ci/mmol), [1,2-³H]-5 α -dihidrotestosterona (AE:50.6 Ci/mmol), [1,2-³H]-5 α -androstano-3 α ,17 β -diol (AE:25.4 Ci/mmol), [1-¹⁴C]-L-ornitina (AE: 57.20 mCi/mmol), [methylene-³H(N)]-muscimol (AE:17.30 Ci/mmol), L-(I¹⁴C)-ácido glutámico (AE:45 mCi/mmol) y el ¹²⁵INa (AE:17.4 Ci/g), fueron adquiridos a New England Nuclear Co (Boston, MA,USA).

Los esteroides no radiactivos (T, DHT y Diol); clorhidrato de Put, Esd y Esp, y sus derivados acetilados; L-ornitina; fosfato de piridoxal; ditioneitol (DTT); y todos los reactivos empleados en la preparación de los diferentes Medios y soluciones, fueron obtenidos en Sigma Chemical Co. (St. Louis,Mo, USA) o Mallinckrodt (New York, USA).

Los solventes utilizados fueron provistos por Merck, Mallinckrodt o Sintorgan (grado analítico).

Las preparaciones de referencia y anticuerpos utilizados en la determinación de los niveles circulantes de FSH y LH, fueron adquiridos a NIADDK (Bethesda, Maryland, USA). La determinación de la concentración sérica de PRL se realizó con una preparación de referencia y un anticuerpo específico de hámster provistos gentilmente por el Dr. A.F. Parlow (Pituitary Hormones and Antisera Center, California, USA) y el Dr. F. Talamantes (School of Medicine, Southern Illinois University, Carbondale, USA), respectivamente.

Los anticuerpos empleados en la determinación de los niveles de T, DHT y Diol presentes en el suero, tejidos y en el Medio de incubación de los ensayos *in vitro*, fueron obtenidos en Medicorp Sciences Inc. (Montreal, Canadá).

Los kits empleados en la determinación de colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y triglicéridos; y el kit utilizado en la medición de los niveles intratisulares de Glut, fueron adquiridos a Boehringer Mannheim GMBH, Biochemica (Alemania).

La preparación de referencia empleada en la determinación de inhibina B, y los anticuerpos monoclonales específicos de las sub-unidades α y β -B (anticuerpos R1 y C5, respectivamente), fueron provistos gentilmente por N. Groome (Oxford, UK). El kit amplificador utilizado en la determinación de inhibina B, se adquirió en GIBCO.

Las placas cromatográficas de sílica gel 60 empleadas para la separación de PA provienen de Merck (Darmstadt, Alemania).

El hidróxido de hiamina utilizado en el ensayo de la actividad ODC, se adquirió a Packard Instruments Co. Inc. (Downers Grove, ILL, USA).

Las preparaciones de células intersticiales se obtuvieron utilizando colagenasa tipo I provista por Worthington Biochemical (Freehold, NY, USA). La hCG/APL fue obtenida de Laboratorios Ayerst (Princeton, NJ, USA).

La preparación de referencia y el anticuerpo específico utilizado en la evaluación del rol ejercido por CRF sobre la producción de T *in vitro* en preparaciones de células intersticiales de hámsteres, fueron cedidos gentilmente por el Dr. E. Spinedi (Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, IMBICE-CONICET, La Plata).

2. ANIMALES

Se utilizaron hámsteres machos de la especie (Syrian) Dorado (*Mesocricetus auratus*) provenientes del Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (Buenos Aires, Argentina) y del Laboratorio de Charles River (Wilmington, MA, USA); y hámsteres machos de la especie (Siberian) Djungarian (*Phodopus sungorus*) obtenidos de la Universidad de Southern Illinois (Carbondale, ILL, USA).

Los animales fueron mantenidos a temperatura constante de 20-25°C, recibiendo una dieta balanceada y agua *ad libitum*.

3. TRATAMIENTO

3.1. EN EL ESTUDIO DEL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL

Hámsteres machos de las especies Dorado y Djungarian, de 23, 30, 36, 46, 60 y 90 días de edad, fueron mantenidos en condiciones estándar de luminosidad (16hs.luz/8hs.oscuridad). Entre las 8.00 y 9.00 hs., los animales fueron anestesiados con éter, la sangre obtenida por punción cardíaca, y finalmente decapitados. Posteriormente, la sangre fue centrifugada a $1200 \times g$ durante 10 minutos, y el suero fraccionado en alícuotas y almacenado a -20°C hasta la determinación de gonadotrofinas y andrógenos. Los grupos de hámsteres empleados en la determinación de los niveles tisulares de GABA, dos minutos previos a la decapitación, fueron inyectados intra-peritonealmente con 1.2 mmol/kg de peso corporal de ácido 3-mercaptopropiónico (MPA). Este paso previo a la decapitación es fundamental para evitar el aumento de GABA post-mórtem, ya que la anoxia induce una activación de la GAD (enzima de síntesis) y una inhibición en la GABA-T (enzima de catabolismo). La resultante de estos dos fenómenos es el incremento descontrolado en los niveles endógenos de GABA en el momento de sacrificar al animal.

A todas las edades se determinó el peso corporal. Como consecuencia de la pequeña cantidad de sangre colectada por animal cuando se trabajó con los diferentes grupos experimentales de hámsteres de la especie Djungarian, y con hámsteres Dorados prepuberales, fue necesario realizar pooles (n:2-4 animales), para la determinación de la concentración sérica de LH, FSH, T, DHT y Diol. El número de muestras analizadas por edad osciló entre 5 y 8.

Los órganos sexuales (testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata) fueron inmediatamente extirpados, colocados sobre hielo, disecados, liberados de materia grasa y pesados. El peso relativo fue obtenido calculando el peso del órgano (en g) que correspondería a 100 g de peso corporal. El volúmen testicular fue determinado por desplazamiento de agua según el método establecido por Steer

(1981). El peso testicular específico fue obtenido dividiendo el peso testicular (en g) por el volumen del órgano (en cm^3) (Ghosh y col., 1992).

Finalmente los tejidos fueron almacenados en viales de plástico a -20°C hasta la determinación de los niveles tisulares de 5-HT, 5-HIAA, GABA y Glut.

Durante la determinación de la producción de andrógenos *in vitro*, se utilizaron testículos de hámsteres sin congelar.

3.2. EN EL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LA FUNCION REPRODUCTIVA

Se utilizaron hámsteres Dorados machos adultos de aproximadamente 90-100 días de edad, mantenidos en FN (14hs.luz/10hs.oscuridad) o FC (6hs.luz/18hs.oscuridad) durante 9, 12, 14, 16, 18 y 22 semanas. Entre las 8.00 y 9.00 hs, los animales fueron sacrificados por decapitación, la sangre troncal recolectada, centrifugada a $1200 \times g$ durante 10 minutos, y finalmente el suero separado y almacenado a -20°C hasta su utilización en la determinación sérica de colesterol total, HDL, triglicéridos, LH, FSH, PRL, T, DHT, Diol e inhibina B.

Los grupos de hámsteres empleados en la determinación de los niveles tisulares de GABA, dos minutos previos a la decapitación, fueron inyectados intra-peritonealmente con 1.2 mmol/kg de peso corporal de MPA.

En el estudio del metabolismo tisular de GABA, hámsteres adultos mantenidos en FN, fueron inoculados por vía intra-peritoneal, con 35 mg de ácido amino-oxiacético/kg de peso corporal (un inhibidor de la actividad GABA-T), y decapitados a los 30 y 60 minutos.

En cada uno de los grupos se determinó el peso corporal en el momento de inicio del experimento, y luego de la permanencia en FN o FC durante 9, 12, 14, 16, 18 y 22 semanas. El crecimiento corporal relativo durante el desarrollo experimental fue inferido a través de la relación peso corporal final/ peso corporal inicial.

Luego del sacrificio de los animales, los órganos sexuales (testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata) fueron inmediatamente extirpados,

colocados sobre hielo, disecados, liberados de materia grasa y pesados. El volúmen testicular fue determinado por desplazamiento de agua, según el método establecido por Steer (1981). El peso testicular específico fue obtenido dividiendo el peso testicular (en g) por el volúmen del órgano (en cm³) (Ghosh y col., 1992).

Un testículo y epidídimo de cada animal, fueron inmersos en viales de vidrio conteniendo acetona y almacenados a -20°C para la posterior determinación de andrógenos tisulares. El resto de los tejidos fueron mantenidos en viales de plástico a -20°C hasta la determinación de la actividad ODC, y los niveles tisulares de PA, A-PA, 5-HT, 5-HIAA, GABA y Glut.

En la determinación de la actividad GAD, y en la producción de andrógenos *in vitro*, luego del sacrificio de los hámsteres, los órganos sexuales fueron rápidamente extirpados, procesados y utilizados sin congelar.

4. DETERMINACION DEL PERFIL SERICO

4.1.LIPIDOS EN SUERO

Las concentraciones en suero de colesterol total, triglicéridos y HDL, fueron evaluadas mediante el empleo de técnicas enzimático-colorimétricas utilizando kits comerciales.

Para la determinación de colesterol total y triglicéridos se emplearon alícuotas de 10µl de muestra, a las cuales se agregó 1 ml de la solución reactiva correspondiente.

La solución reactiva utilizada en la determinación de los niveles circulantes de colesterol total consistió en buffer Tris-hidroximetil aminometano (Tris) 100 mM a un pH de 7.7, aspartato de magnesio 50mM, 4-aminofenazona 1mM, colato sódico 10mM, fenol 6mM, 3,4 diclorofenol 4mM, éter poliglicólico de alcohol graso 0.3%, colesterol esterasa 0.4 UI/ml, colesterol oxidasa 0.25 UI/ml y peroxidasa 0.2 UI/ml.

La solución reactiva empleada en la determinación de triglicéridos séricos contiene buffer Tris 0.15M a un pH de 7.6, sulfato de magnesio 17.5mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sal sódica 10mM, 4-clorofenol 3.5mM, colato sódico 0.15%, ferrocianuro potásico 6.5mM, éter poliglicólico de alcohol graso 0.12%, adenosina trifosfato (ATP) 0.5mM, 4-aminofenazona 0.35mM, lipasa 3UI/ml, glicerol-fosfato-oxidasa 2.5 UI/ml, gliceroquinasa 0.2UI/ml y peroxidasa 0.15UI/ml.

El blanco de reacción consistió en 10 μ l de H₂O destilada en 1 ml de la solución reactiva. La determinación de colesterol total se realizó empleando 10 μ l de un estándar de concentración 5.2 mmol/l; mientras que, la concentración de triglicéridos, fue calculada a partir de un factor de referencia obtenido de una tabla de valores adjunta al kit.

Luego de 10 minutos de incubación a 20-25°C, se efectuó la determinación espectrofotométrica de colesterol total y triglicéridos a una longitud de onda de 500nm.

El límite de detección fue, para ambas técnicas, de 0.1 mg/tubo. Los resultados se expresan en mg/dl de suero.

La concentración sérica de HDL fue calculada utilizando la técnica enzimático-colorimétrica descrita para colesterol total, previo aislamiento de la fracción HDL de las lipoproteínas. Para ello, a 100 μ l de suero se agregó 250 μ l de una dilución 4:1 vol/vol en H₂O destilada del reactivo precipitante conteniendo ácido fosfotúngstico 0.55mM y cloruro de magnesio 25mM. Dicha mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y luego se centrifugó a 1600 x g durante 10 minutos. Posteriormente a 100 μ l del sobrenadante obtenido, se agregó 1 ml de la solución reactiva empleada en la determinación de colesterol total. El blanco de reacción consistió en 100 μ l de H₂O destilada. La determinación se efectuó utilizando 10 μ l de un estándar de concentración 5.2 mM. Luego de 10 minutos de incubación a 20-25°C, se realizó la medición espectrofotométrica a 500 nm. El límite de sensibilidad del ensayo fue de 0.1 mg/tubo. Los resultados se expresan en mg/dl de suero.

4.2. HORMONAS PROTEICAS

Las concentraciones séricas LH y FSH, fueron determinadas a través de un radioinmunoanálisis (RIA) heterólogo utilizando la técnica de doble anticuerpo validada en hámster por Chandrashekar y col. (1987).

La determinación de gonadotrofinas se realizó utilizando alícuotas de 200 μ l de suero por duplicado, empleando NIDDK-rLH-RP3 y NIDDK-rFSH-RP2 como preparaciones de referencia; y anti-rLH-S10 y anti-rFSH-S11 como anticuerpos específicos. Las muestras fueron incubadas con el primer anticuerpo a 4°C durante 24hs. Posteriormente se agregó el trazador radiactivo y se incubó otras 48hs. a 4°C. Dicha incubación se detuvo por el agregado del segundo anticuerpo y polietilenglicol (PEG) al 8%. La hormona libre se separó por centrifugación a 1600 x g durante 30 minutos y aspiración de los sobrenadantes. La radiactividad de los precipitados fue determinada en un contador γ .

La concentración sérica de PRL se determinó por un RIA homólogo de doble anticuerpo descrito previamente por Soares y col. (1983), usando como preparación de referencia el estándar AFP-10302E, y un anticuerpo anti-PRL específico de hámster. Se utilizaron alícuotas de 20 μ l por duplicado para los sueros provenientes de hámsteres expuestos a FN, y alícuotas de 200 μ l por duplicado para los sueros de hámsteres mantenidos en FC. La incubación con el primer anticuerpo se realizó a temperatura ambiente durante 24hs. Luego se agregó la hormona marcada y se incubó otras 24hs. a temperatura ambiente. La incubación se detuvo por el agregado de segundo anticuerpo y PEG al 8%. La hormona libre se separó centrifugando a 1600 x g durante 30 min y aspirando los sobrenadantes. Por último, se determinó la radiactividad de los precipitados en un contador γ .

La iodinación de las tres hormonas proteicas se realizó siguiendo el método de cloramina T y posterior purificación, a través de una columna de poliacrilamida-agarosa ACA 44, Ultrogel (Charreau y col., 1977).

La sensibilidad de los ensayos resultó ser 60, 10 y 30 pg/tubo, para FSH, LH y PRL respectivamente.

Todas las muestras fueron procesadas, por duplicado, en el mismo experimento, a fin de evitar la variación inter-ensayo. El coeficiente de variación intra-ensayo fue menor al 4.0% para FSH y LH, y menor al 6.0% para PRL.

Los resultados son expresados en ng/ml de suero respecto de los estándares específicos empleados.

4.3. ANDRÓGENOS

4.3.1. Extracción de andrógenos

Alícuotas de aproximadamente 200-600 μ l de suero se extrajeron, 2 veces consecutivas, con 2 ml de éter dietílico. La fase acuosa fue descartada, y los extractos etéreos evaporados a sequedad bajo nitrógeno gaseoso. Posteriormente los residuos se resuspendieron, en relación 1:3 vol suero/vol resuspensión, en buffer RIA a pH 7.4 conteniendo HNa_2PO_4 40mM, H_2NaPO_4 35 mM, NaCl 0.15 M, gelatina 0.1% y azida sódica 0.1%.

4.3.2. Determinación de andrógenos

La determinación de la concentración sérica de T, DHT y Diol, se realizó por RIA según el método validado en el Laboratorio por Suescun y col. (1985), utilizando una suspensión de carbón-dextrano (0.5%-0.05%) a fin de separar el esteroide libre del complejo hormona-anticuerpo. En la determinación de DHT y Diol, se emplearon los anticuerpos DHT-1-CMO-BSA y Diol-15-CMO-BSA altamente específicos. En la medición de la T circulante, se utilizó un anticuerpo T-7 α -butirato-BSA, que presenta una reacción cruzada del 35% con DHT.

El límite inferior de detección del ensayo fue de 12.5 pg/tubo. El coeficiente de variación inter-ensayo fue menor al 15% para los tres esteroides; mientras que, el coeficiente de variación intra-ensayo fue menor al 12% para T y DHT, y menor al 15% para Diol. Los resultados son expresados en ng/ml de suero.

4.4. INHIBINA B

La concentración sérica de inhibina B fue determinada en colaboración con la Dra. S. Campo (Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CEDIE-CONICET), a través del método de enzimoimmunoanálisis (ELISA) *tipo sandwich* en fase sólida, que emplea anticuerpos monoclonales específicos de las sub-unidades α y β -B (anticuerpos R1 y C5, respectivamente), según ha sido previamente descripto por Groome y O'Brien (1993).

El primer paso consistió en la adsorción del anticuerpo C5 a las placas a utilizar en el ensayo. Para ello, se agregaron 50 μ l del citado anticuerpo en cada pocillo, y se incubó a temperatura ambiente toda la noche. Al día siguiente, se aspiró la solución remanente, y se agregaron 100 μ l de una preparación bloqueante 1% (peso/vol) de albúmina sérica bovina (BSA) en buffer fosfato salino (PBS). Después de 2 hs. a temperatura ambiente, se lavaron las placas, y se agregó, en cada pocillo, 100 μ l de muestra o solución de referencia.

Las placas fueron incubadas en presencia de las muestras y la preparación de referencia durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación constante.

En la construcción de la curva estándar se utilizó inhibina B humana (Genentech).

Las muestras séricas provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en FN o expuestos a FC entre 9 y 22 semanas, fueron pretratadas por dilución con 50 μ l de una solución 6% de dodecil sulfato de sodio (SDS), y hervidas a 100 °C durante 3 minutos. Posteriormente se agregaron 50 μ l de una solución 6% de peróxido de hidrógeno, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Este

pretratamiento de las muestras modifica, por oxidación, los residuos de metionina en la molécula de inhibina B, aumentando la afinidad del epítopo por el anticuerpo.

Al día siguiente se lavaron las placas, y se agregó, a cada pocillo, 50 µl de la solución de anticuerpo R1 acoplado a la enzima fosfatasa alcalina. Luego de 1 h. de incubación a temperatura ambiente con agitación constante, las placas fueron lavadas durante 15 minutos empleando H₂O bidestilada. Posteriormente, se incubó a 37°C durante 2 hs, en presencia de 50 µl del sustrato enzimático. Una alícuota de 50 µl de un kit amplificador (GIBCO), fue agregada en cada pocillo de la placa, y luego de 15 minutos a temperatura ambiente, se observó el desarrollo de color. Cuando el cero analítico comenzó a presentar tonalidad rojiza, la reacción fue detenida a través del agregado de 50 µl de HCl 0.4M. Las absorbancias fueron determinadas en un lector de ELISA a 490nm, con una longitud de onda de referencia de 620 nm.

La sensibilidad del método fue de 3.9 pg/ml.

Los resultados son expresados como ng/ml.

5. DETERMINACION DEL PERFIL DE ANDROGENOS TISULARES

5.1. Extracción de andrógenos

Con el fin de eliminar posibles interferencias durante la determinación de la concentración tisular de T, DHT y Diol, se procedió inicialmente a la extracción de los andrógenos con solventes orgánicos. Las muestras se homogeneizaron en acetona en relación 1:10 (peso/vol) en un homogeneizador Ultraturax; y las suspensiones resultantes, se centrifugaron a 1600 x g durante 10 minutos. Los sobrenadantes se trasvasaron a tubos cónicos y, para evaluar las pérdidas sufridas en el procesamiento, se agregó a cada muestra 1700 dpm de esteroide radiactivo como estándar interno. Los sobrenadantes se evaporaron a sequedad, se resuspendieron en 1 ml de H₂O destilada, se colocaron en un baño de agua a 50°C durante 10 minutos y se agitaron vigorosamente durante 1 minuto. Las suspensiones fueron

extraídas 2 veces con 2.5 ml de éter dietílico (1:2.5, vol/vol) y agitadas durante 2 minutos. Las fracciones etéreas fueron separadas por congelación, evaporadas a sequedad y resuspendidas en 1.4 ml de metanol. Luego de 1 minuto de agitación, se agregó 0.6 ml de H₂O destilada y se agitó nuevamente por otro minuto. Para eliminar interferencias de lípidos en los tejidos, se realizó una nueva partición con 2 ml de n-hexano, se agitó durante 2 minutos y luego se descartó la fase superior. Finalmente, se agregó a cada tubo 6 ml de diclorometano, agitando las suspensiones durante 2 minutos y descartando la fase superior acuosa. Se evaporó a sequedad la fase inferior, y los residuos fueron resuspendidos en 1 ml de buffer RIA. La recuperación fue de un 70-80%.

5.2. Determinación de andrógenos

La concentración intra-testicular e intra-epididimaria de T, DHT y Diol, se determinó por el método validado en el Laboratorio según Suescun y col. (1985), como fue previamente descrito en la sección 4.3.2. de Materiales y Métodos.

Los resultados son expresados en ng/g de tejido, ng/mg de proteínas, ng/mg de ADN y ng/órgano.

6. ANALISIS DEL METABOLISMO TISULAR DE LAS POLIAMINAS

6.1 DETERMINACION DE LOS NIVELES DE POLIAMINAS

Los niveles de Put, Esd y Esp se determinaron en base a la técnica descrita por Seiler (1983), y validada en el Laboratorio según Gonzalez y col. (1991). Este método se basa en la formación de los derivados dansilados didansilputrescina, tridansilespermidina y tetradansilespermina, que posteriormente son separados por cromatografía en placa delgada.

Los tejidos se cortaron en pequeños trozos y se agregó ácido perclórico (PCA) 0.2 N en relación 1:1 (peso/vol) y 1:3 (peso/vol) para testículos provenientes de hámsteres expuestos a FN y FC, respectivamente; y en relación 1:3 (peso/vol) y 1:7 (peso/vol) para las vesículas seminales de hámsteres en FN y FC, respectivamente. Las mezclas fueron homogeneizadas en un homogeneizador Ultraturrax, e incubadas durante 2 hs. entre 0 y 5°C para facilitar la floculación del precipitado. Luego, los homogenatos fueron centrifugados a 20000 x g durante 30 minutos, y alícuotas de 100µl del sobrenadante de las muestras se alcalinizaron con 100µl de Na₂CO₃ (solución saturada), a fin de favorecer la formación de especies no protonadas en los grupos aminos, de mayor reactividad. Posteriormente, se agregaron a las mezclas 200µl de cloruro de dansilo (20 mg/ml de acetona), se agitaron vigorosamente hasta obtener una sola fase líquida e incubaron toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad. Paralelamente se dansiló una mezcla de estándares de Put, Esd y Esp que contenía 10 nmoles de cada compuesto. El blanco de reacción se determinó usando 100µl de PCA 0.2N.

Previamente a su utilización, el cloruro de dansilo fue resuspendido en tolueno (grado espectrofotométrico), y purificado a través del pasaje por una columna de sílica gel 60, con posterior evaporación en nitrógeno gaseoso.

Al día siguiente, se agregaron 50µl de prolina (100 mg/ml de H₂O destilada) a cada muestra, con el propósito de eliminar el exceso de cloruro de dansilo de la mezcla de reacción, y se incubó durante 60 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, las muestras fueron evaporadas bajo nitrógeno a 35-40°C hasta un volumen de 100 µl, con el fin de eliminar las trazas de acetona que podrían interferir en el posterior paso de extracción. A continuación, se agregaron 100µl de H₂O destilada y 200µl de tolueno, con el objeto de lograr la extracción selectiva de los derivados dansilados solubles en este solvente, permaneciendo en la fase acuosa los productos hidrolizados del cloruro de dansilo no reaccionante. Los extractos orgánicos fueron posteriormente separados por centrifugación a 800 x g a temperatura ambiente y subsiguiente congelamiento a -70°C de la fase acuosa.

Alícuotas de 50 μ l del blanco de reacción y de 40 μ l de las muestras, fueron sembradas en placa de sílica gel de 0.2mm de espesor previamente activadas por desecación a 110°C durante 1 h. Conjuntamente, se sembraron 0.25, 0.5, 1 y 2 nmoles de la mezcla estándar de PA, con el fin de construir una curva de calibración.

Se realizó una cromatografía ascendente unidimensional en oscuridad que consistió en una corrida en cloroformo:trietilamina (9:1 vol/vol). Luego las placas se vaporizaron con una mezcla de isopropanol:trietanolamina (4:1 vol/vol) para estabilizar la fluorescencia de los derivados dansilados. Posteriormente, se identificaron las bandas por irradiación con luz UV con una longitud de onda de 360 nm. La relación de frentes (Rf) obtenidos para compuesto fueron los siguientes: Put:0.55, Esd:0.75 y Esp:0.86. Estas bandas correspondientes a las PA dansiladas fueron extraídas de las placas y eluídas con 1 ml de benceno:trietilamina (95:5 vol/vol) previamente desgaseado. Las muestras fueron centrifugadas a 800 x g con el objeto de precipitar las partículas de sílica. Finalmente, se determinó la fluorescencia de los sobrenadantes en un espectrofluorómetro por excitación a 350nm y emisión a 490nm.

La sensibilidad del método fue de 0.25 nmol de PA en 500 μ l.

Los resultados son expresados como nmol/g de tejido, nmol/mg de proteínas, nmol/mg de ADN y nmol/órgano.

Las PA totales fueron calculadas como la suma de Put, Esd y Esp.

6.2. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE ACETIL POLIAMINAS

Los niveles tisulares de Aput, N¹A-esd, N⁸A-esd y N¹-acetilespermina, se determinaron según de las Heras y col. (1992), basándose en la metodología utilizada para PA con algunas modificaciones que permiten una mejor separación y concentración de estos compuestos, que habitualmente se hallan en pequeñas cantidades en los tejidos.

Para la realización de la curva estándar se preparó una solución conteniendo 10 nmoles de A-put, N¹A-esd, N⁸A-esd y N¹A-esp a partir de soluciones 1mM en ácido acético de las mismas.

La preparación de las muestras de tejidos y mezclas de reacción, y la extracción de los derivados dansilados fueron realizadas según el procedimiento descritos previamente para PA en la sección 6.1. de Materiales y Métodos. En placas de sílica gel previamente activadas por desecación, se sembraron alícuotas de 40µl de las muestras obtenidas y 50µl del blanco de reacción. Conjuntamente se sembraron 0.25, 0.5, 1 y 2 nmoles de la mezcla estándar de A-PA. Para eliminar la interferencia de las PA, se efectuaron dos corridas en acetato de etilo, y se separaron los acetil derivados por una tercera corrida en cloroformo-tetracloruro de carbono-metanol (14:6:1, vol/vol). Posteriormente, las placas fueron vaporizadas con una solución de isopropanol-trietanolamina (4:1, vol/vol). Las bandas correspondientes a los acetil derivados dansilados, fueron identificadas por irradiación con luz UV a una longitud de onda de 360 nm. Los R_f obtenidos para cada compuesto fueron los siguientes: A-put: 0.21, N¹A-esd: 0.33, N⁸A-esd: 0.30, y N¹A-esp: 0.45. Las eluciones de las bandas se realizaron en 0.5 ml de benceno-trietilamina (95:5, vol/vol), previamente desgaseada. Se determinó la fluorescencia de los sobrenadantes en un espectrofluorómetro por excitación a 350 nm y emisión a 490nm.

La sensibilidad del método fue de 0.25 nmol de A-PA en 500 µl.

Los resultados son expresados como nmol/g de tejido, nmol/mg de proteínas, nmol/mg de ADN y nmol/órgano.

Las A-PA totales fueron calculadas como la suma de A-put, N¹A-esd, N⁸A-esd y N¹A-esp.

6.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ORNITINA DECARBOXILASA

La actividad ODC se determinó de acuerdo al método descrito por Pegg y col. (1970), y validado en el Laboratorio según de las Heras y Calandra (1987), que

consiste en medir la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -ornitina. El $^{14}\text{CO}_2$ producido en la reacción es captado por una base cuaternaria en solución alcohólica.

Los tejidos provenientes de testículos y vesículas seminales de hámsteres expuestos a FN o FC, fueron cortados en trozos y homogeneizados con un homogeneizador Ultraturax en un buffer consistente en Tris 10mM, EDTA 1.5 mM, sacarosa 0.25 M, MgCl 1mM, β -mercaptoetanol 2mM y azida sódica 0,2% (Buffer A; pH: 7.4), en una relación de 1:2 (peso/vol). Los homogenatos fueron luego centrifugados a 20000 x g durante 30 minutos. Alícuotas de 100 μ l de los sobrenadantes se agregaron a 100 μ l de un buffer de reacción (Tris 80mM, fosfato de piridoxal 0.4mM, DTT 9mM, L-ornitina 2mM y 0.2 μ Ci de ^{14}C -ornitina, pH:7.2).

La L-ornitina utilizada fue previamente purificada en dos etapas, por evaporación y redisolución en HCl 0.1N y 0.01N, respectivamente.

Las incubaciones se realizaron durante 60 minutos a 34°C en frascos de vidrio de 10 ml cerrados con tapas de goma de las cuales penden recipientes plásticos conteniendo 120 μ l de hidróxido de hiamina 1M en metanol.

La reacción se detuvo inyectando a cada frasco 500 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 40%. Las incubaciones se prolongaron durante 30 minutos a 34°C. Paralelamente se determinaron dos blancos de reacción utilizando 100 μ l de buffer A. Al finalizar las incubaciones los recipientes plásticos conteniendo el $^{14}\text{CO}_2$ liberado a partir de la ^{14}C -ornitina que fue captado por el hidróxido de hiamina, se sumergieron en 3 ml de tolueno centelleante conteniendo 0.4% de 2,5-difenil-oxazol (PPO) y 0.004% de (1,4-bis[5-fenil-2-oxazolil] benzeno; 2,2'-p-fenileno-bis [5-feniloxazol]) (POPOP); y se determinó la radiactividad en un contador de centelleo líquido.

Con el fin de calcular la actividad específica de la L-ornitina, se prepararon dos soluciones estándar consistentes en 10 μ l del buffer de reacción y 120 μ l de hidróxido de hiamina 1M en metanol.

Los resultados se expresan en pmol de $^{14}\text{CO}_2$ liberados/ h/mg de proteínas, pmol de $^{14}\text{CO}_2$ liberados/ h/g de tejido, pmol de $^{14}\text{CO}_2$ liberados/ h/mg de ADN y pmol de $^{14}\text{CO}_2$ liberados/ h/órgano.

7. ANALISIS DEL METABOLISMO TISULAR DE NEUROTRANSMISORES

7.1. GABA

7.1.1. Preparación de membranas portadoras de receptores gabaérgicos

El método empleado en la determinación de los niveles tisulares de GABA, requiere la preparación previa de una fracción de membranas conteniendo receptores específicos de este neurotransmisor (Ritta y col., 1987). Para ello, aproximadamente 40-50 cerebelos provenientes de ratas adultas (6-8 g de tejido) fueron homogeneizados en sacarosa 0.32M en una relación 1:15 peso/vol, centrifugados 2 veces a 4000 x g durante 10 minutos a 4°C; y una vez a 20000 x g durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se descartaron los sobrenadantes, los precipitados fueron suavemente resuspendidos en H₂O destilada fría en relación 1:30 peso/vol, y centrifugados a 9000 x g durante 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron recogidos junto con la fina capa de membranas localizada sobre el pellet, y centrifugados a 40000 x g durante 25 minutos a 4°C. Por último, los sobrenadantes fueron descartados y el pellet congelado a -20°C toda la noche.

Al día siguiente, el precipitado fue descongelado, resuspendido en relación 1:15 peso/vol en buffer Tris-citrato (Tris 0.1M, Ac. Cítrico 0.2M, pH: 7.2) conteniendo Tritón X-100 0.05%, incubado a 37°C durante 30 minutos, y luego centrifugado a 40000 x g durante 25 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron descartados y el pellet lavado dos veces por centrifugación a 40000 x g durante 25 minutos a 4°C en buffer Tris-citrato, con el objeto de eliminar las trazas de detergente. Finalmente, el precipitado que constituye la fracción de membranas con receptores GABA, fue resuspendido en buffer Tris-citrato en una relación de 40mg de proteínas/10 ml de buffer, fraccionado y almacenado a -70°C.

7.1.2. Determinación de los niveles tisulares de GABA

Los niveles tisulares de GABA fueron determinados por el método de radioreceptor validado según Ritta y col. (1987). Los tejidos fueron homogeneizados en H₂O destilada en una relación de 1:40 (peso/vol) para testículos, y de 1:20 (peso/vol) para epidídimos y vesículas seminales. Posteriormente, a 100µl de estos homogenatos se les agregó 700µl de buffer Tris-citrato. La capacidad total de unión fue calculada usando 800µl de buffer. Se preparó una curva de calibración por agregado a los tubos de 100µl de soluciones de 0.125pM, 0.25pM, 0.5pM, 1pM, 2pM y 4pM de GABA no radiactivo. La unión inespecífica fue calculada en tubos que contenían 100µl de una solución 1000 µM de GABA.

Posteriormente, se agregaron 260000 dpm de ³H-Muscimol (agonista de receptores GABA_A) y 100 µl de la preparación de membranas obtenida según el procedimiento descrito en la sección 7.1.1. de Materiales y Métodos, previamente sonicada. Se incubó durante 10 minutos a 22°C y se centrifugó a 20000 x g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron aspirados, resuspendidos en 1 ml de buffer Tris-citrato, y nuevamente centrifugados a 20000 x g durante 10 minutos a 4°C. Finalmente se descartaron los sobrenadantes, los precipitados fueron resuspendidos en 100µl de Protosol, e incubados a temperatura ambiente toda la noche.

Al día siguiente, se agregó a las muestras 3 ml de una mezcla de tolueno centellante-Tritón X100 en relación 3:1 vol/vol, y se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo Líquido.

El límite inferior de detección del ensayo fue de 1.29 ng de GABA/tubo.

Los resultados son expresados como nmol/g de tejido, nmol/mg de proteínas, nmol/mg de ADN o nmol/órgano.

7.1.3. Análisis de la biosíntesis tisular de GABA

7.1.3.1. Determinación de los niveles tisulares de ácido glutámico

Los niveles de Glut en testículos, epidídimos y vesículas seminales, fueron determinados a través de un ensayo colorimétrico utilizando un Kit comercial basado en la conversión dependiente NAD^+/NADH , según el método descrito por Agrawal y Vahna-Perttula (1988).

A tal fin, los tejidos fueron homogeneizados en agua destilada con un homogeneizador Ultraturrax, en relación 1:5 peso/vol. A 200 μl de estos homogenatos se les agregó 1.8 ml de agua destilada y 1 ml de una solución reactiva de buffer fosfato de potasio/trietanolamina (pH:8.6) conteniendo Tritón X100, 110 mUI/ml de una diaforasa de corazón de cerdo, 0.78 mg/ml de NAD^+ y cloruro de iodonitro tetrazolio (INT) al 0.9%. Los tubos fueron agitados, y después de 2 minutos, se determinaron las absorbancias en espectrofotómetro a 492 nm (A_1).

Para el blanco de reacción se utilizó 2 ml de agua destilada.

La reacción se inició con el agregado de 30 μl de una solución de glutamato dehidrogenasa de 900UI/ml. A los 15 minutos, se leyeron nuevamente las absorbancias a 492 nm (A_2).

A fin de evitar posibles interferencias por agentes reductores presentes en las muestras, se calculó el cambio de absorbancias en 15 minutos según la relación $\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{muestras}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}}$.

La concentración de Glut de las muestras fue calculada empleando un estándar de concentración 0.071g/l, a través de la fórmula:

$$\text{Concentración de la muestra} = \Delta A_{\text{muestra}} \times \text{concentración del estándar} / \Delta A_{\text{estándar}}$$

Debido a que la solución de INT es sensible a la luz, todos los tubos usados en el ensayo fueron recubiertos con papel de aluminio, y se trabajó con baja luminosidad ambiental.

El límite de detección del ensayo fue de 1 μg /tubo.

Los resultados son expresados en $\mu\text{mol/g}$ de tejido, $\mu\text{mol/mg}$ de proteínas, $\mu\text{mol/mg}$ de ADN y $\mu\text{mol/órgano}$.

7.1.3.2. Actividad glutamato decarboxilasa

La actividad GAD fue analizada según el método de Sims y Pitts (1970) con ciertas modificaciones (Balerio y col., 1994).

Tejidos *frescos* fueron homogeneizados en un homogeneizador Ultraturrax, y alícuotas de 100 μl de cada homogenato fueron incubadas en presencia de buffer fosfato de potasio 50 mmol/l (pH=6.4); 2-mercaptoetanol 20 mmol/l; fosfato de piridoxal 0.20 mmol/l, L-(^{14}C) Glut 100 mmol/l y Tritón X100 0,16%. Las incubaciones se realizaron durante 60 minutos a 37°C en frascos de vidrio de 10 ml cerrados con tapas de goma, de las cuales penden recipientes plásticos conteniendo 120 μl de Protosol. El volumen final en cada vial fue de 0,5 ml.

La reacción fue detenida inyectando 500 μl de TCA al 10%. Después de 1 h de agitación continua, los viales de plástico conteniendo el $^{14}\text{CO}_2$ producido en la reacción y captado por el Protosol; fueron retirados, secados con papel absorbente y colocados en 5 ml de líquido centelleador para determinar la radiactividad asociada.

Los resultados son expresados en μmol de $^{14}\text{CO}_2$ liberados/h/g de proteínas, μmol de $^{14}\text{CO}_2$ liberados/h/g de tejido, μmol de $^{14}\text{CO}_2$ liberados/h/mg de ADN y μmol de $^{14}\text{CO}_2$ liberados/h/órgano.

7.1.3.3. Determinación de los niveles tisulares de putrescina

Los niveles tisulares de Put, se determinaron según la técnica descrita por Seiler (1983), y validada en el Laboratorio según Gonzalez y col. (1991); como ha sido previamente detallado en la sección 6.1. de Materiales y Métodos.

7.1.4. Efecto del ácido amino-oxiacético sobre los niveles tisulares de GABA

El metabolismo *in vivo* de GABA en testículos de hámsteres adultos expuestos a FN, fue analizado según Caron y col. (1988), mediante la inyección intra-peritoneal de 35 mg de ácido amino-oxiacético/kg de peso corporal, posterior sacrificio de los animales a los 30 y 60 minutos post-administración de este inhibidor de la actividad GABA-T, y determinación de los niveles tisulares de GABA según la técnica previamente descripta en la sección 7.1.2. de Materiales y Métodos.

7.2. SEROTONINA

7.2.1. Determinación de los niveles testiculares de serotonina y 5-hidroxi-indol acético

La concentración y el contenido de 5-HT y 5-HIAA (principal metabolito en el catabolismo de 5-HT), fueron determinados en colaboración con el Prof. Dr. M. Rubio (Instituto de Investigaciones Farmacológicas, ININFA-CONICET, UBA), empleando la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), según el método previamente descripto por Reinhard y Roth (1982).

En el ensayo se empleó un equipo Varian 5000 Liquid Chromatograph que presenta un loop de cargado de muestra de 50 µl, una columna C18-fase reversa de 12.5cm de largo, diámetro interior de 4mm y partículas de 5mm, y un detector electroquímico adosado al cromatógrafo.

Previamente a la determinación de los niveles de 5-HT y 5-HIAA, la columna cromatográfica fue lavada con metanol durante 20 minutos, y saturada durante 10 minutos con la fase móvil de buffer citrato/ Na_2HPO_4 conteniendo 0.15% de 1-octano ácido sulfónico y 4% de metanol.

Los testículos fueron decapsulados sobre hielo y homogeneizados mecánicamente vidrio-vidrio en ácido perclórico 0.2N conteniendo 0.01% de un

estándar interno de 5-HT metilada (10^{-3} M), en relación 1:2 peso/vol para el parénquima gonadal y 1:5 peso/vol para la cápsula. Los homogenatos fueron luego centrifugados a $12000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . A cada sobrenadante se le agregó Tris 2M (pH:8.75) en relación 7:3 v/v y una pizca de alúmina; y fueron nuevamente centrifugados a baja velocidad durante un minuto. La alúmina retiene las catecolaminas y la dihidroxifenilalanina (Dopa) permitiendo, en consecuencia, la separación de la 5-HT y el 5-HIAA que quedan en el sobrenadante. Finalmente se inyectaron $50\mu\text{l}$ de esta mezcla reactiva en el cromatógrafo.

Para la construcción de la curva estándar se utilizó una mezcla de 5-HT y 5-HIAA a diferentes concentraciones (17, 35, 70 y 140 nM).

Las condiciones de medición del aparato fueron fijadas en: rango de presión: 0-390 atm; flujo: 0.8-1.1 ml/min; voltaje: 5.0 nA, sensibilidad: 5. En dichas condiciones experimentales el tiempo de desarrollo cromatográfico fue de aproximadamente 7-10 minutos. El orden de elución de los compuestos fue el siguiente: 1^o 5-HIAA, 2^o 5-HT y último el estándar interno de 5-HT metilada.

En el análisis de los resultados se corrigieron los valores obtenidos tomando como referencia al estándar interno.

El límite de detección del ensayo fue de $0.85\text{ pmol}/50\mu\text{l}$ inyectados en el cromatógrafo.

Los resultados son expresados como pmol/g de tejido, pmol/mg de proteínas y pmol/parénquima o cápsula testicular de 5-HT y 5-HIAA.

La relación 5-HIAA/5-HT que permite inferir la velocidad de metabolización del neurotransmisor, fue calculada dividiendo los niveles testiculares del catabolito por los niveles de 5-HT.

8. PRODUCCION DE ANDROGENOS *IN VITRO*

8.1. PRODUCCION DE ANDROGENOS POR FRAGMENTOS TESTICULARES

8.1.1. Incubación de fragmentos testiculares

La producción de andrógenos por fragmentos testiculares provenientes de hámsteres prepuberales y adultos mantenidos en diferentes condiciones de luminosidad, fue determinada según el método previamente descrito en esta especie por Mayerhofer y col. (1989c).

Luego del sacrificio de los animales, los testículos fueron removidos y colocados en viales de plástico de 20 ml conteniendo 10 ml de buffer Krebs-Ringer bicarbonato (Co_3HNa 24.2mM, ClNa 120mM, KCl 4.8mM, PO_4KH_2 1.2mM, MgSO_4 1.3mM, CaCl_2 1.6mM, 1% de glucosa; pH:7.2). Luego, cada testículo fue decapsulado, cortado en fragmentos de aproximadamente igual tamaño y pesados. Los fragmentos fueron llevados a viales que contenían 2 ml de buffer Krebs-Ringer bicarbonato, colocados en un baño de hielo y burbujeados durante 10 minutos con O_2 . Posteriormente, los viales fueron preincubados durante 30 minutos en un incubador Dubnoff a temperatura constante de $32 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación de 100 rpm y atmósfera de carbógeno (95% O_2 ; 5% CO_2). Los fragmentos fueron luego transferidos a viales con 2 ml de Medio fresco y una concentración 10^{-4}M de 3-isobutyl-1-methylxanthina (MIX), un inhibidor de la enzima fosfodiesterasa; en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de hCG, GABA y 5-HT. El volumen final de incubación fue 2.3 ml. Después de 6 hs de incubación, los viales fueron colocados en un baño de hielo a fin de detener la actividad enzimática, y los Medios centrifugados a $1200 \times g$ durante 10 minutos. Finalmente, los sobrenadantes fueron guardados a -20°C hasta la determinación de andrógenos por RIA.

8.1.1.1. Efecto del tamaño de los fragmentos testiculares

A fin de establecer las condiciones óptimas del ensayo, fragmentos testiculares provenientes de hámsteres adultos mantenidos en FN, de aproximadamente 50, 100, 200, 300, 400 y 600 mg fueron incubados según las condiciones descritas en la sección 8.1.1. de Materiales y Métodos en presencia o ausencia de una concentración máxima de hCG de 100mUI/ml.

8.1.1.2. Curvas dosis-respuesta

Fragmentos testiculares de igual tamaño provenientes de hámsteres prepuberales y adultos mantenidos en FN, o de animales adultos expuestos a FC durante 14 semanas; fueron incubados según las condiciones descritas en la sección 8.1.1. de Materiales y Métodos en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de hCG (0.3; 0.6; 1.6; 3.1; 6.3; 9.4; 12.5; 25; 50 y 100 mUI/ml).

8.1.1. 3. Influencia de GABA y serotonina sobre la producción de andrógenos *in vitro* por fragmentos testiculares

Fragmentos testiculares de igual tamaño provenientes de hámsteres prepuberales y adultos mantenidos en FN, o de animales adultos expuestos a FC durante 14 semanas; fueron incubados según las condiciones descritas en la sección 8.1.1. de Materiales y Métodos en presencia o ausencia de una concentración máxima de hCG de 100mUI/ml, y con o sin el agregado al Medio de incubación de concentraciones crecientes de GABA y 5-HT (10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M; 10^{-7} M; 10^{-6} M; 10^{-5} M).

8.2. PRODUCCION DE ANDROGENOS EN CELULAS INTERSTICIALES

8.2.1. Obtención de células intersticiales

La obtención de preparaciones crudas de células intersticiales de hámster, se efectuó según Aquilano y col. (1985).

Pooles de entre 2 y 6 testículos provenientes de hámsteres adultos mantenidos en FN, fueron decapsulados, colocados en tubos Falcon de plástico de 50ml, y sus componentes celulares dispersados con 0.2 mg de colagenasa/ml en Medio 199 conteniendo 0.1% de BSA a pH: 7.2, en una relación de 1 ml/g de testículo decapsulado. Posteriormente, los testículos fueron incubados a 30-32°C, con agitación suave, durante 10-12 minutos, previo gaseado de los tubos con carbógeno. La reacción se detuvo por el agregado de 50 ml de Medio 199 frío. Los tubos se agitaron en forma rotatoria durante 3 minutos con el propósito de dispersar mejor el tejido. Se dejó sedimentar durante 3 minutos; y luego, el sobrenadante fue filtrado a través de una fina malla de nylon (Nitex 50). Los túbulos seminíferos presentes en el precipitado, se lavaron con 2 volúmenes de Medio 199 y filtraron. Ambos filtrados fueron mezclados y centrifugados a 800 x g durante 7 minutos. A continuación se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en un volumen apropiado de Medio 199, determinándose la viabilidad celular, el grado de contaminación y rendimiento celular. Finalmente, la suspensión de células intersticiales se diluyó hasta una concentración de 10^6 células/ ml.

8.2.1.1. Técnica de dispersión celular

Las condiciones óptimas de dispersión celular fueron establecidas incubando pooles de testículos decapsulados con 0.1, 0.2 y 0.3 mg de colagenasa/ml de Medio a 30-32°C durante 8, 10, 12 y 15 minutos, según se detalla en la sección 8.2.1. de Materiales y Métodos. Alternativamente, se evaluó la técnica de disgregación

mecánica en ausencia de colagenasa, separando delicadamente los túbulos y componentes celulares del testículo con pinzas de disección.

En los diferentes protocolos de dispersión celular ensayados se determinó, la viabilidad celular (sección 8.2.1.2. de Materiales y Métodos), el rendimiento celular y grado de contaminación (sección 8.2.1.3. de Materiales y Métodos), y la producción de T *in vitro* (sección 8.3. de Materiales y Métodos), a fin de establecer el diseño experimental más adecuado en la obtención de células intersticiales a partir de testículos de hámsteres.

8.2.1.2. Viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada al Microscopio Optico por el método de exclusión con azul tripán. Una alícuota de 100 µl de la suspensión celular se diluyó con 400µl de Medio 199 e incubó con 500 µl de azul tripan 0,4 g%, a temperatura ambiente durante 5 minutos. Al cabo de ese tiempo, se observó la preparación al Microscopio Optico empleando una cámara de Neubauer, y se determinó el número de células viables (células sin teñir). En todos los casos se trabajó con una viabilidad superior al 95%.

8.2.1.3. Rendimiento celular y grado de contaminación

El grado de contaminación y el rendimiento celular fueron determinados por microscopía óptica según se detalla en la sección 8.2.1.2. de Materiales y Métodos, contabilizando el número total de células viables presentes en el preparado; y discriminando cualitativamente entre las células intersticiales y otros componentes celulares de morfología diferente, tales como espermatozoides y células sanguíneas.

8.2.2. Incubación de células intersticiales

Alícuotas de 1 ml de Medio conteniendo 10^6 células intersticiales fueron colocadas en tubos Khan en presencia de 0.1 mM de MIX, y con o sin el agregado de hCG, GABA y 5-HT en diferentes concentraciones. Las células fueron incubadas durante 3 hs a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ en atmósfera de carbógeno y agitación a 100 rpm.

La incubación fue detenida llevando los tubos a un baño de hielo, y los Medios fueron centrifugados a $1200 \times g$ durante 10 minutos. Finalmente, los sobrenadantes fueron guardados a -20°C hasta la determinación de T por RIA.

8.2.2.1. Curvas dosis-respuesta

Alícuotas de 1 ml de Medio conteniendo 10^6 células intersticiales, fueron incubadas según las condiciones descritas en la sección 8.2.2. de Materiales y Métodos en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de hCG (0.5; 1.6; 3.1; 6.3; 12.5; 25 y 100 mUI/ml).

8.2.2.2. Influencia de GABA y serotonina sobre la producción de testosterona *in vitro* en células intersticiales

Alícuotas de 1 ml de Medio conteniendo 10^6 células intersticiales, fueron incubadas según las condiciones descritas en la sección 8.2.2. de Materiales y Métodos en presencia o ausencia de una concentración máxima de hCG de 100mUI/ml, y con o sin el agregado al Medio de incubación de concentraciones crecientes de GABA y 5-HT (10^{-11}M , 10^{-10}M , 10^{-9}M , 10^{-8}M ; 10^{-7}M ; 10^{-6}M ; 10^{-5}M).

8.2.2.3. Influencia de serotonina sobre la producción de testosterona *in vitro* estimulada por dibutiril adenosina 3',5'-monofosfato cíclica en células intersticiales.

Alícuotas de 1 ml de Medio conteniendo 10^6 células intersticiales, fueron incubadas según las condiciones descritas en la sección 8.2.2. de Materiales y Métodos en presencia o ausencia de: a) hCG 100mUI/ml, b) dibutiril 3',5'-monofosfato cíclica (dbAMPc) 0.5 mM, y c) concentraciones crecientes de 5-HT (10^{-9} M, 10^{-7} M ; 10^{-6} M).

8.2.2.4. Rol del factor liberador de corticotrofina sobre la producción de testosterona *in vitro* en células intersticiales

Alícuotas de 1 ml de Medio conteniendo 10^6 células intersticiales, fueron incubadas según las condiciones descritas en la sección 8.2.2. de Materiales y Métodos en presencia o ausencia de: a) hCG 100mUI/ml, b) CRF (10^{-6} M), c) 5-HT (10^{-6} M), y d) anticuerpo específico anti CRF (diluciones 1/10000, 1/1000 y 1/100).

8.3. DETERMINACION DE ANDROGENOS *IN VITRO*

Los niveles de T, DHT y Diol en los Medios de incubación provenientes de experimentos realizados con fragmentos testiculares y células intersticiales aisladas, fueron determinados por RIA según se ha descrito previamente (sección 4.3.2. de Materiales y Métodos). En los casos requeridos, se hicieron diluciones de los Medios de incubación con buffer RIA, y alícuotas de las mismas fueron agregadas al ensayo, sin extracción previa.

9. DETERMINACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry y col. (1951), usando BSA como estándar.

10. DETERMINACION DE ADN

La determinación de ADN se realizó por el método fluorométrico descrito por Labarca y Paigen (1980). Para ello, 1g de tejido fue homogeneizado en 15 ml de EDTA 2mM, y posteriormente sonificado con 3 pulsos de 15 segundos. Una alícuota apropiada de esta preparación se diluyó a 500 μ l con EDTA 2mM y se mezcló con 1 ml del fluorógeno H33258 (Hoechst) 0.15 μ g/ml en buffer SA (75mM NaH₂PO₄, 3.75 M NaCl, pH:7.4). El blanco y la curva estándar de ADN recibieron igual tratamiento. Dentro de las 16 hs, se determinó la fluorescencia de los sobrenadantes por excitación a 360 nm y emisión a 445nm.

11. ANALISIS ESTADISTICOS

Los requisitos para el análisis de varianza de *normalidad y homogeneidad*, fueron analizados por métodos gráficos y el test estadístico de Bartlett, respectivamente (Sokal y Rohlf, 1986).

Cuando los datos siguieron una distribución normal, presentaron varianzas homogéneas y cumplieron el supuesto de independencia; los mismos fueron estudiados usando un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguido por el test de Student's para dos comparaciones o por el test de Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples (Sokal y Rohlf, 1986). Contrariamente, cuando los datos, aún después de realizadas transformaciones logarítmicas o raíz cuadrada, no reunieron las condiciones del análisis de la varianza; las diferencias estadísticas se

analizaron por un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por el test de múltiples comparaciones de Dunn's (Daniel, 1978).

Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$. Los datos se expresan como la media o mediana $\pm$ error estándar (ES).

Los parámetros fueron correlacionados usando el test de regresión lineal. Se calculó el coeficiente de correlación (r) y un $p < 0.0001$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

FUNCION REPRODUCTIVA EN EL HAMSTER MACHO: INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL FOTOPERIODO

1. INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL FOTOPERIODO SOBRE EL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO-GONADAL Y GLANDULAS SEXUALES ACCESORIAS

En el estudio ontogénico del eje hipotálamo-hipófiso-testicular y órganos reproductivos del hámster se determinaron: el peso corporal, gonadal y de las glándulas sexuales accesorias; el contenido de ADN y proteínas en estos órganos; los niveles séricos de lípidos, hormonas hipofisarias, andrógenos e inhibina B; y la concentración testicular y epididimaria de hormonas sexuales. Estos mismos parámetros fueron evaluados con el propósito de analizar la influencia del fotoperíodo sobre dicho eje.

1.1. PESO CORPORAL

1.1.1. En el proceso de desarrollo sexual

La Fig. 15 muestra las variaciones en el peso corporal ocurridas durante la ontogenia de las especies de hámsteres Dorado y Djungarian. En hámsteres Dorados se observa un incremento de la masa corporal paralelo a la edad detectándose, entre los 23 y 36 días, el período de mayor velocidad de crecimiento. En hámsteres de la especie Djungarian, el peso corporal presenta un rápido incremento durante los primeros 36 días de edad; permaneciendo luego, prácticamente constante hasta la adultez.

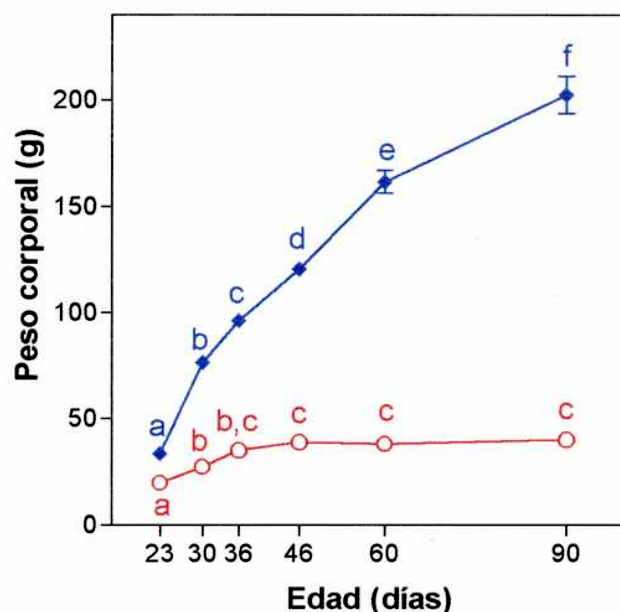


Figura 15. PESO CORPORAL EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

◆ : Hámsteres de la especie *Dorado*.

○ : Hámsteres de la especie *Djungarian*.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

1.1.2. Influencia del fotoperíodo sobre el peso corporal

La Tabla 2 muestra los datos correspondientes al peso corporal de hámsteres Dorados machos adultos mantenidos en condiciones estándares de luminosidad (14hs.luz/10hs.osc) o expuestos a FC (6hs.luz /18hs.osc) durante 9, 12, 14, 16, 18 y 22 semanas, tanto al inicio como al final del experimento. Con el fin de evaluar las variaciones ocurridas en la masa corporal durante el período de estudio, se calculó la relación peso corporal final/peso corporal inicial. Durante el desarrollo del experimento, no se detectó un cambio significativo en el peso corporal de los animales controles, como así tampoco en los hámsteres expuestos a FC.

Por otra parte, la exposición a FC no produjo modificaciones significativas en el peso corporal respecto del grupo control mantenido en FN, en ninguno de los intervalos de tiempo analizados.

semanas en FC	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)	Crecimiento corporal relativo (Final/Inicial)
FN	140.17 $\pm$ 3.23 ^a	146.06 $\pm$ 2.66 ^a	1.04 $\pm$ 0.08 ^a
9	150.55 $\pm$ 3.81 ^a	143.67 $\pm$ 6.78 ^a	0.96 $\pm$ 0.11 ^a
12	149.02 $\pm$ 4.90 ^a	146.80 $\pm$ 3.59 ^a	0.99 $\pm$ 0.07 ^a
14	143.41 $\pm$ 2.99 ^a	138.13 $\pm$ 3.87 ^a	0.96 $\pm$ 0.09 ^a
16	144.72 $\pm$ 3.75 ^a	154.57 $\pm$ 4.55 ^a	1.07 $\pm$ 0.10 ^a
18	125.52 $\pm$ 5.80 ^a	121.25 $\pm$ 6.28 ^a	0.97 $\pm$ 0.09 ^a
22	124.20 $\pm$ 3.11 ^a	122.00 $\pm$ 2.65 ^a	0.98 $\pm$ 0.10 ^a

Tabla 2. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE EL PESO CORPORAL.

El peso corporal al inicio y finalización del experimento, y el crecimiento corporal relativo, fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (El peso corporal inicial y final fue analizado por el Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$. El crecimiento corporal relativo fue analizado por el Test de Kruskal-Wallis; $p < 0.05$).

1.2. MODIFICACIONES EN EL PESO DE LOS ORGANOS REPRODUCTIVOS

1.2.1 Testículo

1.2.1.1. En el proceso de desarrollo sexual

La Fig. 16 (panel A) muestra el peso testicular en función de la edad, en hámsteres de las especies Dorado y Djungarian. En hámsteres Dorados se observó un aumento del peso gonadal concomitante con la edad. En contraste, hámsteres de la especie Djungarian, muestran su mayor velocidad de crecimiento testicular en los primeros 36 días de edad para alcanzar, hacia los 46 días, el peso gonadal

característico de la adultez. Cuando se calculó el peso testicular relativo (g/100 g de peso corporal), la especie Djungarian presentó, entre los 23 y 36 días de vida, una velocidad de crecimiento gonadal mayor que la especie Dorado. Luego, el peso testicular relativo de ambas especies permaneció prácticamente constante durante los períodos puberal y adulto. Hámsteres adultos de las especies Dorado y Djungarian, no presentaron diferencias en sus pesos testiculares relativos (Fig. 16, panel B).

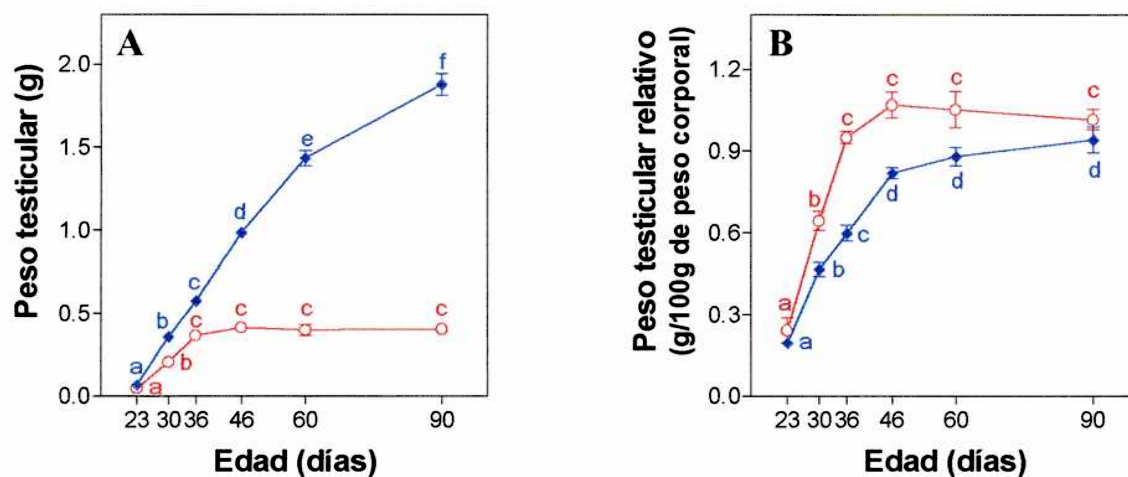


Figura 16. PESO TESTICULAR EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

◆ : Hámsteres de la especie Dorado.

○ : Hámsteres de la especie Djungarian.

Panel A: Peso testicular absoluto (g).

Panel B: Peso testicular relativo (g/100g de peso corporal).

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (El peso testicular absoluto fue analizado por el Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$. El peso testicular relativo fue analizado por el Test de Kruskal-Wallis; $p < 0.05$).

Durante el proceso de maduración sexual del hámster Dorado, el volumen testicular varió proporcionalmente con el peso gonadal; mientras que, el peso testicular específico presentó valores cercanos a la unidad a todas las edades analizadas (Tabla 3). Basándonos en estos resultados, es razonable asumir que los

términos " cm^3 " y "*gramos*" son intercambiables, pudiéndose expresar los datos obtenidos en las determinaciones bioquímicas, indistintamente en función de cualquiera de estas dos variables. En el presente trabajo, se ha optado por expresar los resultados de las diferentes mediciones bioquímicas realizadas en "*gramos de tejido testicular*".

Edad (días)	TESTICULO	
	Volúmen (cm^3)	Peso Específico (g/cm^3)
23	0.16 ± 0.02^a	1.08 ± 0.05^a
30	0.44 ± 0.03^b	0.97 ± 0.04^a
36	0.68 ± 0.03^c	1.00 ± 0.03^a
46	1.00 ± 0.02^d	1.03 ± 0.01^a
60	1.34 ± 0.04^e	1.07 ± 0.01^a
90	1.37 ± 0.07^e	1.06 ± 0.01^a

Tabla 3. VOLUMEN GONADAL Y PESO ESPECIFICO TESTICULAR EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

El volúmen gonadal y el peso específico testicular fueron determinados en hámsteres Dorados de 23,30,36,46,60 y 90 días de edad.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (El volúmen testicular fue analizado por el Test de Student-Newman-Keuls: $p < 0.05$. El peso específico testicular fue analizado por el Test de Kruskal-Wallis: $p < 0.05$).

En hámsteres Dorados, el contenido testicular de proteínas aumentó en paralelo con la edad. En cambio, en hámsteres de la especie Djungarian, el contenido proteico gonadal incrementó proporcionalmente con la edad hasta los 46 días, y posteriormente permaneció sin cambios hasta la adultez (Tabla 4). En hámsteres de ambas especies, la concentración testicular de proteínas (en mg/g de

tejido) mostró un aumento significativo entre los 23 y 30 días de edad, un leve descenso hacia los 36 días y luego permaneció constante hasta la finalización del proceso de maduración sexual (Tabla 4).

EDAD (días)	TESTICULO			
	DORADO		DJUNGARIAN	
	Proteínas		Proteínas	
	(mg/testículo)	(mg/g.tejido)	(mg/testículo)	(mg/g. tejido)
23	4.83+0.88 ^a	69.83+6.60 ^a	4.24+0.68 ^a	88.56+7.76 ^a
30	42.70+4.01 ^b	119.37+5.30 ^b	28.21+2.05 ^b	136.01+9.30 ^b
36	50.94+3.68 ^b	88.45+3.17 ^a	38.34+4.18 ^{b,c}	104.47+7.30 ^{a,b}
46	89.08+5.80 ^c	90.24+3.36 ^a	50.85+5.30 ^c	122.35+4.89 ^{b,c}
60	126.19+6.75 ^d	88.00+3.16 ^a	52.11+5.27 ^c	129.73+5.49 ^{b,c}
90	158.58+8.21 ^e	84.35+3.22 ^a	47.63+4.35 ^c	102.31+9.66 ^{a,c}

Tabla 4. NIVELES PROTEICOS TESTICULARES EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

La concentración y el contenido testicular de proteínas fueron determinados en hámsteres de las especies Dorado y Djungarian de 23,30,36,46,60 y 90 días de edad.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; p < 0.05).

1.2.1.2. Influencia del fotoperíodo sobre el peso testicular

En la Fig. 17 se ilustra el peso testicular en hámsteres Dorados mantenidos en FN, y en animales expuestos a FC entre 9 y 22 semanas. La permanencia durante 9 semanas en condiciones de escasa luminosidad, produjo una disminución en el peso

gonadal. Sin embargo, este descenso fue estadísticamente significativo a partir de las 12 semanas de exposición a FC, alcanzándose la máxima regresión testicular entre las 14 y 16 semanas. Así, se detectó a las 16 semanas de permanencia en fotorestricción, una caída del 88% en el peso gonadal respecto del grupo control. Posteriormente, los testículos recuperaron gradualmente sus pesos, aunque a las 22 semanas en FC, el peso gonadal permaneció aún significativamente disminuído en comparación con el grupo de hámsteres mantenidos en FN.

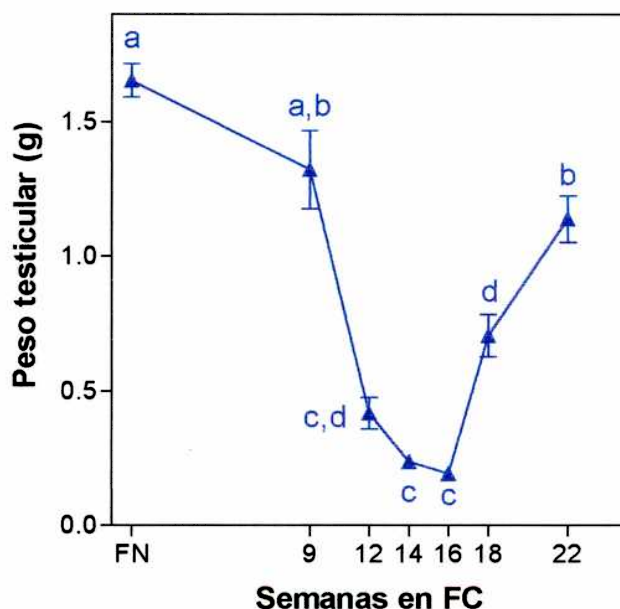


Figura 17. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE EL PESO TESTICULAR.

El peso testicular fue determinado en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

El volúmen testicular disminuyó notoriamente hacia las 14 semanas de exposición a FC; mientras que, a las 22 semanas de permanencia en fotoperíodo inhibitorio, se observó una recuperación parcial del mismo (Tabla 5). Contrariamente, el peso testicular específico no presentó modificaciones foto-dependientes

detectándose, en todos los grupos experimentales, valores cercanos a 1 g/cm³ (Tabla 5).

semanas en FC	TESTICULO	
	Volúmen (cm ³)	Peso Específico (g/cm ³)
FN	1.56±0.06 ^a	1.05±0.01 ^a
14	0.33±0.02 ^b	1.08±0.02 ^a
22	1.07±0.11 ^c	1.08±0.01 ^a

Tabla 5. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE EL VOLUMEN GONADAL Y PESO ESPECÍFICO TESTICULAR.

El volúmen gonadal y el peso específico testicular fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 14 y 22 semanas. Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (El volúmen testicular fue analizado por el Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$. El peso específico testicular fue analizado por el Test de Kruskal-Wallis; $p < 0.05$).

El contenido gonadal de proteínas y ADN, descendió notoriamente a las 12-18 semanas de permanencia en FC; observándose una recuperación estadísticamente significativa hacia las 22 semanas (Tabla 6). Contrariamente, la concentración testicular de proteínas y ADN experimentó un marcado aumento entre las 14 y 16 semanas en fotorestricción; y a las 22 semanas, descendió hasta niveles similares a los detectados en el grupo control mantenido en FN (Tabla 6).

semanas en FC	TESTICULO			
	Proteínas (mg/testículo)	ADN (mg/testículo)	Proteínas (mg/g. tejido)	ADN (mg/g. tejido)
FN	131.67+4.33 ^a	40.80+2.74 ^a	79.61+2.39 ^a	23.33+1.47 ^a
9	112.52+9.81 ^a	39.27+6.95 ^{a,b}	85.11+1.40 ^a	28.21+6.03 ^a
12	36.64+9.94 ^{b,c}	19.84+4.68 ^{a,b}	87.54+2.19 ^a	37.06+9.15 ^a
14	22.76+4.96 ^b	24.00+2.17 ^{a,b}	95.90+3.60 ^b	95.39+17.77 ^b
16	18.90+5.52 ^b	22.03+5.26 ^{a,b}	97.35+2.53 ^b	65.30+12.60 ^{a,b}
18	66.55+8.23 ^c	20.14+3.94 ^b	94.15+2.34 ^b	45.76+10.84 ^a
22	102.10+6.28 ^a	39.59+5.02 ^{a,b}	89.72+2.70 ^a	46.92+7.35 ^a

Tabla 6. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES DE ADN Y PROTEÍNAS TESTICULARES.

La concentración y el contenido testicular de ADN y proteínas, fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; p < 0.05).

1.2.2. Epididimo

1.2.2.1. En el proceso de desarrollo sexual

La Fig. 18 (panel A) muestra las modificaciones ocurridas en el peso epididimario durante el proceso de maduración sexual en los hámsteres Dorado y Djungarian. En hámsteres Dorados, los epidídimos describieron un incremento en su

peso proporcional a la edad, observándose entre los 36 y 60 días el período de mayor crecimiento. En hámsteres de la especie *Djungarian*, el peso epididimario aumentó significativamente entre los 23 y 36 días de edad; para alcanzar, hacia los 46 días, el peso característico de la adultez. Cuando se calculó el peso epididimario relativo (g/100 g de peso corporal), la especie *Djungarian* mostró, durante el período prepuberal, una velocidad de crecimiento mayor que la especie *Dorado*. Hámsteres de la especie *Djungarian* presentaron, a los 46 días de edad, un peso epididimario relativo semejante al descrito en la etapa adulta; mientras que, en hámsteres *Dorados*, el desarrollo epididimario continuó entre los 46 y 90 días de edad, aunque a partir de los 60 días, la velocidad de crecimiento fue menor que la detectada en las etapas prepuberal y puberal. Hámsteres adultos de ambas especies, no presentaron diferencias en sus pesos epididimarios relativos (Fig. 18, panel B).

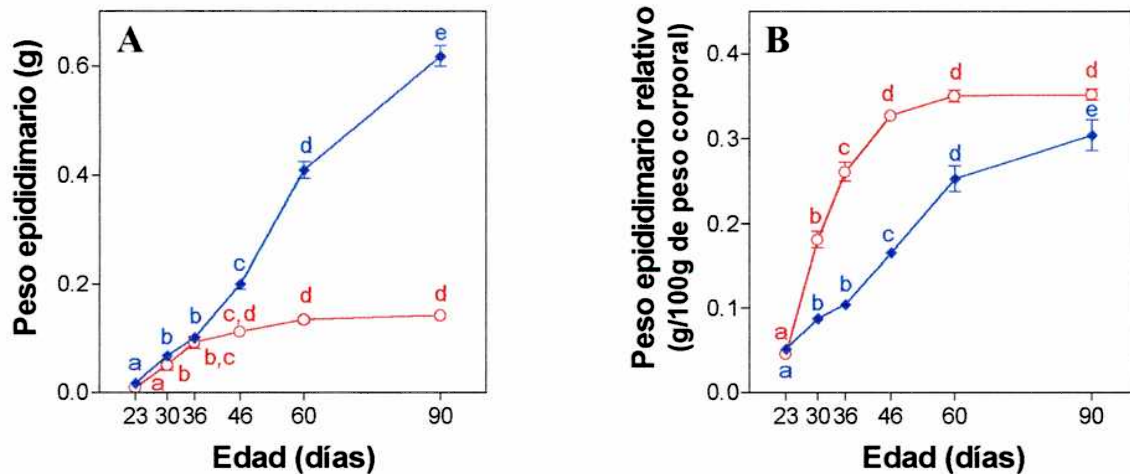


Figura 18. PESO EPIDIDIMARIO EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

◆ : Hámsteres de la especie *Dorado*.

○ : Hámsteres de la especie *Djungarian*.

Panel A: Peso epididimario absoluto (g).

Panel B: Peso epididimario relativo (g/100g de peso corporal).

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (El peso epididimario absoluto fue analizado por el Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$. El peso epididimario relativo fue analizado por el Test de Kruskal-Wallis; $p < 0.05$).

En hámsteres Dorados, el contenido epididimario de proteínas aumentó concomitantemente con la edad; mientras que, la concentración proteica epididimaria (en mg/g de tejido), incrementó significativamente recién a los 46 días de edad, permaneciendo luego constante hasta la adultez (Tabla 7).

EDAD (días)	EPIDIDIMO HAMSTER DORADO	
	Proteínas	
	(mg/epidídimo)	(mg/g.tejido)
23	1.26+0.58 ^a	73.00+5.27 ^{a,c}
30	4.76+1.32 ^a	71.08+4.30 ^{a,c}
36	5.20+1.18 ^a	67.02+4.70 ^a
46	12.66+3.04 ^a	87.53+3.62 ^{b,c}
60	35.54+6.51 ^b	86.77+3.60 ^{b,c}
90	56.62+8.10 ^b	92.16+2.04 ^{b,c}

Tabla 7. NIVELES PROTEICOS EPIDIDIMARIOS EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

La concentración y el contenido epididimario de proteínas fueron determinados en hámsteres Dorados de 23,30,36,46,60 y 90 días de edad.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

1.2.2.2. Influencia del fotoperíodo sobre el peso epididimario

La Fig. 19 muestra el peso epididimario en hámsteres Dorados mantenidos en FN, y en animales expuestos a FC entre 9 y 22 semanas. A las 9 semanas de permanencia en fotoperíodo restrictivo, se detectó una disminución estadísticamente significativa en el peso de los epidídimos. La máxima involución fue alcanzada a las

16 semanas en FC, con una caída en el peso epididimario del 78% respecto del grupo control. Entre las 18 y 22 semanas de permanencia en fotoinhibición, los epidídimos presentaron una recuperación parcial de sus pesos, aunque permanecieron significativamente disminuídos en comparación con el grupo de hámsteres mantenido en FN.

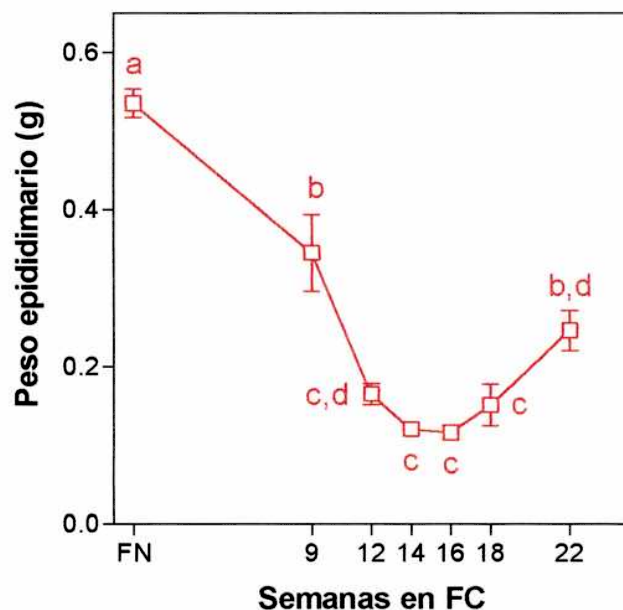


Figura 19. INFLUENCIA DEL FOTOPERÍODO SOBRE EL PESO EPIDIDIMARIO.

El peso epididimario fue determinado en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

La exposición a FC produjo una caída significativa en el contenido y la concentración epididimaria de proteínas y ADN. Los mínimos niveles fueron detectados a las 14-16 semanas; mientras que, a las 22 semanas de permanencia en fotoperíodo restrictivo, se observó una tendencia hacia la recuperación del contenido y la concentración de ADN y proteínas en el epidídimo (Tabla 8).

semanas en FC	EPIDIDIMO			
	Proteínas (mg/epidídimo)	ADN (mg/epidídimo)	Proteínas (mg/g. tejido)	ADN (mg/g. tejido)
FN	47.70±5.03 ^a	11.36±2.03 ^a	89.15±2.86 ^{a,c}	21.23±1.70 ^{a,d}
9	31.95±3.31 ^b	6.92±1.51 ^{a,b}	92.63±7.45 ^a	20.05±2.32 ^{a,d}
12	13.12±2.11 ^{c,d}	3.12±1.85 ^b	79.24±8.28 ^{a,c}	18.87±1.25 ^{a,d}
14	8.04±1.98 ^c	1.67±0.97 ^b	66.49±6.20 ^{c,d,e}	13.83±0.97 ^{a,c}
16	5.71±1.25 ^c	1.01±0.61 ^b	48.94±5.17 ^{b,d}	8.65±0.62 ^{b,c}
18	12.54±3.20 ^{c,e}	2.99±1.11 ^b	82.74±3.28 ^{a,e,f}	19.70±1.89 ^{a,d}
22	22.59±4.08 ^{b,d,e}	5.38±3.20 ^{a,b}	91.68±2.04 ^{a,f}	21.83±2.53 ^d

Tabla 8. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES DE ADN Y PROTEÍNAS EPIDIDIMARIAS.

La concentración y el contenido epididimario de ADN y proteínas, fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls: $p < 0.05$).

1.2.3. Vesículas seminales

1.2.3.1. En el proceso de desarrollo sexual

En la Fig. 20 (panel A) se ilustran las variaciones ontogénicas en el peso de las vesículas seminales en hámsteres de las especies Dorado y Djungarian. Hámsteres Dorados presentaron un aumento en el peso de las vesículas seminales concomitante con la edad. Asimismo, en hámsteres de la especie Djungarian, el peso

de las vesículas seminales incrementó proporcionalmente con la edad entre los 23 y 60 días, y luego permaneció constante hasta la adultez.

Cuando el peso relativo de las vesículas seminales fue calculado (g/100 g de peso corporal), la velocidad de crecimiento resultó similar en ambas especies durante todo el proceso de desarrollo sexual, detectándose pesos relativos mayores en hámsteres de la especie Djungarian (Fig. 20, panel B).

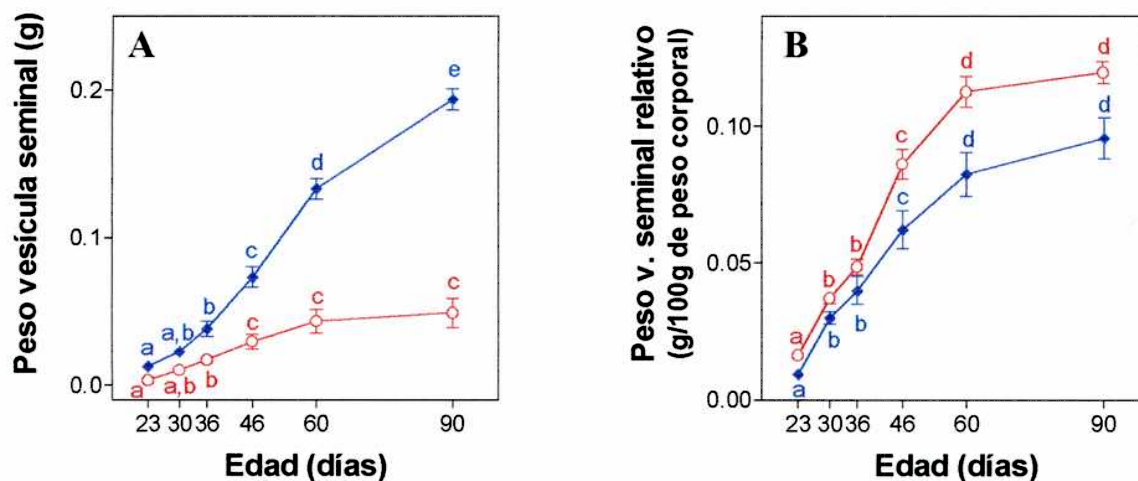


Figura 20. PESO VESICULAR EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

◆: Hámsteres de la especie Dorado.

○: Hámsteres de la especie Djungarian.

Panel A: Peso absoluto de cada vesícula seminal (g).

Panel B: Peso relativo de cada vesícula seminal (g/100g de peso corporal).

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (El peso absoluto de las vesículas seminales fue analizado por el Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$. El peso glandular relativo fue analizado por el Test de Kruskal-Wallis; $p < 0.05$).

En hámsteres Dorados, el contenido de proteínas en las vesículas seminales aumentó proporcionalmente con la edad del animal (Tabla 9). En cambio, cuando los niveles proteicos fueron expresados en términos de concentración (mg/g de tejido), los mismos permanecieron sin cambios en todos los grupos etarios estudiados (Tabla 9).

EDAD (días)	VESICULA SEMINAL HAMSTER DORADO	
	Proteínas	
	(mg/v.seminal)	(mg/g.tejido)
23	0.18+0.02 ^a	81.01+7.07 ^a
30	1.21+0.22 ^a	95.29+3.57 ^a
36	2.05+0.41 ^{a,b}	94.73+9.55 ^a
46	4.92+0.90 ^b	77.86+9.07 ^a
60	9.64+1.05 ^c	75.03+5.67 ^a
90	14.88+1.29 ^d	76.73+6.69 ^a

Tabla 9. NIVELES PROTEICOS VESICULARES EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

La concentración y el contenido de proteínas fueron determinados en cada vesícula seminal de hámsteres Dorados de 23,30,36,46,60 y 90 días de edad.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

1.2.3.2 Influencia del fotoperíodo sobre el peso de las vesículas seminales

La Fig. 21 muestra el peso de las vesículas seminales en hámsteres Dorados mantenidos en FN, o expuestos a FC entre 9 y 22 semanas. La permanencia durante 12 semanas en fotoperíodo restrictivo, produjo una disminución significativa en el peso de las vesículas seminales. Hacia las 16 semanas, se detectó una caída del 72% en el peso glandular respecto del grupo control. Posteriormente, las vesículas recuperaron gradualmente sus pesos; aunque a las 22 semanas de exposición a FC, se encontraban aún significativamente regresionadas.

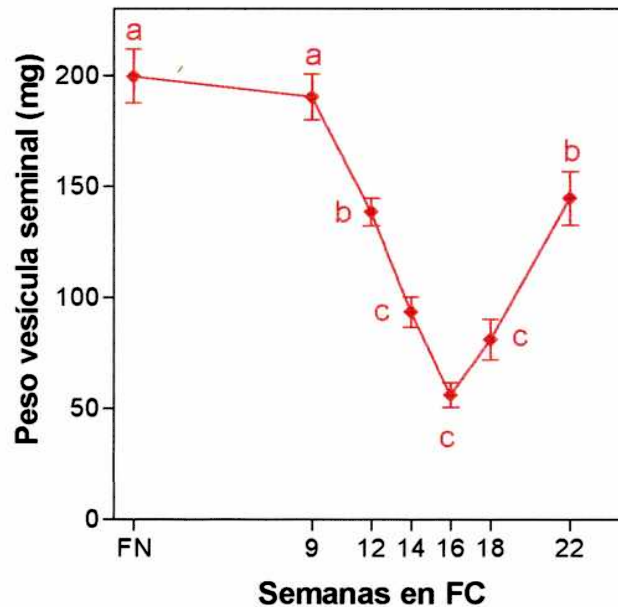


Figura 21. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE EL PESO VESICULAR.

El peso de cada vesícula seminal fue determinado en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas. Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

La exposición a FC, produjo un descenso significativo del contenido de proteínas y ADN en las vesículas seminales, presentando los mínimos niveles hacia las 14-16 semanas. La permanencia en fotorestricción durante tiempos prolongados (22 semanas), indujo la recuperación del contenido vesicular de proteínas y ADN (Tabla 10). La concentración de proteínas en las vesículas seminales, aumentó significativamente entre las 12 y 16 semanas en fotoinhibición, y posteriormente disminuyó a niveles cercanos a los detectados en el grupo control. La concentración vesicular de ADN incrementó significativamente a las 12 semanas de exposición a FC, y permaneció elevada durante todo el experimento (Tabla 10).

semanas en FC	VESICULA SEMINAL			
	Proteínas (mg/v.seminal)	ADN (mg/v.seminal)	Proteínas (mg/g. tejido)	ADN (mg/g. tejido)
FN	18.56±3.00 ^a	3.76±0.45 ^a	66.03±6.72 ^a	13.59±1.03 ^a
9	14.05±1.24 ^{a,b}	3.44±0.22 ^{a,b,c}	70.72±11.75 ^a	16.93±1.30 ^{a,b}
12	11.17±1.25 ^{a,c}	2.39±0.25 ^{b,c}	124.25±11.30 ^{b,c}	27.41±3.50 ^{b,c}
14	8.99±3.08 ^{b,c}	2.52±0.33 ^{b,c}	122.86±6.30 ^{b,c}	25.77±2.00 ^{b,c}
16	8.50±0.92 ^{b,c}	2.20±0.15 ^{b,c}	117.57±15.92 ^{b,c}	33.96±1.44 ^c
18	10.77±1.56 ^{a,c}	2.26±0.18 ^{b,c}	103.09±12.31 ^{a,c}	26.94±3.33 ^{b,c}
22	11.21±0.44 ^{a,c}	2.75±0.13 ^{a,c}	92.51±8.75 ^{a,c}	25.98±2.75 ^{b,c}

Tabla 10. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES VESICULARES DE ADN Y PROTEINAS.

La concentración y el contenido de ADN y proteínas fueron determinados en cada vesícula seminal de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperiodo normal (FN) o expuestos a fotoperiodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los valores representan la media ± ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

1.2.4. Próstata

1.2.4.1. En el proceso de desarrollo sexual

La Fig. 22 (panel A) muestra los cambios en el peso de la próstata ocurridos durante el proceso de desarrollo sexual en los hámsteres Dorado y Djungarian. En hámsteres Dorados, la próstata aumentó de peso paralelamente a la edad del animal. En hámsteres de la especie Djungarian, el peso prostático incrementó marcadamente

entre los 23 y 46 días de edad, y posteriormente describió una meseta hasta alcanzar la adultez.

La Fig. 22 (panel B) ilustra el peso relativo de la próstata (g/100 g de peso corporal). La velocidad de crecimiento prostático fue similar en ambas especies durante todo el desarrollo sexual. A los 46 días de edad, tanto hámsteres de la especie Dorado como Djungarian, presentaron pesos prostáticos similares a los detectados en los animales adultos.

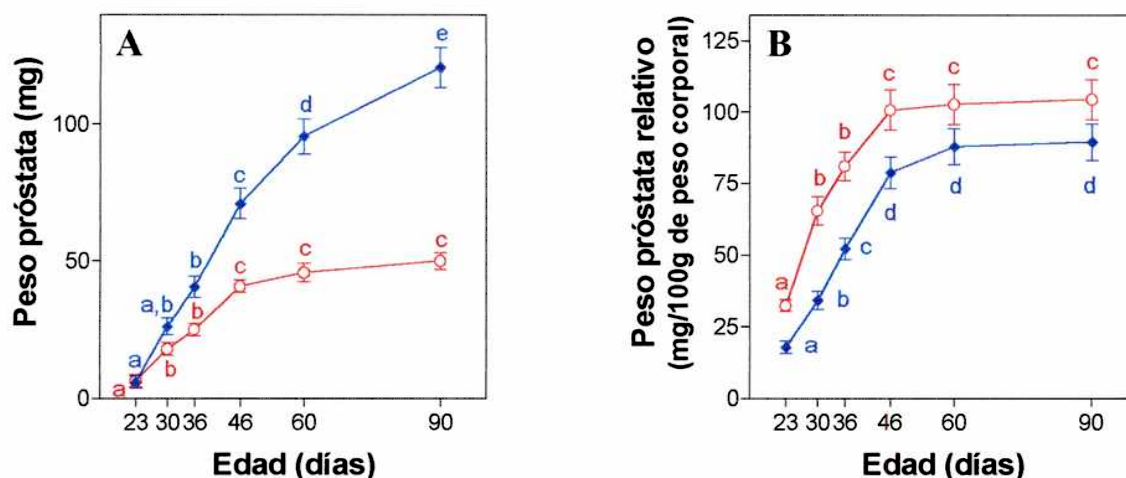


Figura 22. PESO DE LA PROSTATA EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

◆ : Hámsteres de la especie Dorado.

○ : Hámsteres de la especie Djungarian.

Panel A: Peso absoluto de la próstata (g).

Panel B: Peso relativo de la próstata (g/100g de peso corporal).

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (El peso absoluto de la próstata fue analizado por el Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$. El peso prostático relativo fue analizado por el Test de Kruskal-Wallis; $p < 0.05$).

1.2.4.2. Influencia del fotoperíodo sobre el peso de la próstata

Las variaciones en el peso de la próstata ocurridas durante la exposición a FC se encuentran representadas en la Fig. 23. En hámsteres Dorados mantenidos durante 9 semanas en condiciones de escasa luminosidad, se observó un descenso significativo en el peso prostático. Hacia las 14-16 semanas de exposición a FC se detectaron los pesos mínimos, mostrando una disminución del 84% respecto del

grupo control en FN. A tiempos mayores (18-22 semanas), se detectó una recuperación parcial del peso prostático.

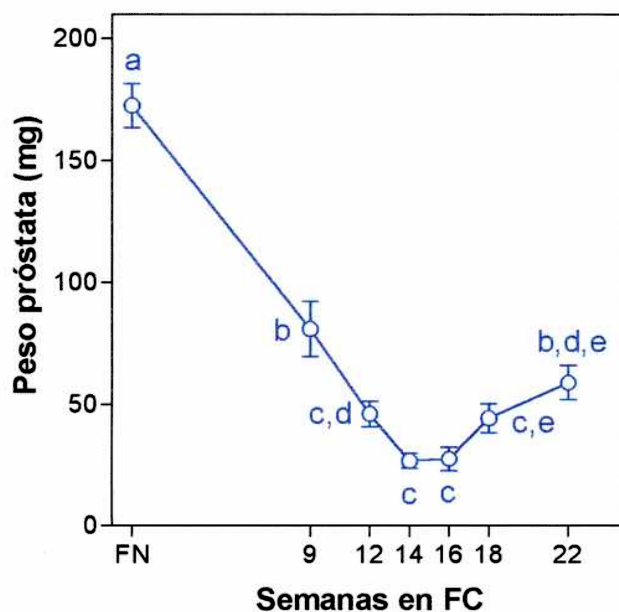


Figura 23. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE EL PESO DE LA PROSTATA.

El peso de la próstata fue determinado en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9, 12, 14, 16, 18 y 22 semanas.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

1.3. PERFIL LIPIDICO SERICO

1.3.1. Influencia del fotoperíodo sobre el perfil lipídico sérico

Estudios previos realizados en hámsteres de la especie Djungarian, describen una pérdida en el peso corporal durante la permanencia en FC relacionada con una disminución en el contenido lipídico (Wade y Bartness, 1984). En el presente trabajo, nos resultó de interés analizar el perfil lipídico sérico durante la transición regresión-recrudescencia en hámsteres de la especie Dorado que, como se describió

previamente, no sufren alteraciones en la masa corporal dependientes del fotoperíodo.

La Tabla 11 muestra los niveles séricos de colesterol total, HDL y triglicéridos correspondientes a los diferentes grupos experimentales estudiados. La exposición a FC entre 9 y 22 semanas, no produjo modificaciones significativas en los niveles lipídicos circulantes respecto del grupo control mantenido en condiciones estándares de luminosidad.

semanas en FC	Colesterol total (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	HDL (mg/dl)
FN	112.29+3.60 ^a	216.90+28.34 ^a	72.32+2.27 ^a
9	106.05+3.90 ^a	179.87+20.08 ^a	64.96+3.14 ^a
12	127.21+6.15 ^a	235.47+26.36 ^a	79.53+2.05 ^a
14	112.29+7.21 ^a	179.49+16.68 ^a	74.75+1.10 ^a
16	131.66+6.17 ^a	189.39+26.90 ^a	79.83+2.73 ^a
18	120.54+4.75 ^a	220.02+26.41 ^a	73.10+4.17 ^a
22	101.22+7.45 ^a	166.29+19.62 ^a	69.89+7.22 ^a

Tabla 11. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE EL PERFIL LIPIDICO SERICO.

Los niveles séricos de Colesterol total, Triglicéridos y HDL fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Test de Student-Newman-Keuls; p > 0.05).

1.4. PERFIL HORMONAL SERICO

1.4.1. En el proceso de desarrollo sexual

La Tabla 12 muestra los niveles séricos de gonadotrofinas y andrógenos presentes en distintas etapas del desarrollo sexual en hámsteres Dorados. LH describió un marcado incremento a los 30 días de edad, permaneciendo significativamente elevada entre los 36 y 46 días; y descendió finalmente un 50% en la etapa adulta (60-90 días de edad). FSH también alcanzó un nivel máximo entre los 36 y 46 días de edad, disminuyendo a partir de los 60 días. Los niveles circulantes de T presentaron un aumento significativo recién a los 46 días de edad, alcanzando sus mayores niveles hacia los 60 días, y descendiendo un 33% a los 90 días. La concentración sérica de DHT mostró un incremento significativo a partir de los 36 días de edad, siendo máxima entre los 46 y 60 días; y luego disminuyó, a los 90 días, a niveles de la edad adulta. El principal andrógeno periférico a los 30 días de edad fue Diol, etapa en la cual presentó niveles máximos; y posteriormente comenzó a descender hasta alcanzar la concentración de 1.0 ng/ml a los 90 días de edad.

Los niveles circulantes de LH y andrógenos en la ontogenia de la especie *Djungarian*, se describen en la Tabla 13. La LH sérica presentó dos aumentos significativos durante el desarrollo sexual, el primero a los 30 días de edad, y el segundo en la etapa puberal (46 días). La T y DHT mostraron un marcado incremento recién a los 46 días de edad, descendiendo a los 60 días, y recuperando finalmente sus niveles puberales durante la fase adulta (2.4 y 0.95 ng/ml, respectivamente). La concentración sérica de Diol permaneció constante en todos los grupos etarios estudiados.

Edad (días)	LH (ng/ml)	FSH (ng/ml)	T (ng/ml)	DHT (ng/ml)	Diol (ng/ml)
23	1.90±0.25 ^a	5.26±0.42 ^{a,d}	0.37±0.06 ^a	0.40±0.07 ^a	1.14±0.21 ^a
30	6.34±0.75 ^b	5.17±0.51 ^{a,d}	1.11±0.26 ^a	0.88±0.09 ^{a,b}	4.61±1.05 ^{b,c}
36	8.41±1.18 ^b	7.96±0.37 ^{b,c}	1.34±0.10 ^a	0.95±0.15 ^b	3.20±0.72 ^{a,c}
46	8.27±0.99 ^b	6.57±0.48 ^{d,c}	5.11±0.30 ^{b,c}	1.63±0.16 ^c	3.30±0.40 ^{a,c}
60	4.31±1.13 ^{a,b}	3.28±0.68 ^a	6.34±0.33 ^b	1.70±0.14 ^c	1.83±0.07 ^{a,c}
90	4.63±1.40 ^{a,b}	3.70±0.66 ^a	4.21±0.32 ^c	1.05±0.07 ^b	1.04±0.08 ^a

Tabla 12. PERFIL HORMONAL SERICO EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

Los niveles séricos de LH, FSH, Testosterona, DHT y Diol, fueron determinados en hámsteres Dorados de 23,30,36,46,60 y 90 días de edad.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls: p < 0.05).

Edad (días)	LH (ng/ml)	T (ng/ml)	DHT (ng/ml)	Diol (ng/ml)
23	0.20±0.03 ^a	0.77±0.17 ^a	0.52±0.11 ^a	1.18±0.15 ^a
30	0.31±0.03 ^{b,d}	0.92±0.20 ^a	0.56±0.09 ^a	1.23±0.13 ^a
36	0.23±0.02 ^{a,d}	1.06±0.19 ^a	0.59±0.05 ^{a,b}	1.32±0.11 ^a
46	0.35±0.03 ^{c,b}	2.91±0.50 ^b	1.12±0.18 ^b	1.11±0.11 ^a
60	0.30±0.02 ^{a,b}	1.91±0.22 ^{a,b}	0.65±0.11 ^{a,b}	1.05±0.11 ^a
90	0.28±0.02 ^{a,b}	2.39±0.26 ^{a,b}	0.95±0.22 ^{a,b}	1.40±0.26 ^a

Tabla 13. PERFIL HORMONAL SERICO EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

Los niveles séricos de LH, Testosterona, DHT y Diol, fueron determinados en hámsteres de la especie *Djungarian* de 23,30,36,46,60 y 90 días de edad.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls: p < 0.05).

1.4.2. Influencia del fotoperíodo sobre el perfil hormonal sérico

En la Tabla 14 se observan los niveles séricos de LH, FSH y PRL correspondientes al grupo de hámsteres controles mantenidos en FN, y a los grupos de animales sometidos entre 9 y 22 semanas a FC. Condiciones restrictivas de luminosidad, produjeron una marcada caída en los niveles circulantes de las tres hormonas hipofisarias. A las 9 semanas en FC, los niveles de FSH descendieron significativamente en comparación con el grupo control, permaneciendo disminuídos durante 7 semanas. Hacia las 18 semanas de permanencia en fotoinhibición, la concentración sérica de FSH recuperó sus niveles controles.

semanas en FC	LH (ng/ml)	FSH (ng/ml)	PRL (ng/ml)
FN	3.69±0.35 ^a	2.58±0.10 ^a	17.21±2.73 ^a
9	2.60±0.62 ^{a,c}	1.63±0.14 ^b	4.63±1.82 ^b
12	1.83±0.29 ^{a,d}	1.66±0.15 ^b	0.68±0.13 ^b
14	0.44±0.05 ^{b,d}	1.64±0.17 ^b	0.42±0.05 ^b
16	0.81±0.34 ^{b,c,d}	1.93±0.14 ^b	0.35±0.03 ^b
18	0.76±0.15 ^{b,c,d}	2.61±0.13 ^a	0.45±0.03 ^b
22	2.32±0.80 ^{a,d}	2.60±0.15 ^a	1.41±0.50 ^b

Tabla 14. INFLUENCIA DEL FOTOPERÍODO SOBRE EL PERFIL SÉRICO DE HORMONAS PROTEICAS.

Los niveles séricos de LH, FSH y PRL fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los valores representan la media ± ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; p < 0.05).

LH presentó su mínima concentración a las 14 semanas en fotoperíodo restrictivo, continuó significativamente disminuída en las siguientes 4 semanas, y a tiempos prolongados de exposición a FC (22 semanas) retornó espontáneamente a niveles cercanos al control (Tabla 14). La concentración sérica de PRL fue severamente reducida por la exposición a FC durante 9 semanas, y permaneció significativamente disminuída en las 13 semanas restantes de duración del experimento (Tabla 14).

Nueve semanas en fotoinhibición, produjeron una significativa reducción en los niveles séricos de T respecto del grupo de animales controles mantenidos en FN (Tabla 15).

semanas en FC	T (ng/ml)	DHT (ng/ml)	Diol (ng/ml)
FN	5.78±0.26 ^a	1.50±0.16 ^a	1.49±0.10 ^a
9	2.60±0.18 ^{b,c}	1.10±0.20 ^a	1.10±0.10 ^{a,b}
12	1.18±0.10 ^{b,c}	0.42±0.05 ^b	1.02±0.12 ^{a,b}
14	0.81±0.14 ^b	0.23±0.05 ^b	0.86±0.12 ^{a,b}
16	1.09±0.23 ^{b,c}	0.25±0.01 ^b	0.75±0.13 ^b
18	1.75±0.20 ^{b,c}	0.49±0.04 ^b	1.19±0.27 ^{a,b}
22	2.99±0.62 ^c	0.66±0.25 ^b	1.13±0.10 ^{a,b}

Tabla 15. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE EL PERFIL SERICO DE ANDROGENOS.

Los niveles séricos de Testosterona, DHT y Diol fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los valores representan la media ± ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

La caída en los niveles circulantes de T fue máxima a las 14 semanas, momento en el cual la concentración sérica de esta hormona, representó el 14% de los niveles controles. Sin embargo, cuando las condiciones de restricción lumínica continuaron, los niveles de T comenzaron su recuperación. A las 22 semanas en FC, la T restauró parcialmente su concentración sérica, aunque permaneció significativamente disminuída en comparación con la detectada en los animales controles (50% de los niveles normales) (Tabla 15). Los niveles circulantes de DHT siguieron un patrón similar a la concentración sérica de T. Hacia las 14-16 semanas, los niveles de DHT fueron 7 veces menores que en el grupo control (Tabla 15). La concentración sérica de Diol sólo fue significativamente reducida a las 16 semanas en FC, cuando la misma desciende a la mitad de los niveles en FN (Tabla 15).

1.5. NIVELES SERICOS DE INHIBINA B

1.5.1. Influencia del fotoperíodo sobre los niveles séricos de inhibina B

Como consecuencia de las marcadas alteraciones ocurridas en los niveles periféricos de FSH durante la transición regresión-recrudescencia en hámsteres Dorados; nos resultó de interés analizar, en el presente trabajo, el perfil sérico de inhibina B a fin de correlacionarlo con la concentración circulante de esta gonadotrofina.

La Fig. 24 muestra los niveles séricos de inhibina B en hámsteres Dorados adultos expuestos a FN o FC entre 9 y 22 semanas. Hacia las 9 semanas de permanencia en condiciones restrictivas de luminosidad, la concentración de inhibina B, no presentó diferencias significativas en comparación con los niveles controles, aunque la concentración circulante de FSH descendió marcadamente. Los niveles de inhibina B detectados, entre las 12 y 14 semanas en FC, representaron sólo el 25% de los datos obtenidos en el grupo control mantenido en FN. A las 22 semanas en fotoinhibición, la concentración sérica de inhibina B permaneció significativamente disminuída, no obstante los niveles periféricos normales de FSH.

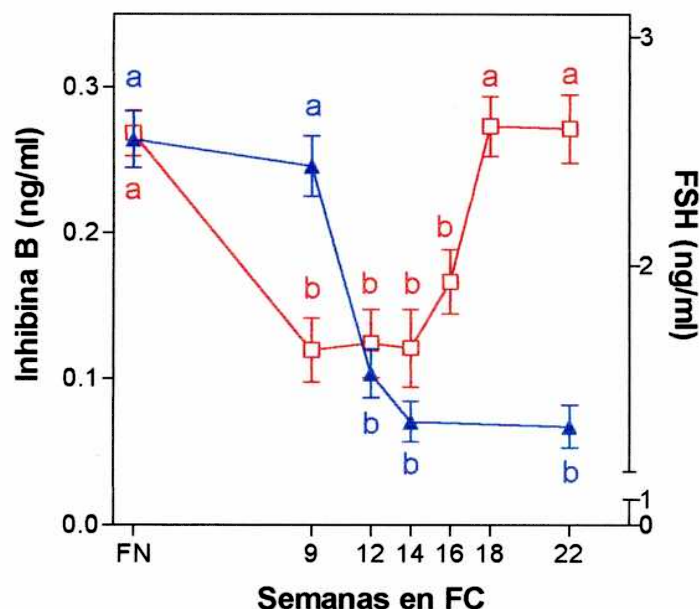


Figura 24. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES SERICOS DE FSH E INHIBINA B.

Los niveles séricos de FSH e Inhibina B fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

□ : FSH.

▲ : Inhibina B.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

1.6. PERFIL DE ANDROGENOS GONADALES

1.6.1. Influencia del fotoperíodo sobre el perfil de andrógenos gonadales

La Fig. 25 (panel A) muestra la concentración testicular (ng/g de tejido) de T, DHT y Diol en hámsteres expuestos a FN o FC entre 9 y 22 semanas.

Las concentraciones de T y DHT siguieron un perfil similar; ambas fueron significativamente reducidas después de 9 semanas en fotorestricción, y alcanzaron sus mínimos niveles entre las 14 y 18 semanas. Hacia las 22 semanas en FC, las concentraciones de T y DHT fueron parcialmente restauradas. La concentración

gonadal de Diol mostró una marcada reducción a las 14 semanas; y luego, retornó gradualmente hacia los niveles del grupo control. Cuando los resultados fueron expresados en términos de ng/mg de proteínas (datos no mostrados) o bien como contenido (en ng/testículo; Fig. 25, panel B), se observaron variaciones similares en los tres andrógenos analizados. El contenido testicular de T, DHT y Diol disminuyó luego de 9 semanas en FC, alcanzando niveles mínimos entre las 14 y 18 semanas. Hacia las 22 semanas, el contenido androgénico gonadal fue parcialmente recuperado, aunque permaneció significativamente disminuído en comparación con el grupo de animales en FN.

1.7. PERFIL DE ANDROGENOS EPIDIDIMARIOS

1.7.1 Influencia del fotoperíodo sobre el perfil de andrógenos epididimarios

Cuando la concentración epididimaria de T (ng/g de tejido) fue analizada, se observó una significativa reducción entre las 12 y 18 semanas en FC (Fig. 26, panel A). A las 16 y 18 semanas, DHT y Diol mostraron ser menores que los niveles de detección del ensayo; mientras que, a las 22 semanas de permanencia en fotoinhibición, se observó una tendencia hacia la recuperación de sus concentraciones epididimarias (Fig. 26, panel A). Un patrón similar fue detectado cuando los resultados se expresaron en términos de ng/mg de proteína o ng/mg de ADN (datos no mostrados). La exposición a fotoperíodo restrictivo produjo una caída significativa en el contenido epididimario de andrógenos. A las 16-18 semanas el contenido de T fue mínimo; mientras que, DHT y Diol fueron no detectables (Fig. 26, panel B).

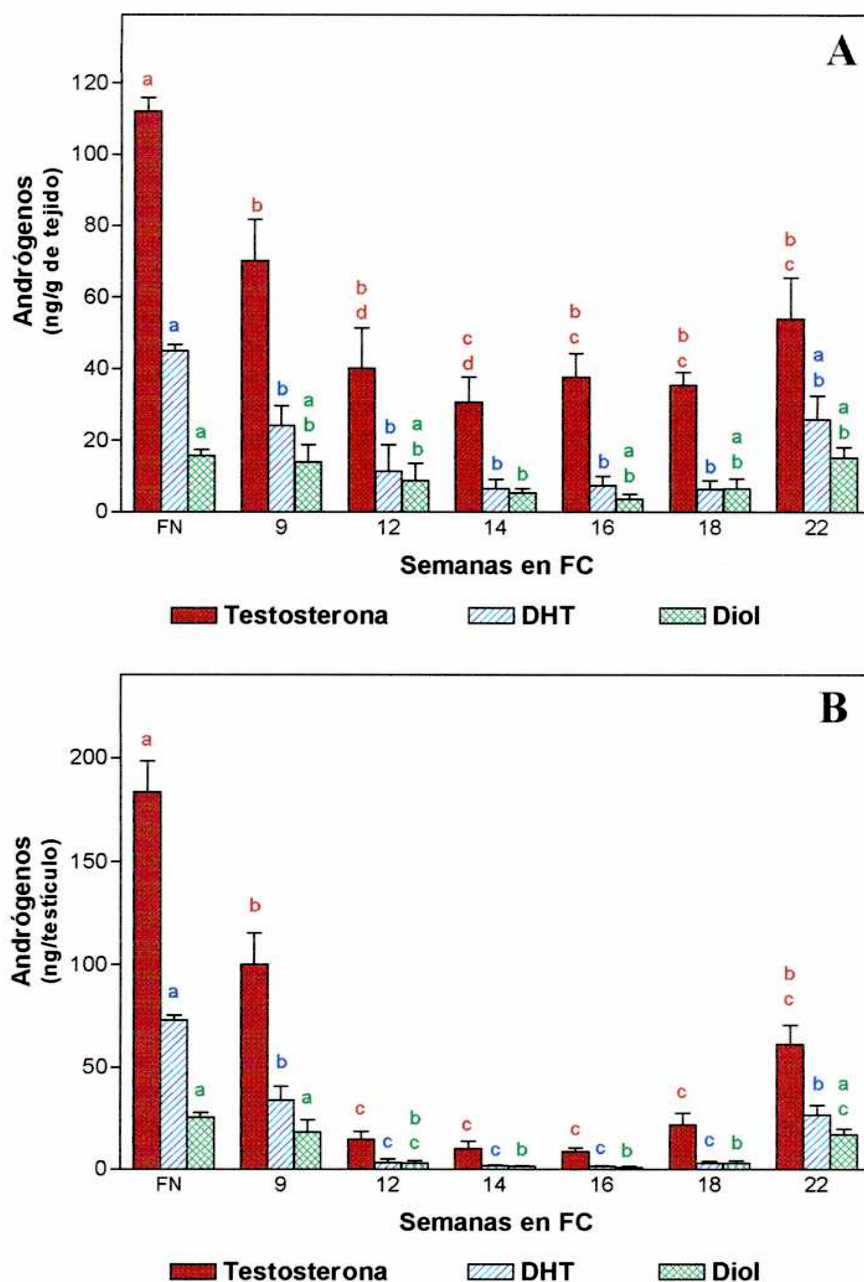


Figura 25. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES DE ANDROGENOS TESTICULARES.

La concentración y el contenido testicular de Testosterona, DHT y Diol fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Panel A: Concentración testicular de andrógenos (ng/g de tejido).

Panel B: Contenido testicular de andrógenos (ng/testículo).

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

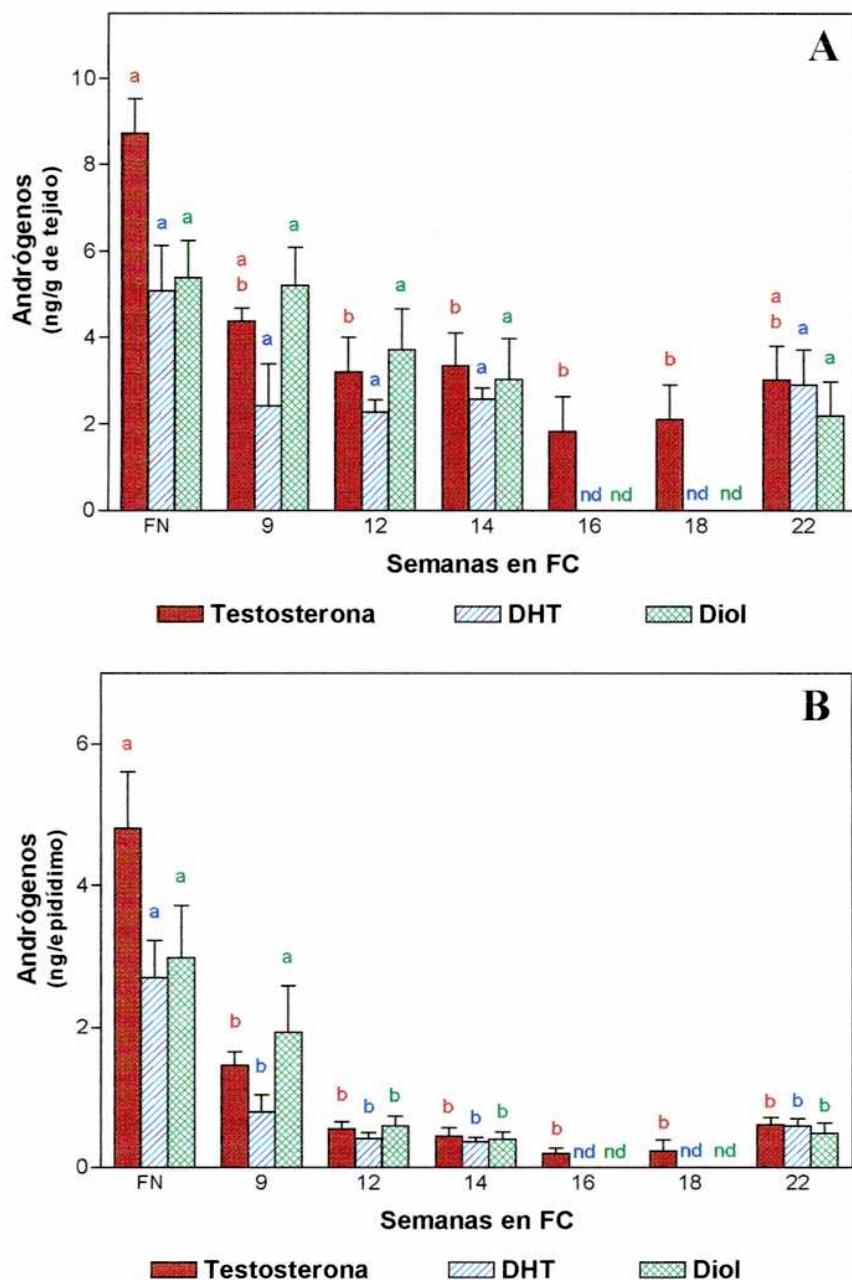


Figura 26. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES DE ANDROGENOS EPIDIDIMARIOS.

La concentración y el contenido epididimario de Testosterona, DHT y Diol fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Panel A: Concentración epididimaria de andrógenos (ng/g de tejido).

Panel B: Contenido epididimario de andrógenos (ng/epidídimo).

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

2. EFECTO DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES DE POLIAMINAS Y DE SUS ACETIL DERIVADOS EN TESTICULO Y VESICULAS SEMINALES

La concentración tisular de Put, Esp y Esp, es un parámetro altamente sensible y útil en la evaluación del trofismo de un órgano. Debido a las marcadas variaciones ocurridas en el peso testicular durante la exposición a FC, y a fin de establecer la influencia ejercida por el fotoperíodo sobre el metabolismo de las PA se determinaron, tanto en hámsteres adultos mantenidos en condiciones estándares de luminosidad como en animales sometidos a fotorestricción, los niveles gonadales de estos policationes y de sus acetil derivados, y la actividad ODC, principal enzima de su camino biosintético. Estos mismos parámetros fueron evaluados en vesículas seminales. Dichas glándulas fueron seleccionadas como tejido comparativo por su capacidad de sintetizar importantes niveles de PA aunque, como ha sido previamente descrito por Piik y col., (1977), no realizan una activa secreción de estos policationes al líquido seminal.

2.1. TESTICULO

2.1.1. Niveles de poliaminas

La Fig. 27 (panel A) ilustra la concentración testicular de PA (nmol/g de tejido) presente en los testículos de animales mantenidos en FN o sometidos a fotoinhibición por el término de 22 semanas. A las 14-16 semanas de permanencia en FC, las gónadas mostraron un incremento de 2 a 3 veces en la concentración de Put, Esp y Esp. Similarmente, cuando la concentración de PA fue expresada en términos de nmol/mg de proteínas, se observó un significativo aumento durante el período de máxima regresión testicular (datos no mostrados). Hacia las 18-22 semanas, la concentración de PA gonadales retornó a sus niveles controles (Fig. 27, panel A). Tanto en condiciones normales como restrictivas de luminosidad, el polication en concentración más elevada fue la Esp que posee el mayor número de grupos

aminos. Contrariamente, el contenido gonadal de Put, Esd y Esp (nmol/testículo) descendió significativamente hacia las 12-18 semanas en FC (Fig. 27, panel B).

Cuando la concentración testicular de PA totales (Put + Esd + Esp) fue comparada con el peso testicular, se detectó una correlación inversa entre ambos parámetros ($r = -0.811$; $p < 0.001$) (Fig. 28, panel A). Así, el momento de máxima regresión gonadal es acompañado por altos niveles de PA; mientras que, durante la recuperación testicular espontánea la concentración de estas policiones disminuye hasta alcanzar los niveles del grupo control. Por otra parte, el contenido total de PA presentó una correlación directa con el peso testicular ($r = 0.942$, $p < 0.001$) (Fig. 28, panel B).

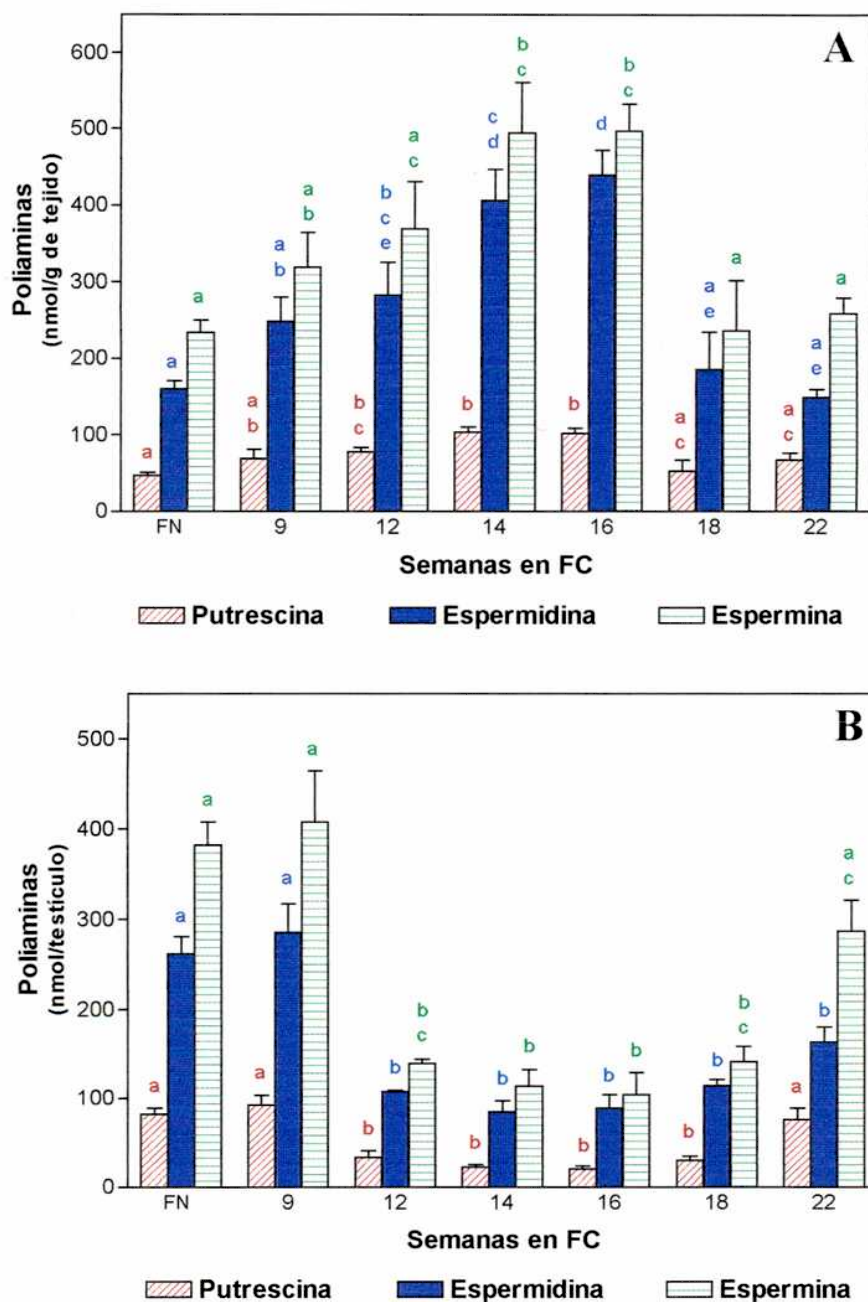


Figura 27. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES DE POLIAMINAS TESTICULARES.

La concentración y el contenido testicular de putrescina, espermidina y espermina, fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Panel A: Concentración testicular de poliaminas (nmol/g de tejido).

Panel B: Contenido testicular de poliaminas (nmol/testículo).

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

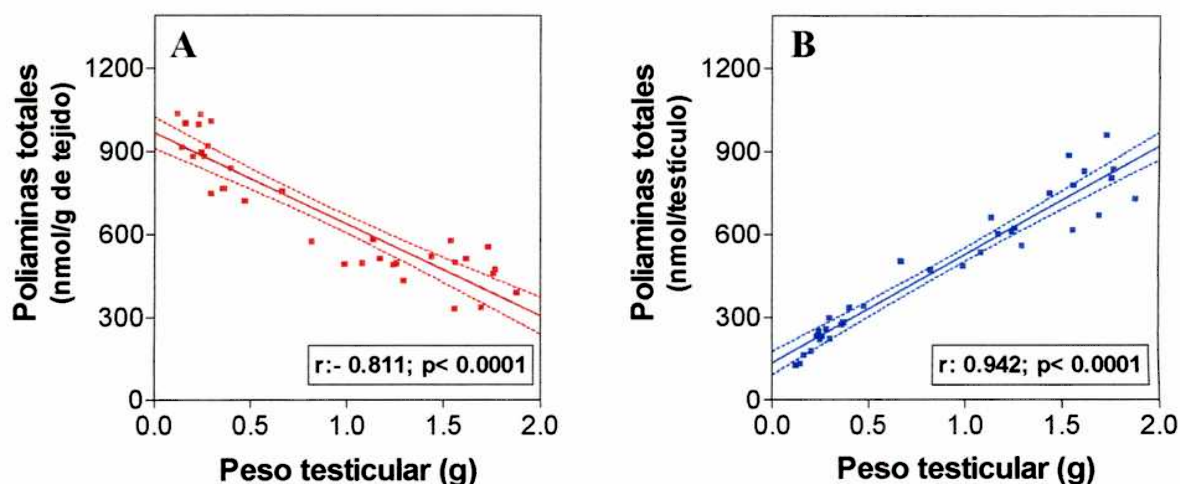


Figura 28. ANALISIS DE REGRESION LINEAL ENTRE EL PESO TESTICULAR Y LOS NIVELES GONADALES DE POLIAMINAS.

El peso testicular y los niveles gonadales de putrescina, espermidina y espermina, fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Panel A: Concentración testicular de poliaminas (nmol/g de tejido) vs peso testicular.

Panel B: Contenido testicular de poliaminas (nmol/testículo) vs peso testicular.

Los parámetros analizados presentaron una correlación altamente significativa ($p < 0.0001$).

2.1.2. Niveles de acetil poliaminas

Las concentraciones (nmol/g de tejido) de A-put, N¹ A-esd, N⁸ A-esd y N¹ A-esp, no mostraron cambios significativos como consecuencia de la exposición a FC (Tabla 16). Del mismo modo, si la concentración es expresada en términos de nmol/mg de proteínas, los niveles permanecen sin modificaciones durante todo el experimento (datos no mostrados).

El mantenimiento de los animales en fotorestricción, produjo una caída significativa en el contenido gonadal de A-PA alcanzando sus mínimos niveles hacia las 14-16 semanas; mientras que, luego de 18-22 semanas, se detectó una lenta recuperación (Tabla 16).

La principal A-PA detectada, tanto en FN como restrictivo, fue la A-put (Tabla 16).

semanas en FC	Acetil Putrescina	N ¹ -Acetil Espermidina	N ⁸ -Acetil Espermidina	N ¹ -Acetil Espermina
FN nmol/testículo	75.38±8.15 ^a	13.83±1.29 ^a	12.86±1.33 ^a	12.28±1.57 ^a
nmol/g. tejido	43.81±4.81 ^a	8.02±0.73 ^a	7.43±0.70 ^a	7.11±0.87 ^a
9 nmol/testículo	58.24±4.67 ^{a,c}	10.38±1.00 ^a	10.68±1.57 ^{a,b}	10.94±2.84 ^{a,b}
nmol/g. tejido	40.87±2.44 ^a	7.39±0.94 ^a	7.62±1.29 ^a	7.79±2.07 ^a
12 nmol/testículo	30.64±9.30 ^{b,d}	2.18±0.32 ^b	5.40±2.16 ^{b,c}	5.04±2.12 ^{b,c}
nmol/g. tejido	52.16±5.05 ^a	10.74±3.38 ^a	8.53±1.62 ^a	9.11±2.31 ^a
14 nmol/testículo	11.98±2.22 ^b	2.18±0.43 ^b	2.45±0.61 ^c	2.05±0.88 ^c
nmol/g. tejido	49.26±9.21 ^a	8.87±1.56 ^a	9.13±2.06 ^a	7.83±2.66 ^a
16 nmol/testículo	18.88±4.23 ^{b,d}	3.52±0.55 ^b	3.08±0.52 ^c	3.65±1.08 ^{b,c}
nmol/g. tejido	45.69±10.10 ^a	8.31±1.16 ^a	7.16±0.97 ^a	9.07±1.17 ^a
18 nmol/testículo	23.96±2.76 ^{b,d}	3.52±0.63 ^b	3.50±0.45 ^c	2.96±0.26 ^c
nmol/g. tejido	36.65±5.37 ^a	5.86±1.68 ^a	5.69±1.35 ^a	5.02±0.70 ^a
22 nmol/testículo	40.38±1.85 ^{c,d}	5.71±0.91 ^b	6.30±0.85 ^{b,c}	4.99±0.68 ^{b,c}
nmol/g. tejido	40.63±2.98 ^a	5.55±0.60 ^a	6.39±1.16 ^a	5.02±0.78 ^a

Tabla 16. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES DE ACETIL POLIAMINAS TESTICULARES.

La concentración y el contenido testicular de acetil putrescina, N¹-acetil espermidina, N⁸-acetil espermidina y N¹-acetil espermina, fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9, 12, 14, 16, 18 y 22 semanas.

Los valores representan la media ± ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; p < 0.05).

Cuando el contenido testicular de A-PA totales (A-put + N¹ A-esd + N⁸ A-esd + N¹ A-esp), fue comparado con el contenido de PA en este órgano, se detectó una correlación significativa entre ambos parámetros (r=0.834; p<0.001) (Fig. 29).

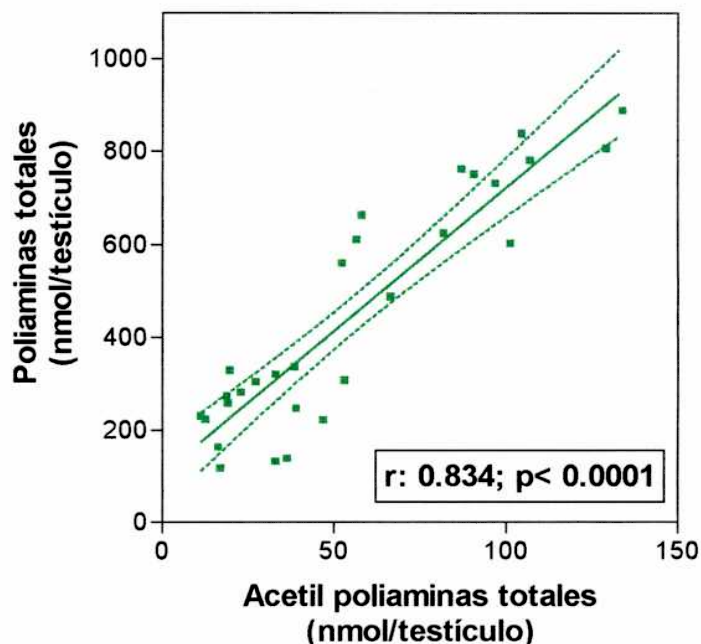


Figura 29. ANALISIS DE REGRESION LINEAL ENTRE EL CONTENIDO GONADAL DE POLIAMINAS Y SUS ACETIL DERIVADOS.

El contenido testicular de putrescina, espermidina, espermina, acetil putrescina, N^1 -acetil espermidina, N^8 -acetil espermidina y N^1 -acetil espermina, fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los parámetros analizados presentaron una correlación altamente significativa ($p < 0.0001$).

2.1.3. Actividad ornitina decarboxilasa

Como consecuencia de las variaciones detectadas en los niveles testiculares de PA en nuestro modelo experimental, nos resultó de interés analizar la actividad de la enzima ODC, limitante en el camino biosintético de dichos policationes.

La exposición de hámsteres adultos a FC durante 12 semanas, produjo un marcado incremento en la actividad específica ODC (pmol/h/mg de proteínas), que precedió, en 2-4 semanas, al aumento en la concentración tisular de PA (Fig. 30, panel A). Cuando la actividad ODC se expresó en términos de pmol/h/g de tejido (datos no mostrados), pudo detectarse un significativo incremento durante el mismo período de fotoinhibición. A las 22 semanas de permanencia en FC, la actividad ODC descendió cerca de sus niveles controles (Fig. 30, panel A). Al expresar la actividad

enzimática por testículo, se detectó una notoria disminución hacia las 14-16 semanas en FC y luego, durante el período de recrudescencia, se observó una tendencia a su recuperación (Fig. 30, panel B).

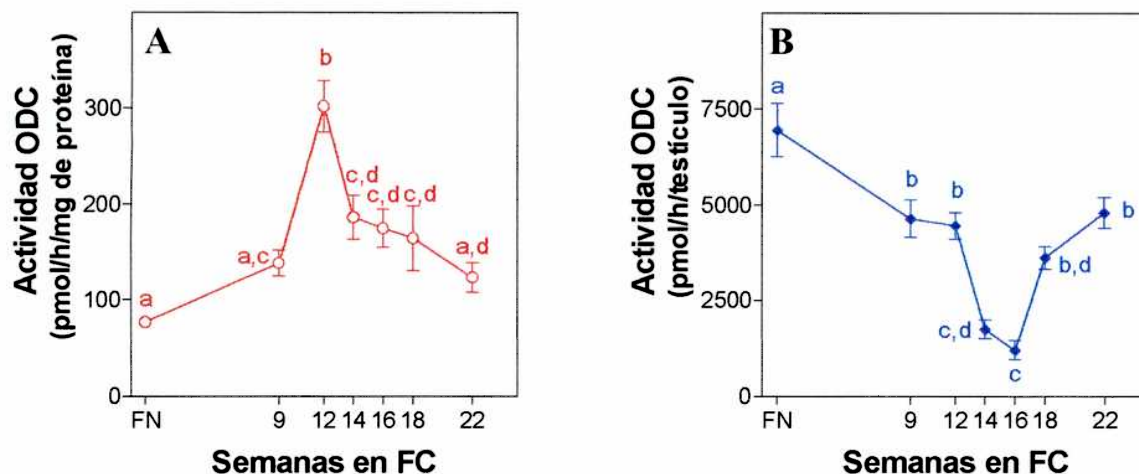


Figura 30. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LA ACTIVIDAD ORNITINA DECARBOXILASA TESTICULAR.

La actividad ODC testicular fue determinada en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Panel A: Actividad ODC expresada en términos de pmol/h/mg de proteínas.

Panel B: Actividad ODC expresada en términos de pmol/h/testículo.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

2.2. VESICULAS SEMINALES

2.2.1. Niveles de poliaminas

Con el propósito de estudiar si órganos hormono-dependientes modifican sus niveles de PA como consecuencia de cambios en la información fótica, la concentración de estos policationes en vesículas seminales fue analizada en hámsteres expuestos a condiciones normales o restrictivas de luz.

Hacia las 16 semanas de permanencia en fotoperíodo inhibitorio, la concentración de Put, Esd y Esp (nmol/g de tejido) aumentó 4, 2 y 5 veces, respectivamente, respecto del grupo control; para retornar rápidamente a sus niveles

normales a las 18 semanas (Fig. 31, panel A). Cuando la concentración vesicular de PA fue expresada en términos de nmol/mg de proteínas o nmol/mg de ADN, fue detectado un aumento similar tanto para Put como Esp; mientras que, Esd no presentó variaciones significativas (datos no mostrados). Durante la permanencia en condiciones estándares de luminosidad, el polición que mostró la mayor concentración fue Esd; en cambio, durante la etapa de involución reproductiva la Esp alcanzó los máximos niveles tisulares (Fig. 31, panel A). Sin embargo, al expresar los resultados como nmol/vesícula seminal (Fig. 31, panel B), el contenido de las 3 PA disminuyó significativamente en respuesta a la exposición de los animales a FC durante 14-16 semanas. Luego, a tiempos prolongados de permanencia en FC, se observó una recuperación parcial en los niveles correspondientes a Put y Esd, sin variaciones significativas en Esp.

A todos los tiempos de permanencia en fotoinhibición analizados, se observó una marcada relación entre la concentración tisular de PA totales y el peso de las vesículas, pudiéndose establecer así una significativa correlación inversa ($r = -0.763$, $p < 0.001$) (Fig. 32, panel A). En cambio, el contenido total de PA y el peso glandular mostraron una correlación directa ($r = 0.944$, $p < 0.001$) (Fig. 32, panel B).

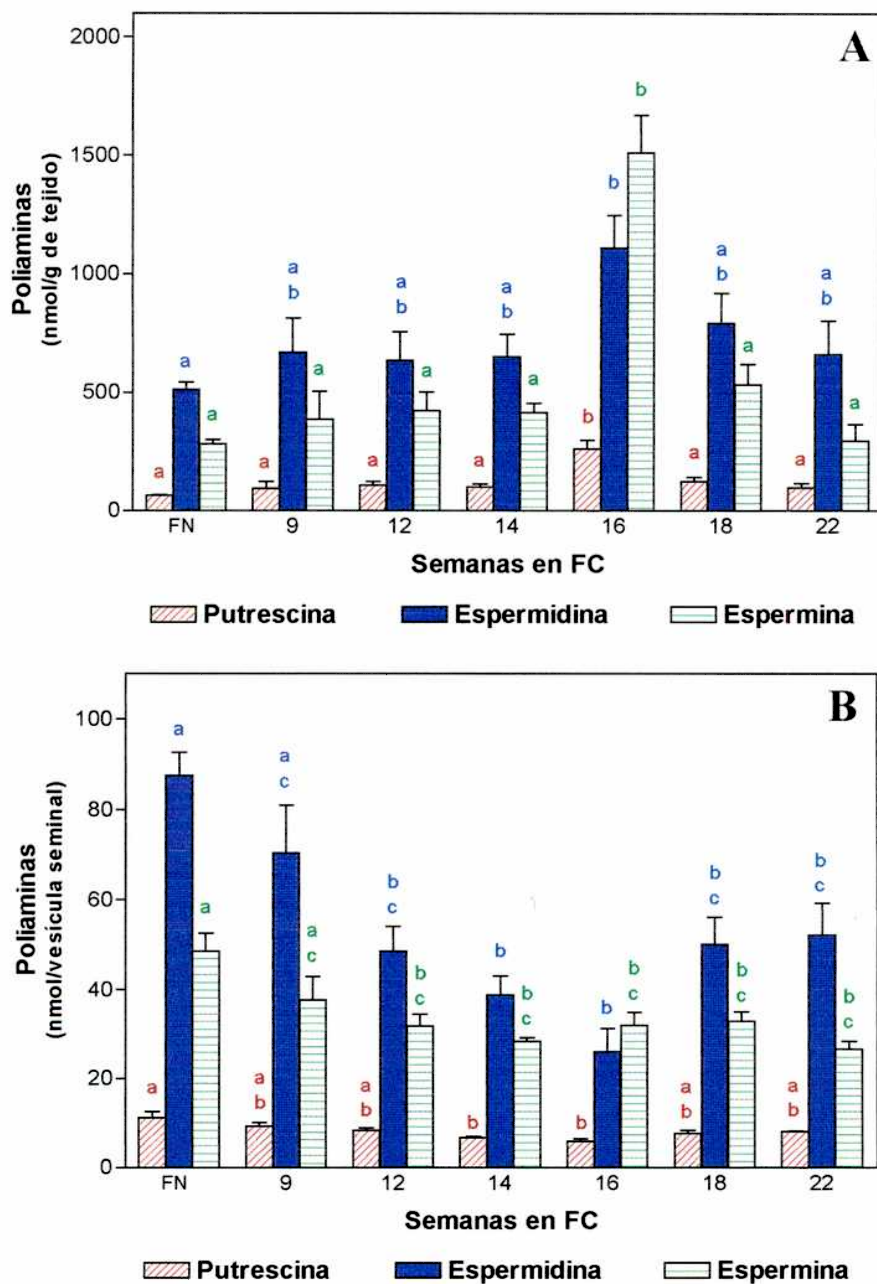


Figura 31. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES VESICULARES DE POLIAMINAS.

La concentración y el contenido de putrescina, espermidina y espermina fueron determinados en cada vesícula seminal de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Panel A: Concentración de poliaminas en vesículas seminales (nmol/g de tejido).

Panel B: Contenido de poliaminas en vesículas seminales (nmol/v. seminal).

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

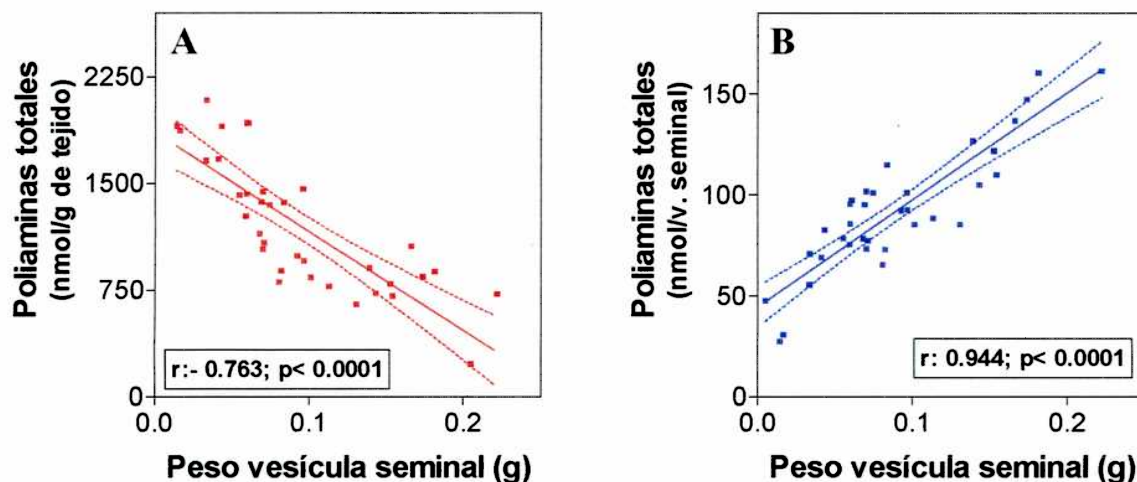


Figura 32. ANALISIS DE REGRESION LINEAL ENTRE EL PESO VESICULAR Y LOS NIVELES GLANDULARES DE POLIAMINAS.

El peso de cada vesícula seminal y los niveles glandulares de putrescina, espermidina y espermina, fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Panel A: Concentración glandular de poliaminas (nmol/g de tejido) vs peso de las v. seminales.

Panel B: Contenido glandular de poliaminas (nmol/v. seminal) vs peso de las v. seminales.

Los parámetros analizados presentaron una correlación altamente significativa ($p < 0.0001$).

2.2.2. Niveles de acetil poliaminas

Las concentraciones (en términos de nmol/g de tejido) de A-put, N¹ A-esd, N⁸ A-esd y N¹ A-esp en vesículas seminales, evidenciaron un marcado incremento a las 16 semanas, para retornar posteriormente a los niveles controles hacia las 22 semanas (Tabla 17). De igual modo, si las concentraciones de A-put, N¹ A-esd y N¹ A-esp son expresadas en términos de nmol/mg de proteína o nmol/mg de ADN, se detecta un marcado aumento hacia las 16-18 semanas de exposición a FC; mientras que, la concentración de N⁸ A-esd no presenta modificaciones significativas (datos no mostrados). La exposición a fotoperíodo inhibitorio, produjo una caída significativa en el contenido de todas las A-PA hacia las 16 semanas; y una lenta recuperación de los niveles a tiempos mayores (Tabla 17).

La principal A-PA detectada en todos los grupos estudiados fue A-put (Tabla 17).

semanas en FC	Acetil Putrescina	N ¹ -Acetil Espermidina	N ⁸ -Acetil Espermidina	N ¹ -Acetil Espermina
FN nmol/v.s.	9.23±0.60 ^a	5.88±0.51 ^a	5.47±0.93 ^a	3.79±0.37 ^a
nmol/g. tejido	44.27±3.89 ^a	29.41±2.90 ^a	26.91±4.89 ^a	18.02±1.82 ^a
9 nmol/v.s.	6.32±0.28 ^b	2.60±0.12 ^b	2.00±0.23 ^b	1.95±0.05 ^b
nmol/g. tejido	78.71±11.24 ^a	32.67±5.14 ^{a,b}	24.23±3.42 ^a	24.14±3.13 ^a
12 nmol/v.s.	5.37±0.31 ^b	2.88±0.47 ^b	2.24±0.60 ^b	1.97±0.27 ^b
nmol/g. tejido	85.20±4.95 ^a	53.44±9.59 ^{a,c}	35.54±9.56 ^{a,c}	31.21±4.22 ^{a,b}
14 nmol/v.s.	6.13±0.19 ^b	3.34±0.49 ^b	2.38±0.48 ^b	2.10±0.20 ^b
nmol/g. tejido	79.32±2.84 ^a	49.04±9.69 ^{a,d}	30.54±5.12 ^a	26.47±1.84 ^a
16 nmol/v.s.	4.55±0.08 ^b	2.83±0.25 ^b	1.67±0.26 ^b	1.66±0.16 ^b
nmol/g. tejido	224.42±20.70 ^b	116.46±32.52 ^c	76.44±11.53 ^{b,c}	85.28±19.53 ^{b,c}
18 nmol/v.s.	4.63±0.12 ^b	1.73±0.15 ^b	1.12±0.11 ^b	1.83±0.38 ^b
nmol/g. tejido	238.25±25.91 ^b	94.18±18.95 ^{b,c,d}	58.76±10.93 ^{a,c}	87.39±11.91 ^c
22 nmol/v.s.	5.80±0.39 ^b	3.45±0.46 ^b	2.01±0.43 ^b	1.91±0.22 ^b
nmol/g. tejido	97.27±19.56 ^a	59.20±16.28 ^{a,c}	36.18±12.56 ^{a,c}	31.55±6.03 ^{a,b}

Tabla 17. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES VESICULARES DE ACETIL POLIAMINAS.

La concentración y el contenido de acetil putrescina, N¹-acetil espermidina, N⁸-acetil espermidina y N¹-acetil espermina fueron determinados en cada vesícula seminal de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los valores representan la media ± ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; p < 0.05).

Cuando el contenido vesicular de A-PA totales, fue comparado con el contenido de PA en esta glándula, se detectó una correlación significativa entre ambos parámetros (r=0.836; p<0.0001) (Fig. 33).

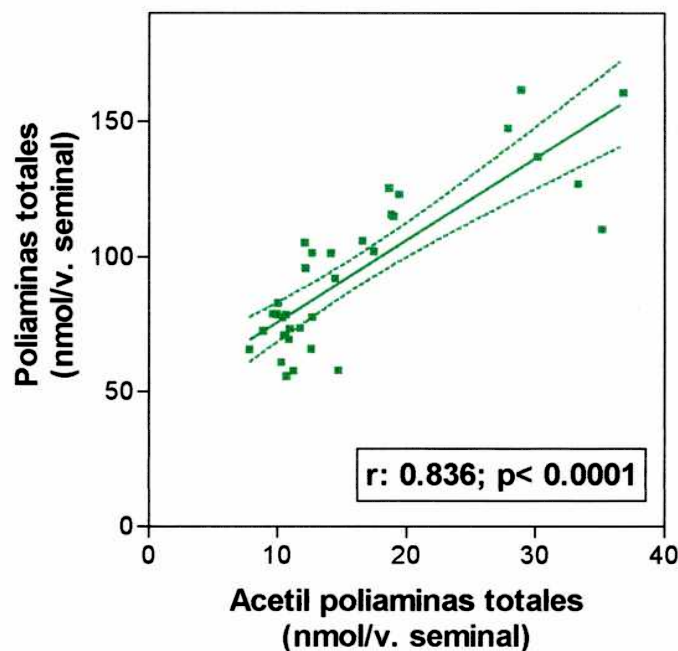


Figura 33. ANALISIS DE REGRESION LINEAL ENTRE EL CONTENIDO VESICULAR DE POLIAMINAS Y SUS ACETIL DERIVADOS.

El contenido de putrescina, espermidina, espermina, acetil putrescina, N^1 -acetil espermidina, N^8 -acetil espermidina y N^1 -acetil espermina fueron determinados en cada vesícula seminal de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los parámetros analizados presentaron una correlación altamente significativa ($p < 0.0001$).

2.2.3. Actividad ornitina decarboxilasa

Como consecuencia del marcado aumento observado en la concentración vesicular de PA durante la etapa de máxima involución reproductiva, nos resultó de interés detectar la actividad ODC en nuestro modelo experimental. Notoriamente, el incremento en la concentración de los 3 policationes en vesículas seminales no fue acompañado por un aumento en la actividad enzimática específica (en pmol/h/mg de proteína) sino que, contrariamente, se detectó un caída significativa de la misma hacia las 14-16 semanas de exposición a FC (Fig. 34, panel A). Similarmente,

cuando la actividad ODC fue expresada en términos de pmol/h/g de tejido o pmol/h/mg de ADN, se observó una disminución significativa de los niveles durante la fase de regresión reproductiva (datos no mostrados). Del mismo modo, la actividad ODC por vesícula seminal descendió a las 14-16 semanas, para retornar a niveles similares a los hallados en los animales controles, a las 22 semanas de permanencia en FC (Fig. 34, panel B).

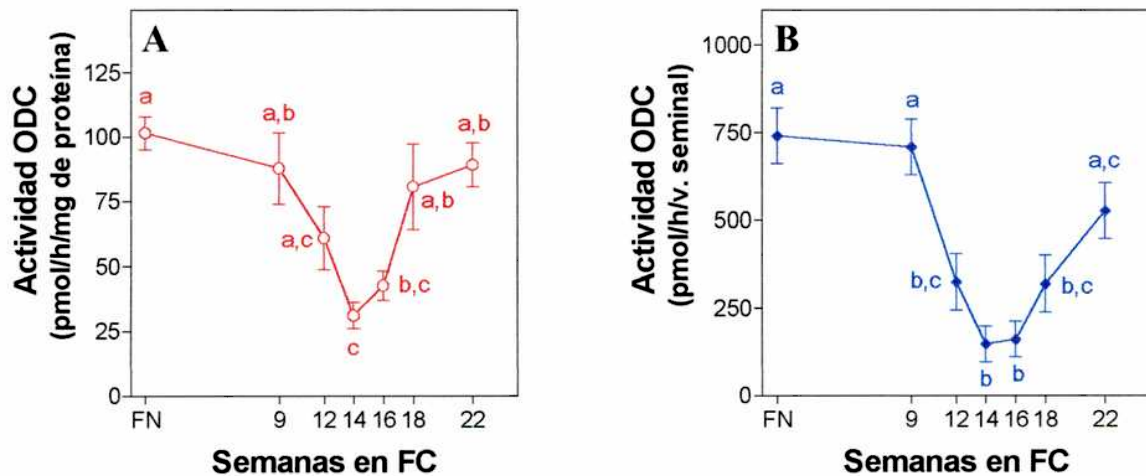


Figura 34. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LA ACTIVIDAD ORNITINA DECARBOXILASA VESICULAR.

La actividad ODC fue determinada en cada vesícula seminal de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Panel A: Actividad ODC expresada en términos de pmol/h/mg de proteínas.

Panel B: Actividad ODC expresada en términos de pmol/h/v. seminal.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

3. NEUROTRANSMISORES EN ORGANOS REPRODUCTIVOS

Diversos neurotransmisores han sido encontrados en órganos periféricos no neuronales donde participarían en la modulación de ciertos procesos metabólicos.

La presencia de GABA y 5-HT fue evaluada en testículo y/o glándulas sexuales accesorias de hámsteres en diferentes etapas del desarrollo sexual: prepubertad, pubertad y madurez; y en distintos estadios funcionales fotoinducidos: regresión y recrudescencia. El estudio de la biosíntesis endógena y/o el catabolismo de estos neurotransmisores, fue realizado a través de la determinación de sustratos, catabolitos y/o actividades enzimáticas.

3.1. TESTICULO

3.1.1. INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES TESTICULARES DE GABA

3.1.1.1. Niveles testiculares de GABA

3.1.1.1.1. *En el proceso de desarrollo sexual*

La Fig. 35 muestra los niveles gabaérgicos en testículos de hámsteres de las especies Dorado (paneles A y B) y Djungarian (paneles C y D), en distintas etapas del proceso de desarrollo sexual. GABA se halla presente en las gónadas de ambas especies a todas las edades estudiadas. En hámsteres Dorados, la concentración testicular del neurotransmisor (nmol/g de tejido) mostró un claro incremento a los 30 días de edad (panel A). Un patrón similar fue detectado en los testículos de la especie Djungarian, con un significativo aumento en la concentración gabaérgica hacia los 36 días de edad (panel C). Sin embargo, los niveles de GABA presentes en testículos de la especie Djungarian en la etapa prepuberal, fueron 2-3 veces menores que los determinados en hámsteres Dorados (paneles A y C). Cuando la

concentración gonadal de GABA fue expresada en nmol/mg de proteínas, se observaron, tanto en hámsteres Dorados como en Djungarian, variaciones similares a las detectadas cuando los niveles se expresan en nmol/g de tejido (datos no mostrados). El contenido gonadal de GABA (nmol/testículo) mostró un perfil especie-específico (paneles B y D). En hámsteres Dorados, un aumento en el contenido gonadal del neurotransmisor fue observado a los 30 días de edad, seguido por una leve caída hacia los 36 días, y un posterior incremento de los niveles en paralelo con la edad del animal hasta alcanzar la adultez (panel B). En contraste, hámsteres de la especie Djungarian, presentaron un claro aumento en el contenido gonadal de GABA a los 36 días, y un posterior descenso del 80% hacia los 46 días de edad. Entre los 46 y 90 días, no se observaron cambios significativos en el contenido testicular de GABA en hámsteres Djungarian (panel D).

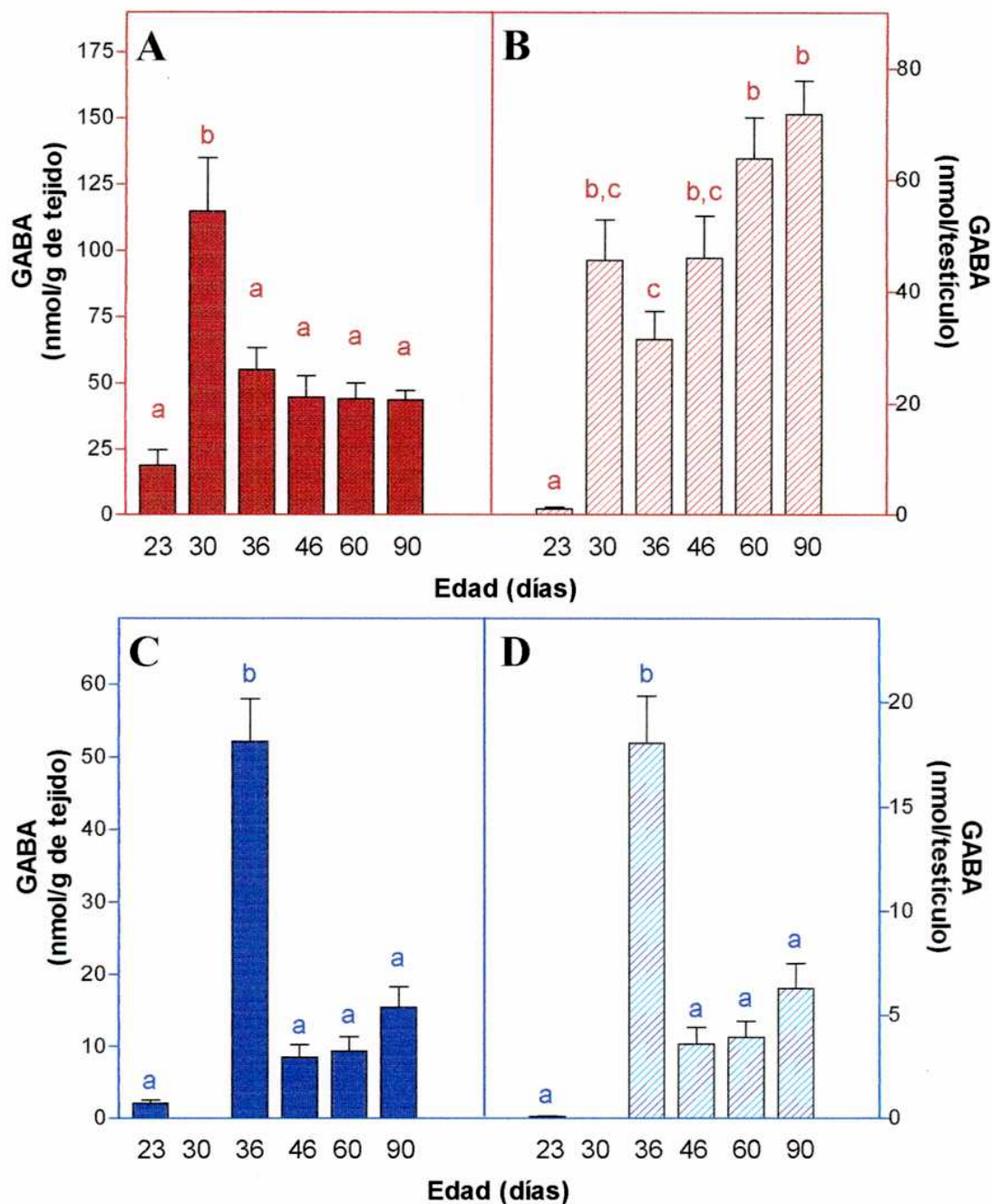


Figura 35. NIVELES TESTICULARES DE ACIDO γ -AMINO BUTIRICO (GABA) EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

La concentración y el contenido testicular de GABA fueron determinados en hámsteres de las especies Dorado y Djungarian de 23,30,36,46,60 y 90 días de edad.

Paneles A y B: Concentración (nmol/g de tejido) y Contenido (nmol/testículo) testicular de GABA en hámsteres de la especie Dorado.

Paneles C y D: Concentración (nmol/g de tejido) y Contenido (nmol/testículo) testicular de GABA en hámsteres de la especie Djungarian.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

3.1.1.1.2. Influencia del fotoperíodo sobre los niveles testiculares de GABA

La Fig. 36 (panel A) ilustra la concentración testicular de GABA (nmol/g de tejido) en los diferentes grupos experimentales sometidos a FN o FC entre 9 y 22 semanas. Durante el período de máxima involución gonadal (12-16 semanas en FC), se observó un aumento en la concentración del neurotransmisor del 100% respecto de los niveles encontrados en el grupo control (70 nmol/g de tejido vs 35 nmol/g de tejido). Posteriormente, en la etapa de recrudescencia testicular (18-22 semanas en fotorestricción), la concentración descendió hasta alcanzar niveles comparables a los detectados en los animales mantenidos a FN.

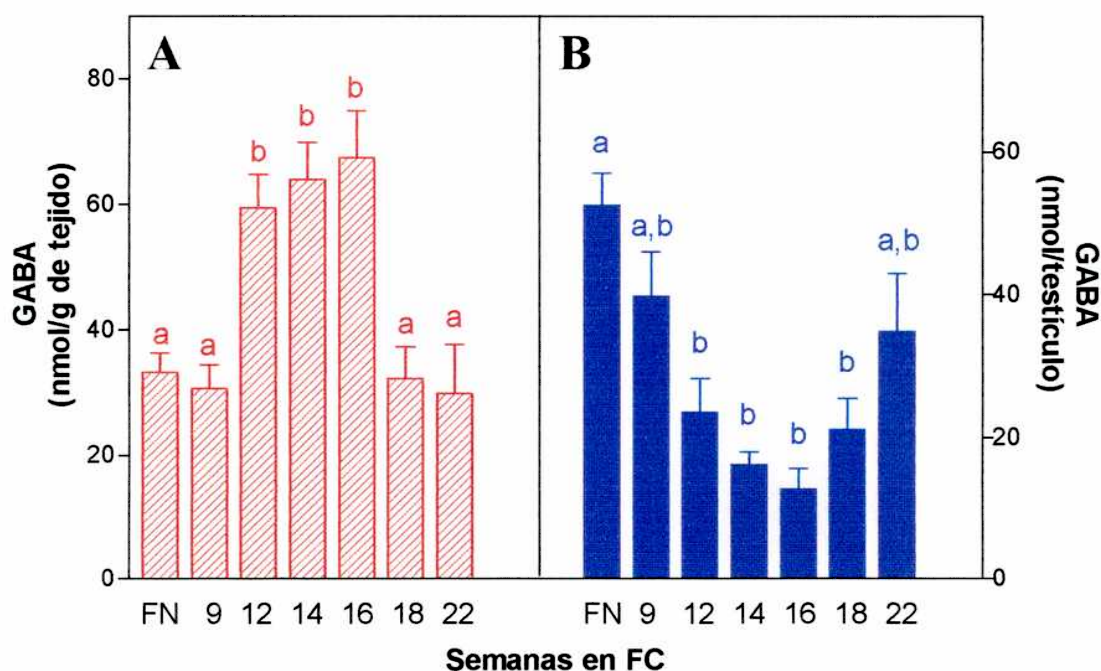


Figura 36. INFLUENCIA DEL FOTOPERÍODO SOBRE LOS NIVELES TESTICULARES DE ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO (GABA).

La concentración y el contenido testicular de GABA fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Panel A: Concentración testicular de GABA (nmol/g de tejido).

Panel B: Contenido testicular de GABA (nmol/testículo).

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

Cuando los niveles fueron expresados en nmol/mg de proteína, los mismos describieron un patrón similar al observado en términos de nmol/g de tejido (datos no mostrados). La exposición a FC produjo una caída significativa en el contenido gonadal de GABA, detectándose los mínimos niveles hacia las 14-16 semanas; mientras que, a tiempos mayores de permanencia en fotoinhibición (22 semanas), retornó a sus niveles controles (Fig. 36, panel B).

3.1.1.2. Biosíntesis testicular de GABA

3.1.1.2.1. Ácido glutámico. Niveles testiculares

3.1.1.2.1.1. En el proceso de desarrollo sexual

La Fig. 37 muestra los niveles de Glut en testículos de hámsteres de las especies Dorado (paneles A y B) y Djungarian (paneles C y D) durante su ontogenia. En hámsteres Dorados, la concentración testicular de Glut ($\mu\text{mol/g}$ de tejido) aumentó significativamente a los 30 días de edad, y luego permaneció sin cambios hasta la adultez (panel A). Resultados similares fueron obtenidos cuando los niveles se expresaron en términos de $\mu\text{mol/mg}$ de proteínas (datos no mostrados). En cambio, el contenido de este neurotransmisor presentó un incremento concomitante con la edad del animal (panel B).

En hámsteres de la especie Djungarian, la concentración gonadal de Glut ($\mu\text{mol/g}$ de tejido) no sufrió modificaciones significativas en ninguna de las edades analizadas (panel C). La expresión de los niveles en términos de $\mu\text{mol/mg}$ de proteínas tampoco presentó cambios significativos en la concentración testicular de Glut durante la ontogenia del hámster Djungarian (datos no mostrados). En cambio, el contenido testicular de este neurotransmisor aumentó significativamente a los 30 días de edad, alcanzó sus máximos niveles a los 36 días, y posteriormente descendió en la etapa puberal-adulta (panel D).

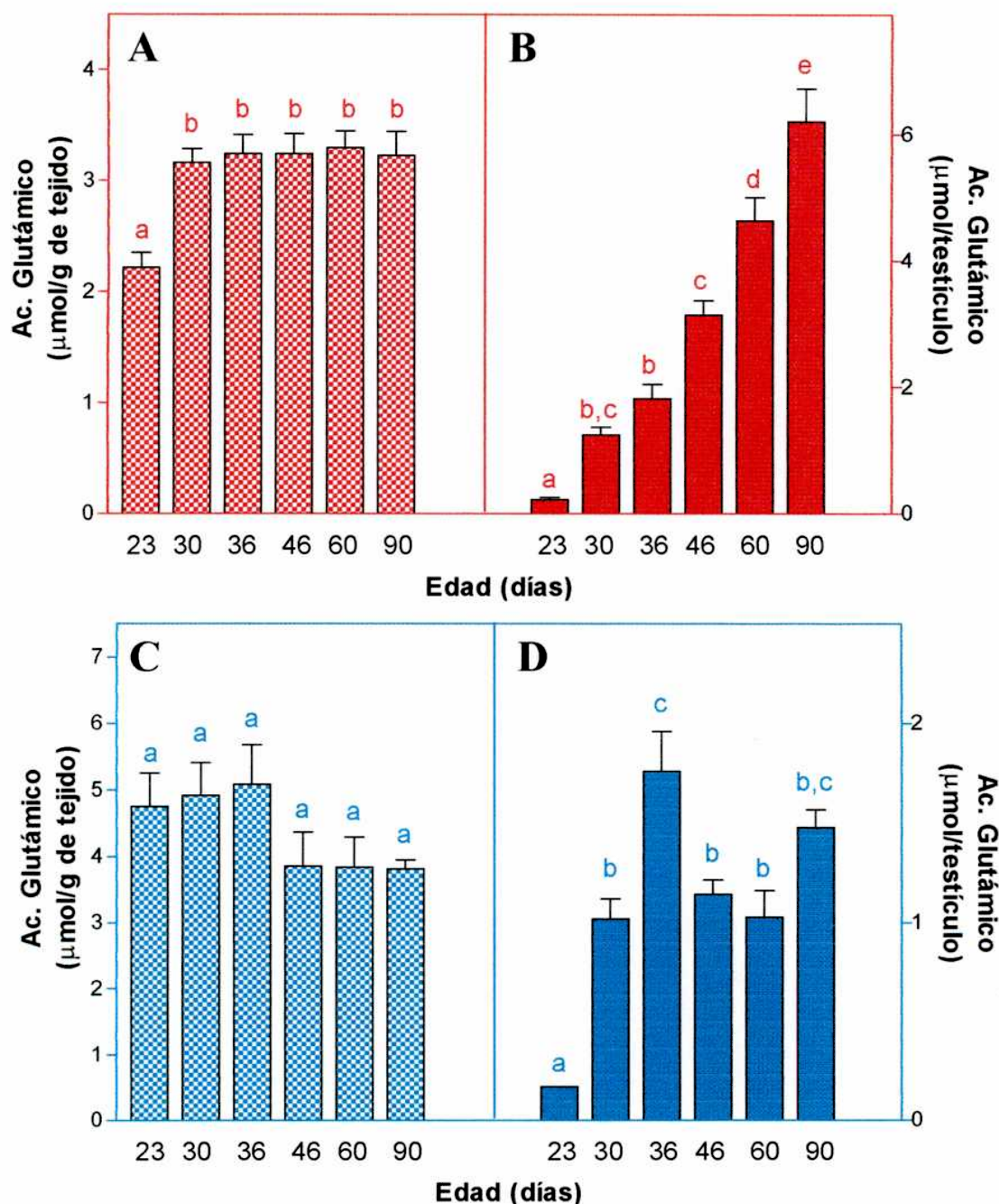


Figura 37. NIVELES TESTICULARES DE ACIDO GLUTAMICO EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

La concentración y el contenido testicular de ácido glutámico fueron determinados en hámsteres de las especies Dorado y Djungarian de 23,30,36,46,60 y 90 días de edad.

Paneles A y B: Concentración ($\mu\text{mol/g}$ de tejido) y Contenido ($\mu\text{mol/testículo}$) de ácido glutámico en hámsteres de la especie Dorado.

Paneles C y D: Concentración ($\mu\text{mol/g}$ de tejido) y Contenido ($\mu\text{mol/testículo}$) de ácido glutámico en hámsteres de la especie Djungarian.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

El análisis de regresión lineal entre el contenido gonadal de Glut y GABA mostró un coeficiente $r = 0.895$ en hámsteres Dorados (Fig. 38, panel A), y un coeficiente $r = 0.819$ en hámsteres de la especie Djungarian (Fig. 38, panel B); ambos considerados estadísticamente muy significativos ($p < 0.0001$).

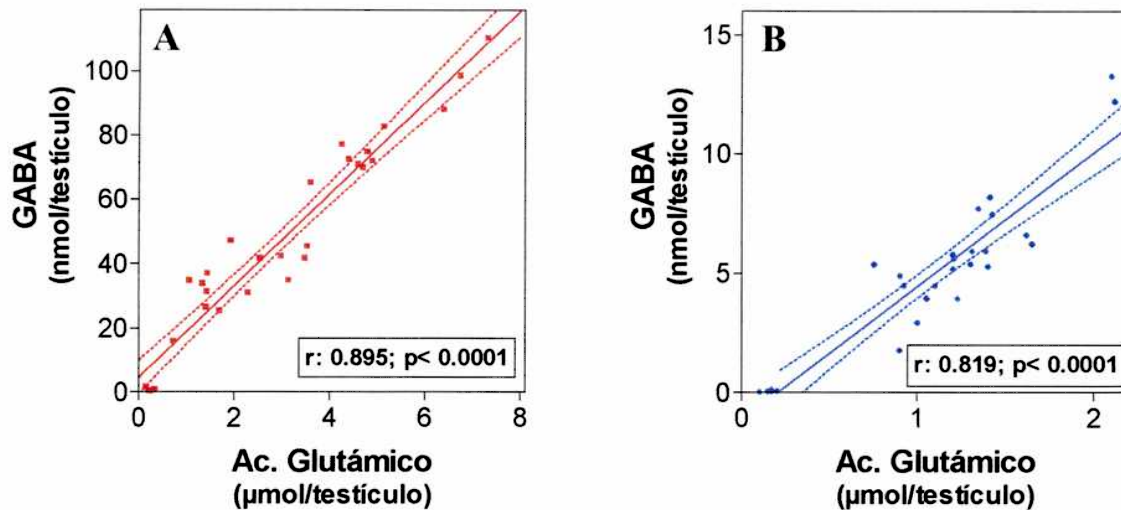


Figura 38. ANALISIS DE REGRESION LINEAL ENTRE EL CONTENIDO TESTICULAR DE ACIDO γ -AMINO BUTIRICO (GABA) Y ACIDO GLUTAMICO EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

El contenido testicular de GABA y ácido glutámico fueron determinados en hámsteres de las especies Dorado y Djungarian de 23,30,36,46,60 y 90 días de edad.

Panel A: Hámsteres de la especie Dorado.

Panel B: Hámsteres de la especie Djungarian.

Los parámetros analizados presentaron una correlación altamente significativa ($p < 0.0001$).

3.1.1.2.1.2. Influencia del fotoperíodo sobre los niveles testiculares de ácido glutámico

La Fig. 39 (paneles A y B) muestra los niveles de Glut presentes en testículos de hámsteres expuestos a FN, o mantenidos en FC durante 9 a 22 semanas. La concentración gonadal de Glut ($\mu\text{mol/g}$ de tejido) experimentó una significativa caída hacia las 12-14 semanas de exposición a FC; y posteriormente, una completa recuperación de los niveles entre las 16 y 22 semanas (panel A). Un perfil similar fue

obtenido al expresar los resultados como $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteínas (datos no mostrados). El contenido gonadal de Glut descendió significativamente a las 12-18 semanas de permanencia en fotorestricción; mientras que, a las 22 semanas, los niveles de este neurotransmisor se mostraron restaurados.

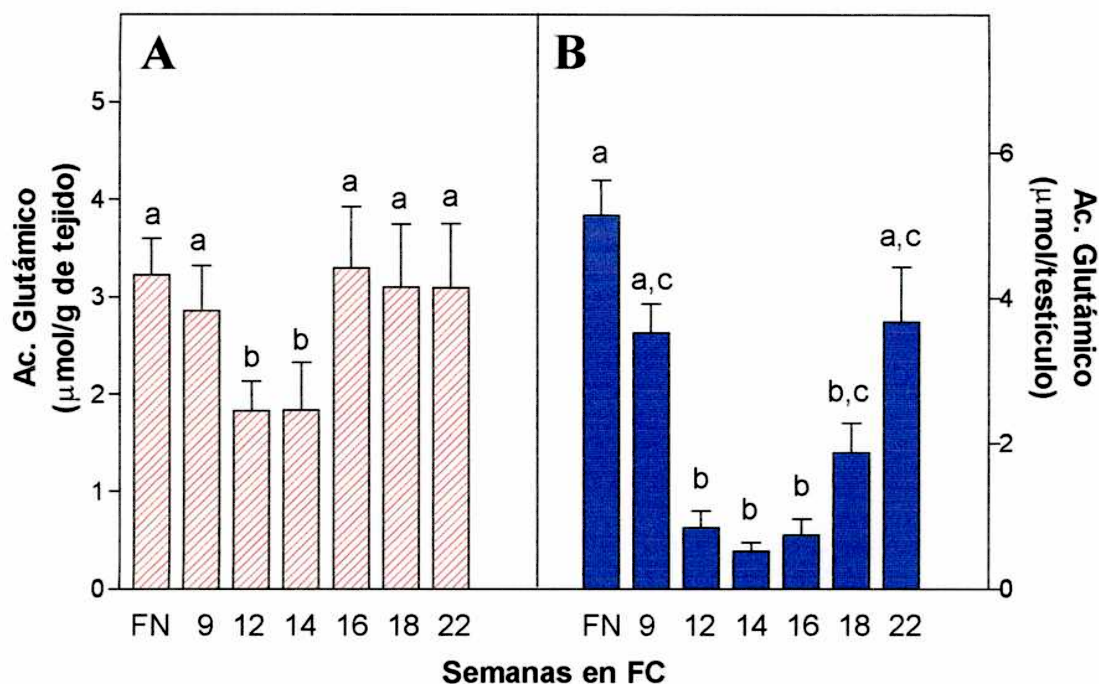


Figura 39. INFLUENCIA DEL FOTOPERÍODO SOBRE LOS NIVELES TESTICULARES DE ÁCIDO GLUTAMICO.

La concentración y el contenido testicular de ácido glutámico fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Panel A: Concentración testicular de ácido glutámico ($\mu\text{mol}/\text{g}$ de tejido).

Panel B: Contenido testicular de ácido glutámico ($\mu\text{mol}/\text{testículo}$).

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

El análisis de regresión lineal entre el contenido gonadal de Glut y GABA, mostró un coeficiente $r = 0.869$ considerado estadísticamente muy significativo ($p < 0.0001$; Fig. 40).

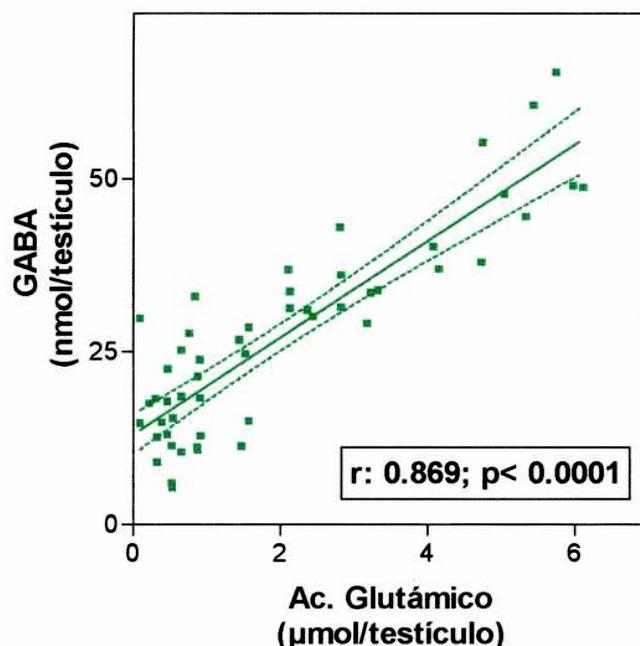


Figura 40. ANALISIS DE REGRESION LINEAL ENTRE EL CONTENIDO TESTICULAR DE ACIDO γ -AMINO BUTIRICO (GABA) Y ACIDO GLUTAMICO. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO.

El contenido testicular de GABA y ácido glutámico fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los parámetros analizados presentaron una correlación altamente significativa ($p < 0.0001$).

3.1.1.2.2. Actividad glutamato decarboxilasa

3.1.1.2.2.1. Influencia del fotoperíodo sobre la actividad glutamato decarboxilasa testicular

La Tabla 18 muestra la actividad GAD específica ($\mu\text{mol/h/g}$ de proteínas), en testículos de hámsteres expuestos a FN o FC durante 14 semanas. Los testículos regresionados presentaron un aumento del 100% en la actividad GAD respecto del grupo control ($p < 0.001$). Al expresar la actividad enzimática en términos de $\mu\text{mol/h/g}$ de tejido, se observó también un marcado incremento en el grupo expuesto a FC

(datos no mostrados). Sin embargo, cuando la actividad GAD se expresa por testículo, la misma desciende significativamente como consecuencia de la permanencia en fotoperíodo inhibitorio durante 14 semanas (Tabla 18).

semanas en FC	TESTICULO ACTIVIDAD GAD	
	($\mu\text{mol } ^{14}\text{CO}_2/\text{h/g proteínas}$)	($\mu\text{mol } ^{14}\text{CO}_2/\text{h/testículo}$)
FN	85.47 $\pm$ 6.37	5.21 $\pm$ 0.29
14	151.66 $\pm$ 13.49*	1.88 $\pm$ 0.71*

Tabla 18. INFLUENCIA DEL FOTOPERÍODO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DECARBOXILASA (GAD) TESTICULAR.

La actividad GAD testicular fue determinada en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 14 semanas.

*Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student; *: p < 0.05).*

3.1.1.2.3. Putrescina. Niveles testiculares

3.1.1.2.3.1. Influencia del fotoperíodo sobre los niveles testiculares de putrescina

Los niveles de Put presentes en testículos de hámsteres mantenidos en FN o expuestos a FC durante 9, 12, 14, 16, 18 y 22 semanas; fueron previamente descriptos en la sección 2.1.1. (pág. 145), y se encuentran ilustrados en la Fig. 27 (paneles A y B).

Cuando el contenido gonadal de GABA fue comparado con el contenido de Put en este órgano, se detectó una correlación significativa entre ambos parámetros ($r=0.854$; $p<0.0001$) (Fig. 41).

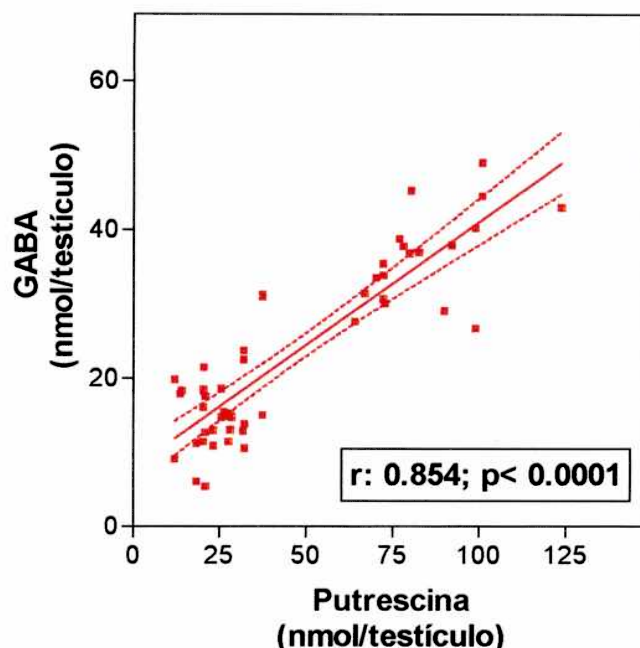


Figura 41. ANALISIS DE REGRESION LINEAL ENTRE EL CONTENIDO TESTICULAR DE ACIDO γ -AMINO BUTIRICO (GABA) Y PUTRESCINA. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO.

El contenido testicular de GABA y putrescina fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los parámetros analizados presentaron una correlación altamente significativa ($p < 0.0001$).

3.1.1.3. Efecto del ácido amino-oxiacético sobre los niveles testiculares de GABA

El catabolismo de GABA involucra la actividad de la enzima GABA-T presente en el sistema nervioso central, el sistema autónomo y en órganos no neuronales. En hámsteres adultos mantenidos en FN, inyectados intra-peritonealmente con ácido amino-oxiacético (35mg/kg de peso corporal), un inhibidor de la actividad GABA-T, y sacrificados 30 minutos y 1 hora después de la administración de la droga; no se observaron cambios significativos en la concentración (nmol/g de tejido) ni en el contenido (nmol/testículo) testicular de GABA (Tabla 19). Un perfil similar fue obtenido cuando los resultados se expresaron en nmol/mg de proteínas (datos no mostrados).

Tiempo post-inyección de ácido amino-oxiacético (minutos)	TESTICULO GABA	
	Concentración (nmol/g de tejido)	Contenido (nmol/testículo)
0	33.21+3.05 ^a	52.47+4.56 ^a
30	38.54+4.12 ^a	55.04+6.89 ^a
60	39.87+5.01 ^a	53.14+5.04 ^a

Tabla 19. EFECTO DEL ACIDO AMINO-OXIACETICO SOBRE LOS NIVELES TESTICULARES DE ACIDO γ -AMINO BUTIRICO (GABA).

Hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, fueron inyectados intraperitonealmente con ácido amino-oxiacético (35 mg/ kg de peso corporal) y sacrificados a los 30 y 60 minutos post-administración.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

3.1.2. INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES TESTICULARES DE SEROTONINA

3.1.2.1. Niveles testiculares de serotonina y ácido 5-hidroxi indol acético

3.1.2.1.1. En el proceso de desarrollo sexual

La Fig. 42 (paneles A y B) ilustra los niveles de 5-HT presentes en el parénquima testicular durante el proceso de desarrollo sexual en hámsteres Dorados. La concentración de este neurotransmisor (pmol/g de tejido) aumentó significativamente a los 36 días de edad, descendió a los 46 días, y luego incrementó concomitantemente con la edad hasta la adultez (panel A). Un perfil similar fue obtenido cuando los resultados se expresaron en pmol/mg de proteínas (datos no

mostrados). El contenido testicular de 5-HT presentó un aumento significativo a los 36 días de edad, permaneció sin cambios hasta los 46 días, y luego incrementó proporcionalmente entre los 60 y 90 días (panel B).

La Fig. 42 (paneles C y D) muestra los niveles de 5-HIAA, principal metabolito en el catabolismo de la 5-HT. La concentración de 5-HIAA (pmol/g de tejido) presentó un leve incremento hacia los 36 días de edad, descendió a los 46 días, y luego aumentó significativamente a los 60 y 90 días (panel C). Un patrón similar fue observado cuando los datos se expresaron en pmol/mg de proteínas (datos no mostrados). El contenido de 5-HIAA en parénquima testicular aumentó a los 36 días, no sufrió variaciones a los 46 días, y posteriormente incrementó con la edad entre los 60 y 90 días (panel D).

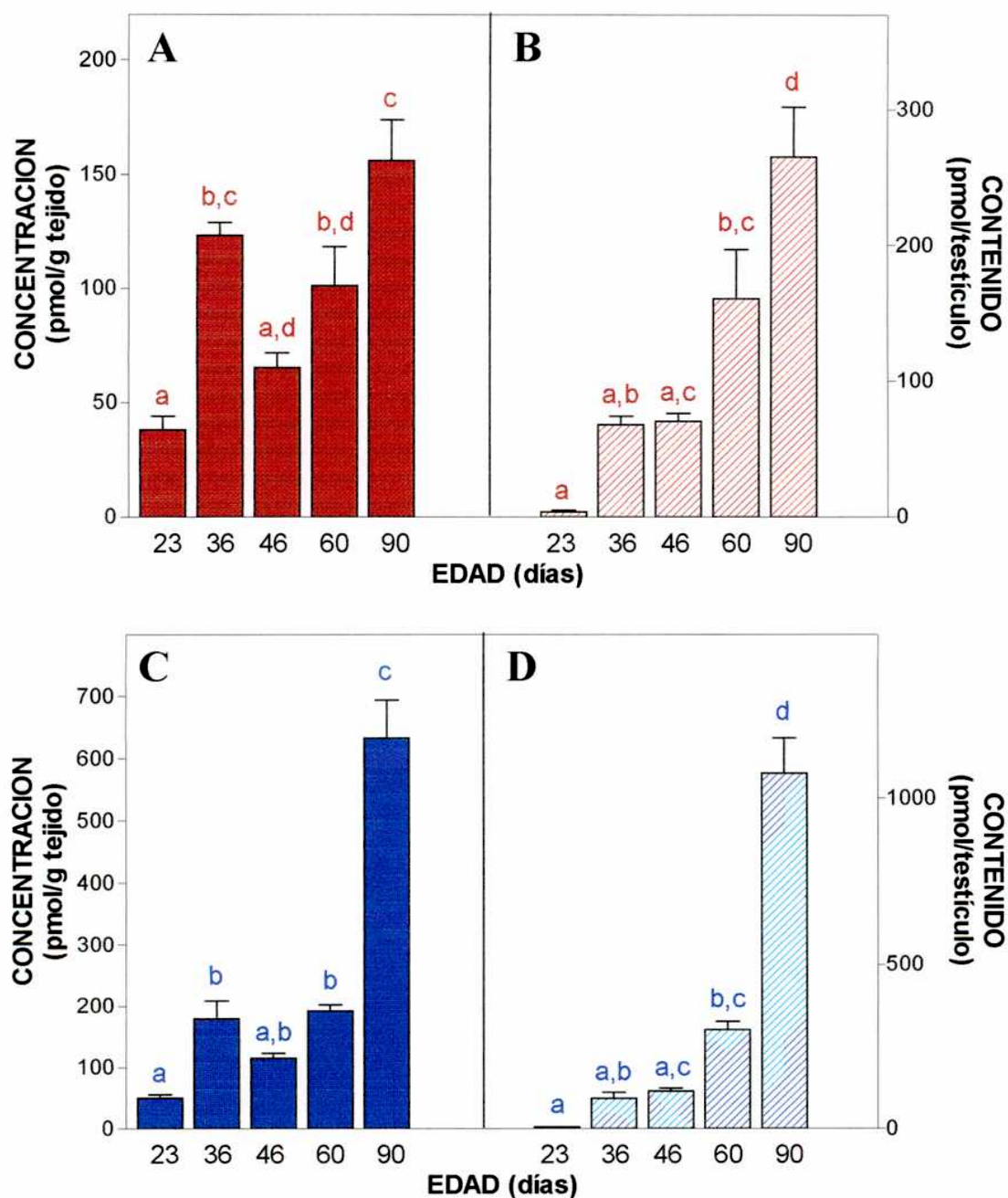


Figura 42. NIVELES DE SEROTONINA (5-HT) Y ACIDO 5-HIDROXI INDOL ACETICO (5-HIAA) EN PARENQUIMA TESTICULAR EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

La concentración y el contenido de 5-HT y 5-HIAA en parénquima testicular, fueron determinados en hámsteres Dorados de 23,36,46,60 y 90 días de edad.

Paneles A y B: Concentración (pmol/g de tejido) y Contenido (pmol/testículo) testicular de 5-HT.

Paneles C y D: Concentración (pmol/g de tejido) y Contenido (pmol/testículo) testicular de 5-HIAA.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

Cuando se analizaron las variaciones ocurridas en los niveles serotoninérgicos totales (5-HT + 5-HIAA) en el parénquima testicular (Fig. 43, paneles A y B), pudo observarse un aumento significativo en la concentración (pmol/g de tejido) a los 36 días de edad, un descenso hacia los 46 días, y finalmente un incremento de la misma hasta alcanzar la madurez sexual (panel A). La expresión de los datos en términos de pmol/mg de proteínas resultó en el mismo perfil ontogénico (datos no mostrados). El contenido serotoninérgico total, presentó un marcado incremento a los 36 días, permaneció prácticamente sin cambios hasta los 46 días, y luego aumentó proporcionalmente entre los 60 y 90 días (panel B).

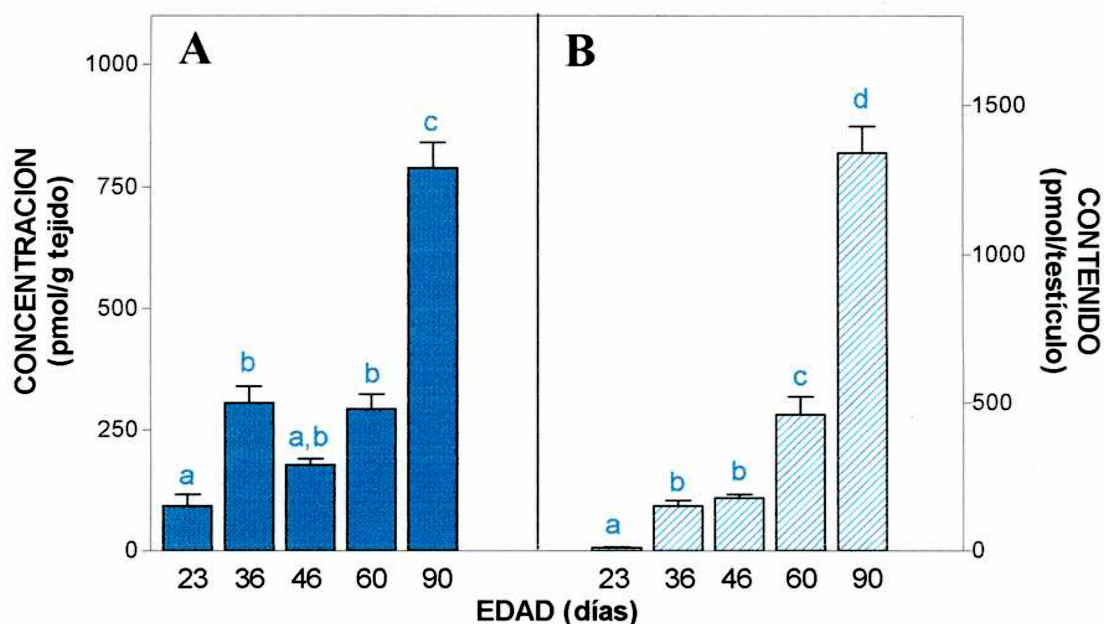


Figura 43. NIVELES SEROTONINÉRGICOS TOTALES EN PARENQUIMA TESTICULAR EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

La concentración y el contenido de serotonina (5-HT) y ácido 5-hidroxi indol acético (5-HIAA) en parénquima testicular, fueron determinados en hámsteres Dorados de 23,36,46,60 y 90 días de edad. Se ha considerado a los niveles serotoninérgicos totales como la sumatoria de los niveles testiculares de 5-HT y 5-HIAA.

Panel A: Concentración serotoninérgica total testicular (pmol/g de tejido).

Panel B: Contenido serotoninérgico total testicular (pmol/testículo).

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

La Fig. 44 (paneles A y B) ilustra los niveles de 5-HT presentes en la cápsula testicular durante la ontogenia en hámsteres Dorados. La concentración de este neurotransmisor (pmol/g de tejido) no sufre cambios estadísticamente significativos durante los primeros 46 días de edad, aunque se observó un leve aumento de la misma hacia los 36 días. A los 60 días de edad la concentración capsular de 5-HT presentó un marcado incremento alcanzándose los niveles característicos de la adultez (panel A). El contenido de 5-HT en la cápsula gonadal, ascendió significativamente a los 36 días de edad, descendió a los 46 días, alcanzó sus niveles máximos a los 60 días (30 pmol/cápsula), y finalmente disminuyó un 50 % a los 90 días (16 pmol/cápsula) (panel B).

La Fig. 44 (paneles C y D) muestra los niveles de 5-HIAA en la cápsula testicular a lo largo del desarrollo puberal en hámsteres Dorados. La concentración capsular de 5-HIAA aumentó significativamente a los 36 días de edad, descendió a los 46 días hasta niveles similares a los detectados a los 23 días, y luego incrementó hacia los 60 y 90 días (panel C). Entre los 23 y 36 días de edad, el contenido de 5-HIAA en cápsula gonadal incrementó en un factor igual a 22. Hacia los 46 días descendió un 60%, y finalmente aumentó a los 60-90 días alcanzando sus niveles máximos (34 pmol/cápsula) (panel D).

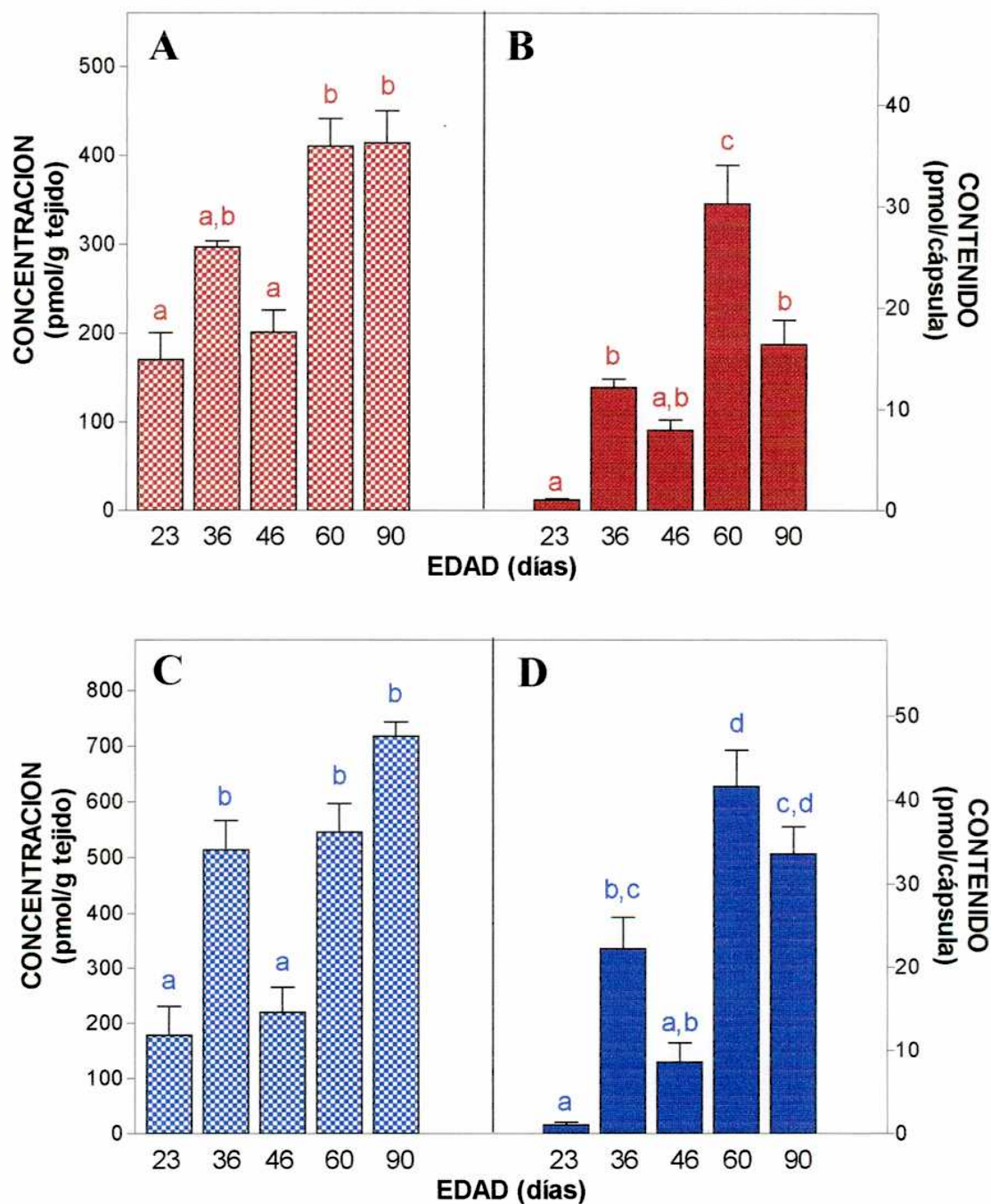


Figura 44. NIVELES DE SEROTONINA (5-HT) Y ACIDO 5-HIDROXI INDOL ACETICO (5-HIAA) EN CAPSULA TESTICULAR EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

La concentración y el contenido de 5-HT y 5-HIAA en cápsula testicular, fueron determinados en hámsteres Dorados de 23,36,46,60 y 90 días de edad.

Paneles A y B: Concentración (pmol/g de tejido) y Contenido (pmol/cápsula) capsular de 5-HT.

Paneles C y D: Concentración (pmol/g de tejido) y Contenido (pmol/cápsula) capsular de 5-HIAA.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

La Fig. 45 (paneles A y B) ilustra las variaciones ocurridas en los niveles serotoninérgicos totales (5-HT + 5-HIAA) en la cápsula testicular. La concentración serotoninérgica total aumentó significativamente a los 36 días de edad, descendió a los 46 días hasta niveles comparables a los detectados a los 23 días, y luego ascendió a los 60-90 días hasta aproximadamente 1000 pmol/cápsula (panel A). El contenido serotoninérgico total en la cápsula gonadal, incrementó significativamente a los 36 días de edad, descendió a los 46 días, alcanzó sus niveles máximos a los 60 días, y finalmente se redujo en un 30% a los 90 días de edad (panel B).

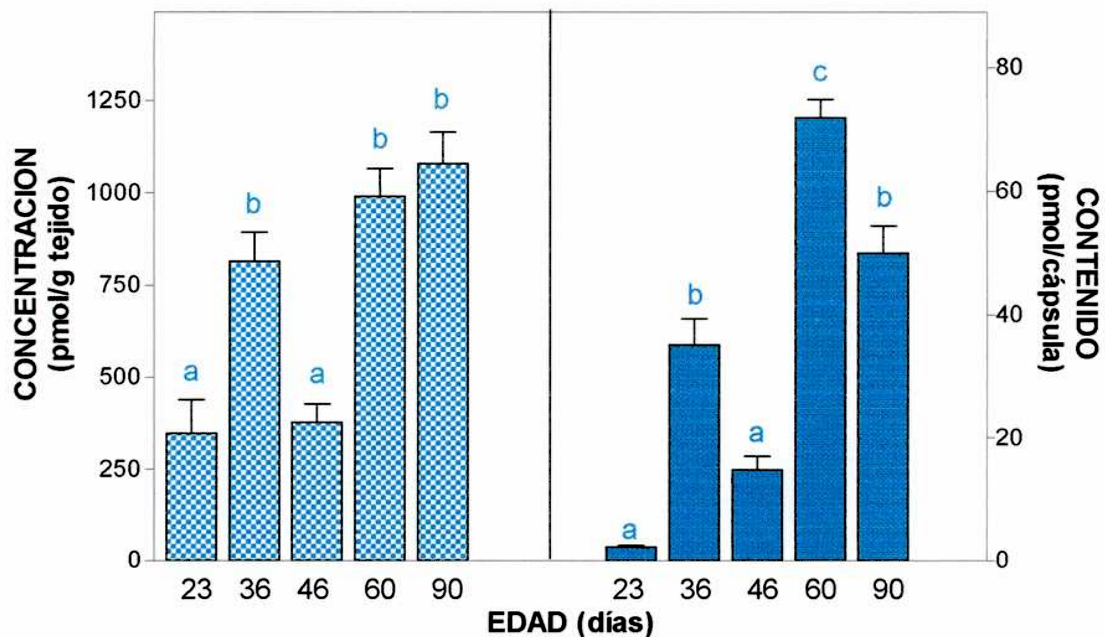


Figura 45. NIVELES SEROTONINÉRGICOS TOTALES EN CÁPSULA TESTICULAR EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

La concentración y el contenido de serotonina (5-HT) y ácido 5-hidroxi indol acético (5-HIAA) en cápsula testicular, fueron determinados en hámsteres Dorados de 23,36,46,60 y 90 días de edad. Se ha considerado a los niveles serotoninérgicos totales como la sumatoria de los niveles capsulares de 5-HT y 5-HIAA.

Panel A: Concentración serotoninérgica total capsular (pmol/g de tejido).

Panel B: Contenido serotoninérgico total capsular (pmol/cápsula).

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

La Tabla 20 muestra la relación existente entre los niveles testiculares de 5-HIAA y 5-HT durante la ontogenia en hámsteres de la especie Dorado. En parénquima gonadal, dicha relación aumentó levemente durante los primeros 60 días de vida, y presentó un notorio incremento en la etapa adulta. La relación 5-HIAA/5-HT en cápsula testicular, no mostró cambios significativos entre los 23 y 60 días de edad, aumentando un 100% a los 90 días.

EDAD (días)	RELACION 5-HIAA / 5-HT TESTICULAR			
	PARENQUIMA		CAPSULA	
	Relación de las concentraciones de 5-HIAA/5-HT	Relación del contenido de 5-HIAA/5-HT	Relación de las concentraciones de 5-HIAA/5-HT	Relación del contenido de 5-HIAA/5-HT
23	1.3+0.1 ^a	1.5+0.1 ^a	1.1+0.1 ^a	1.0+0.1 ^a
36	1.5+0.1 ^a	1.4+0.1 ^a	1.7+0.2 ^{a,b}	1.8+0.2 ^{a,b}
46	1.8+0.2 ^a	1.6+0.1 ^a	1.1+0.2 ^a	1.1+0.1 ^a
60	1.9+0.1 ^a	1.9+0.2 ^a	1.3+0.1 ^a	1.4+0.2 ^a
90	4.1+0.2 ^b	4.1+0.2 ^b	2.0+0.2 ^b	2.1+0.3 ^b

Tabla 20: RELACION ENTRE LOS NIVELES TESTICULARES DE SEROTONINA (5-HT) Y ACIDO 5-HIDROXI INDOL ACETICO (5-HIAA) EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

La concentración y el contenido de 5-HT y 5-HIAA en parénquima y cápsula testicular, fueron determinados en hámsteres Dorados de 23,36,46,60 y 90 días de edad.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Kruskal-Wallis; p < 0.05).

3.1.2.1.2. Influencia del fotoperíodo sobre los niveles testiculares de serotonina y ácido 5-hidroxi indol acético

La exposición a FC durante 14 semanas produjo una caída altamente significativa en la concentración (pmol/g de tejido) de 5-HT y 5-HIAA en parénquima testicular, la cual no fue recuperada a las 22 semanas de permanencia en fotorestricción (Fig. 46, panel A). Un perfil similar fue obtenido cuando los resultados se expresaron como pmol/mg de proteínas (datos no mostrados).

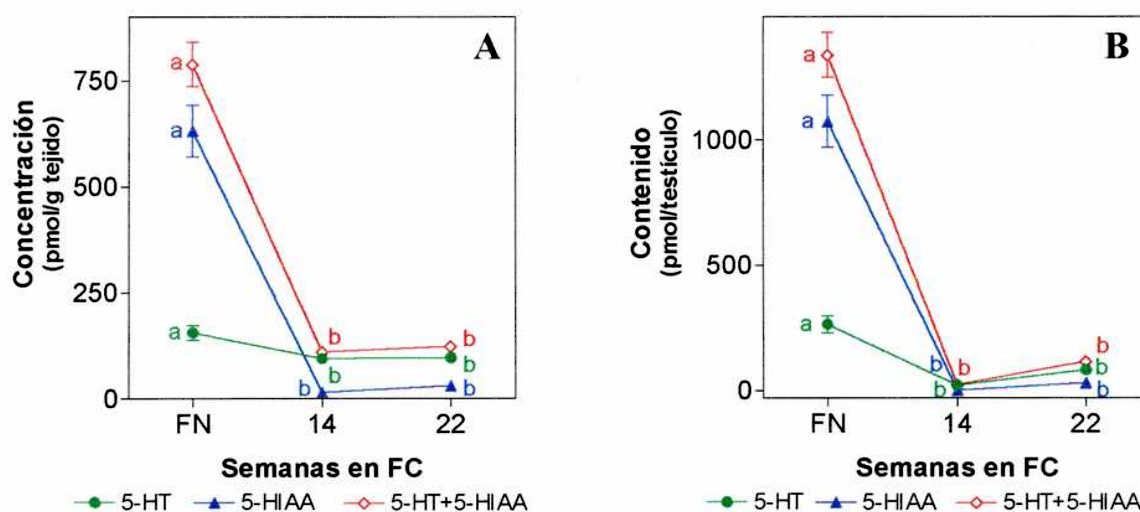


Figura 46. INFLUENCIA DEL FOTOPERÍODO SOBRE LOS NIVELES DE SEROTONINA (5-HT) Y ÁCIDO 5-HIDROXI INDOL ACÉTICO (5-HIAA) EN PARENQUIMA TESTICULAR.

La concentración y el contenido de 5-HT y 5-HIAA en parénquima testicular, fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 14 y 22 semanas.

Panel A: Concentración testicular de 5-HT y 5-HIAA (pmol/g de tejido).

Panel B: Contenido testicular de 5-HT y 5-HIAA (pmol/testículo).

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

A las 14 semanas de exposición a FC, el contenido de 5-HT y 5-HIAA en parénquima testicular (pmol/testículo) presentó una caída del 92% y 99.6%, respectivamente. La permanencia durante 22 semanas en fotoperíodo inhibitorio, aumentó 4 veces el contenido de 5-HT y 10 veces el contenido 5-HIAA en parénquima testicular respecto del grupo de animales expuesto a FC durante 14

semanas, pero dicho incremento no resultó ser estadísticamente significativo (Fig. 46, panel B).

La Fig. 47 (panel A) muestra la concentración de 5-HT y 5-HIAA en cápsula testicular en los siguientes grupos experimentales: hámsteres adultos mantenidos en FN, animales expuestos a FC durante 14 semanas, y hámsteres sometidos a fotorrestricción durante 22 semanas. La permanencia durante 14 y 22 semanas en condiciones de escasa luminosidad, no produjo modificaciones significativas en la concentración de 5-HT, como así tampoco en los niveles de 5-HIAA (panel A). Sin embargo, el contenido capsular de 5-HT y 5-HIAA descendió significativamente a las 14 semanas de exposición en FC, y permaneció sin cambios durante las 8 semanas restantes del experimento (panel B).

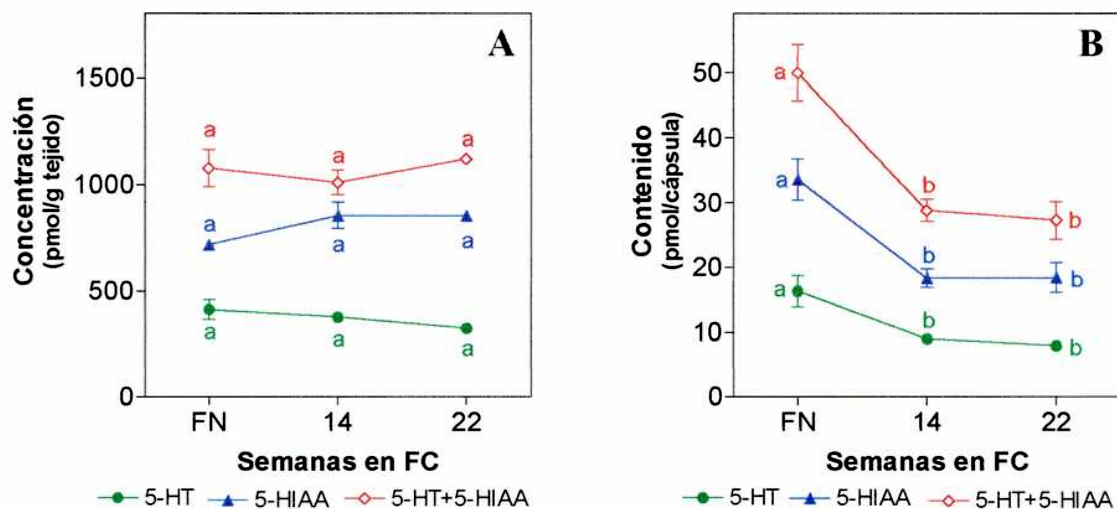


Figura 47. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES DE SEROTONINA (5-HT) Y ACIDO 5-HIDROXI INDOL ACETICO (5-HIAA) EN CAPSULA TESTICULAR.

La concentración y el contenido de 5-HT y 5-HIAA en cápsula testicular, fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 14 y 22 semanas.

Panel A: Concentración capsular de 5-HT y 5-HIAA (pmol/g de tejido).

Panel B: Contenido capsular de 5-HT y 5-HIAA (pmol/cápsula).

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

La Tabla 21 muestra la relación existente entre los niveles testiculares de 5-HIAA y 5-HT en el grupo control mantenido en FN, y en hámsteres expuestos a FC durante 14 y 22 semanas. En parénquima gonadal, dicha relación descendió notoriamente durante la permanencia en condiciones inhibitorias de luminosidad. En cambio, el FC no afectó la relación 5-HIAA/5-HT en cápsula testicular.

semanas en FC	RELACION 5-HIAA / 5-HT TESTICULAR			
	PARENQUIMA		CAPSULA	
	Relación de las concentraciones de 5-HIAA/5-HT	Relación del contenido de 5-HIAA/5-HT	Relación de las concentraciones de 5-HIAA/5-HT	Relación del contenido de 5-HIAA/5-HT
FN	4.1+0.20 ^a	4.1+0.20 ^a	2.0+0.2 ^a	2.1+0.3 ^a
14	0.2±0.02 ^b	0.2±0.03 ^b	2.1±0.2 ^a	2.1±0.2 ^a
22	0.3±0.04 ^b	0.4±0.03 ^b	2.6±0.4 ^a	2.6±0.3 ^a

Tabla 21: RELACION ENTRE LOS NIVELES TESTICULARES DE SEROTONINA (5-HT) Y ACIDO 5-HIDROXI INDOL ACETICO (5-HIAA). INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO.

La concentración y el contenido de 5-HT y 5-HIAA en parénquima y cápsula testicular, fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 14 y 22 semanas.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Kruskal-Wallis; $p < 0.05$).

3.2. EPIDIDIMO

3.2.1. INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES EPIDIDIMARIOS DE GABA

3.2.1.1. Niveles epididimarios de GABA

3.2.1.1.1. *En el proceso de desarrollo sexual*

Los niveles de GABA presentes en epidídimos de hámsteres Dorados durante el proceso de maduración sexual se encuentran ilustrados en la Fig. 48 (paneles A y B). Hacia los 30 días de edad se observó un significativo incremento en la concentración epididimaria de GABA (nmol/g de tejido), seguido por una posterior caída entre los 36 y 90 días de edad (panel A). Un perfil similar fue detectado cuando la concentración de GABA en epidídimos se expresó en términos de nmol/mg de proteínas (datos no mostrados). El contenido epididimario de este neurotransmisor presentó, entre los 23 y 46 días, un aumento paralelo a la edad, permaneciendo luego, prácticamente constante hasta la adultez (panel B).

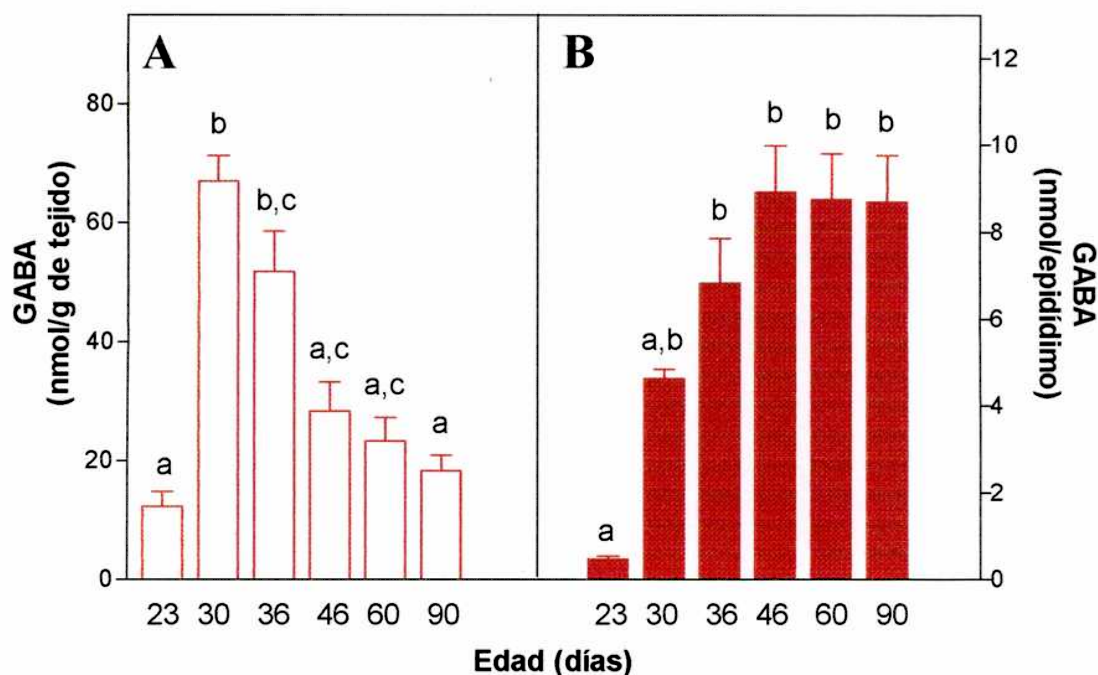


Figura 48. NIVELES EPIDIDIMARIOS DE ACIDO γ -AMINO BUTIRICO (GABA) EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

La concentración y el contenido epididimario de GABA fueron determinados en hámsteres Dorados de 23,30,36,46,60 y 90 días de edad.

Panel A: Concentración epididimaria (nmol/g de tejido) de GABA.

Panel B: Contenido epididimario (nmol/epidídimo) de GABA.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

3.2.1.1.2. Influencia del fotoperíodo sobre los niveles epididimarios de GABA

El contenido y la concentración de GABA fueron determinados en epidídimos provenientes de hámsteres sometidos a FN o FC durante 9 a 22 semanas (Fig. 49, paneles A y B). La concentración epididimaria de GABA (nmol/g de tejido) aumentó significativamente hacia las 12-14 semanas de exposición a FC y luego, a las 16-22 semanas, descendió hasta alcanzar los niveles controles (panel A). Un perfil similar fue detectado cuando la concentración se expresó en términos de nmol/mg de proteína o nmol/mg de ADN (datos no mostrados). El contenido gabaérgico

epididimario descendió significativamente entre las 14 y 22 semanas de permanencia en condiciones de fotorestricción (panel B).

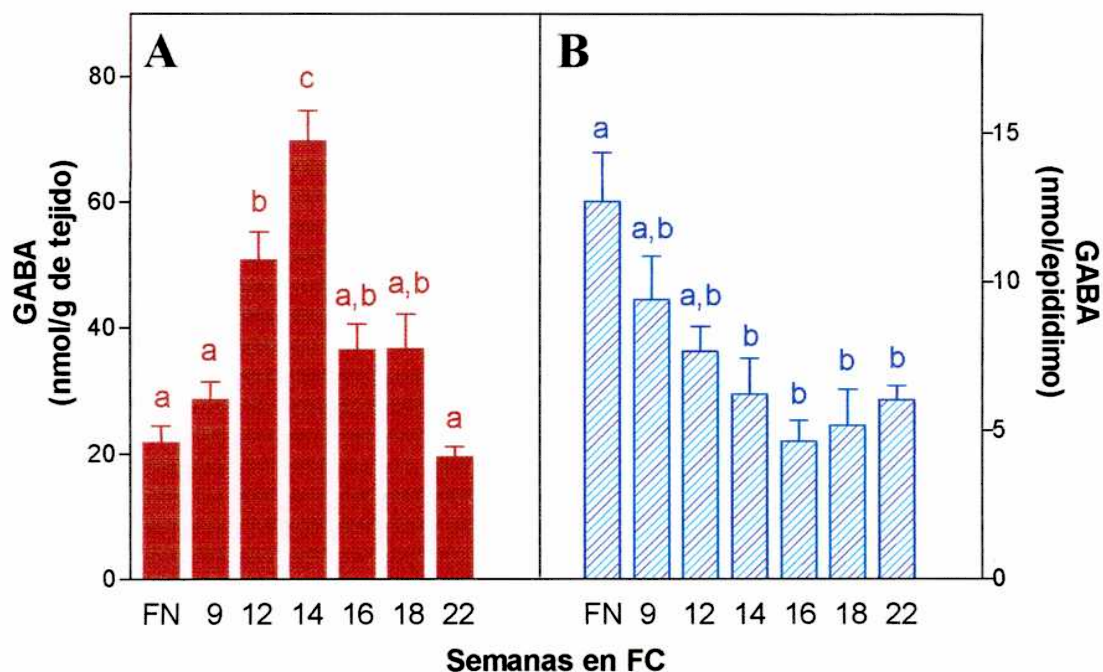


Figura 49. INFLUENCIA DEL FOTOPERÍODO SOBRE LOS NIVELES EPIDIDIMARIOS DE ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO (GABA).

La concentración y el contenido epididimario de GABA fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Panel A: Concentración epididimaria de GABA (nmol/g de tejido).

Panel B: Contenido epididimario de GABA (nmol/epidídimo).

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

3.2.1.2. Biosíntesis epididimaria de GABA

3.2.1.2.1. Ácido glutámico. Niveles epididimarios

3.2.1.2.1.1. En el proceso de desarrollo sexual

La concentración epididimaria de Glut ($\mu\text{mol/g}$ de tejido) en hámsteres Dorados, describió una disminución paulatina entre los 23 y 90 días de edad (Fig. 50, panel A).

Un perfil similar fue obtenido cuando los resultados se expresaron en $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteínas (datos no mostrados). Sin embargo, el contenido epididimario de este neurotransmisor no presentó cambios hasta los 46 días de edad, aumentando significativamente hacia los 60-90 días (Fig. 50, panel B).

El análisis de regresión lineal entre el contenido epididimario de Glut y GABA, mostró un coeficiente $r = 0.626$ considerado discretamente significativo ($p < 0.05$, datos no mostrados).

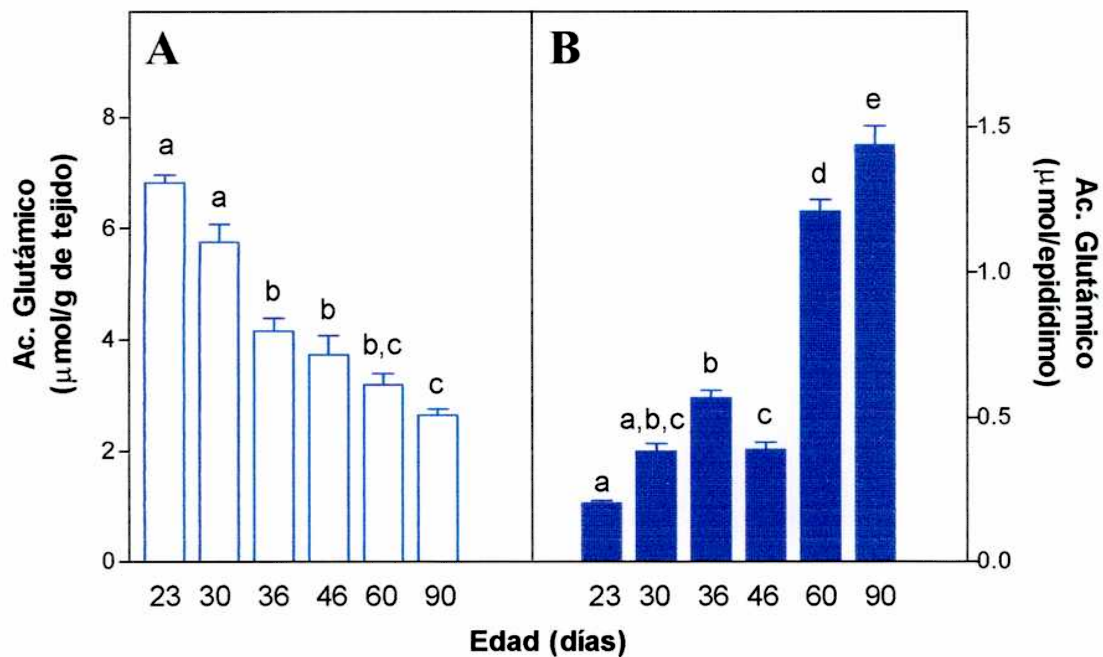


Figura 50. NIVELES EPIDIDIMARIOS DE ACIDO GLUTAMICO EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

La concentración y el contenido epididimario de ácido glutámico fueron determinados en hámsteres Dorados de 23,30,36,46,60 y 90 días de edad.

Panel A: Concentración epididimaria ($\mu\text{mol}/\text{g}$ de tejido) de ácido glutámico.

Panel B: Contenido epididimario ($\mu\text{mol}/\text{epididimo}$) de ácido glutámico..

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

3.2.1.2.1.2. *Influencia del fotoperíodo sobre los niveles epididimarios de ácido glutámico*

La concentración epididimaria de Glut ($\mu\text{mol/g}$ de tejido) disminuyó significativamente como consecuencia de la exposición a FC durante 14 semanas; mientras que, entre las 18 y 22 semanas de permanencia en fotoinhibición, se observó una recuperación total de los niveles (Fig. 51, panel A). Cuando los resultados fueron expresados en términos de $\mu\text{mol/mg}$ de proteínas o $\mu\text{mol/mg}$ de ADN, se obtuvo un perfil similar (datos no mostrados). El contenido epididimario de Glut también describió un patrón semejante, con una caída paulatina como resultado de la exposición a FC, la cual resultó ser máxima hacia las 14 semanas, y un posterior restablecimiento a partir de las 16 semanas; aunque a las 22 semanas, los niveles aún permanecían significativamente disminuídos en comparación con el grupo control (Fig. 51, panel B).

El análisis de regresión lineal entre el contenido epididimario de Glut y GABA, mostró un coeficiente: $r = 0.678$, considerado discretamente significativo ($p < 0.05$, datos nos mostrados).

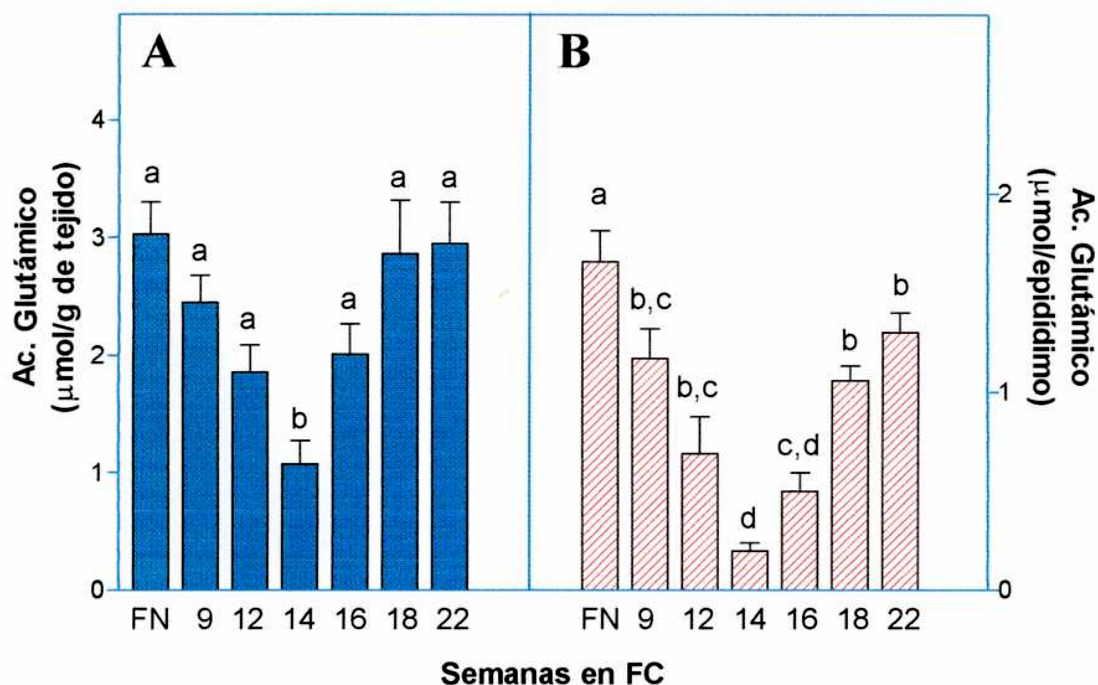


Figura 51. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES EPIDIDIMARIOS DE ACIDO GLUTAMICO.

La concentración y el contenido epididimario de ácido glutámico fueron determinados en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Panel A: Concentración epididimaria de ácido glutámico (µmol/g de tejido).

Panel B: Contenido epididimario de ácido glutámico (µmol/epididimo).

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

3.2.1.2.2. Actividad glutamato decarboxilasa

3.2.1.2.2.1. Influencia del fotoperíodo sobre la actividad glutamato decarboxilasa epididimaria

La actividad específica epididimaria de la enzima GAD (µmol/h/g de proteínas) no fue afectada por la exposición a FC durante 14 semanas (Tabla 22). En cambio, la expresión de la actividad GAD en términos de µmol/h/g de tejido, µmol/h/mg de ADN (datos no mostrados) o µmol/h/epidídimo, presentó una disminución significativa de

los niveles como consecuencia de la permanencia durante 14 semanas en fotoinhibición (Tabla 22).

semanas en FC	EPIDIDIMO ACTIVIDAD GAD	
	($\mu\text{mol } ^{14}\text{CO}_2/\text{h/g proteínas}$)	($\mu\text{mol } ^{14}\text{CO}_2/\text{h/epidídimo}$)
FN	64.60 $\pm$ 11.29	1.51 $\pm$ 0.24
14	51.22 $\pm$ 7.75	0.54 $\pm$ 0.21*

Tabla 22. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DECARBOXILASA (GAD) EPIDIDIMARIA.

La actividad GAD epididimaria fue determinada en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 14 semanas.

*Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 6-8). Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student: *: $p < 0.05$).*

3.3. VESICULAS SEMINALES

3.3.1. INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES DE GABA EN VESICULAS SEMINALES

3.3.1.1. Niveles de GABA en vesículas seminales

3.3.1.1.1. En el proceso de desarrollo sexual

La Fig. 52 (paneles A y B) muestra los niveles GABA presentes en vesículas seminales de hámsteres Dorados durante la ontogenia. La concentración de GABA en vesículas seminales (nmol/g de tejido) disminuyó significativamente entre los 23 y 46 días de edad; y luego, recuperó parcialmente sus niveles entre los 60 y 90 días (panel A). Un patrón similar fue observado cuando la concentración se expresó en

términos de nmol/mg de proteína (datos no mostrados). El contenido de GABA en vesículas seminales permaneció sin modificaciones significativas hasta los 46 días de edad, detectándose un marcado aumento hacia los 60-90 días (panel B).

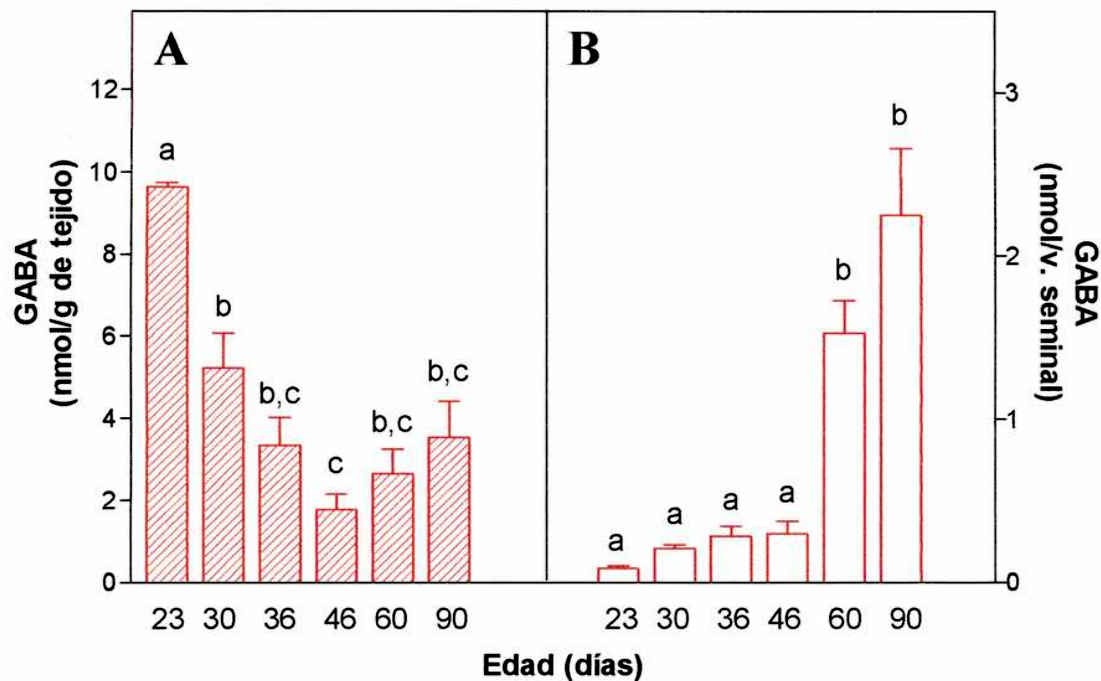


Figura 52. NIVELES VESICULARES DE ACIDO γ -AMINO BUTIRICO (GABA) EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

La concentración y el contenido de GABA fueron determinados en cada vesícula seminal de hámsteres Dorados de 23,30,36,46,60 y 90 días de edad.

Panel A: Concentración de GABA (nmol/g de tejido) en vesículas seminales.

Panel B: Contenido de GABA (nmol/v. seminal) en vesículas seminales.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

3.3.1.1.2. Influencia del fotoperíodo sobre los niveles de GABA en vesículas seminales

La Fig. 53 (paneles A y B) muestra los niveles de GABA en vesículas seminales de hámsteres expuestos a FN o inhibitorio durante 9 a 22 semanas. La exposición a

FC no produjo cambios significativos en la concentración de GABA (nmol/g de tejido) en relación al grupo control mantenido en condiciones estándares de luminosidad (panel A). Un patrón similar fue obtenido cuando los resultados se expresaron en términos de nmol/mg de proteínas o nmol/mg de ADN (datos no mostrados).

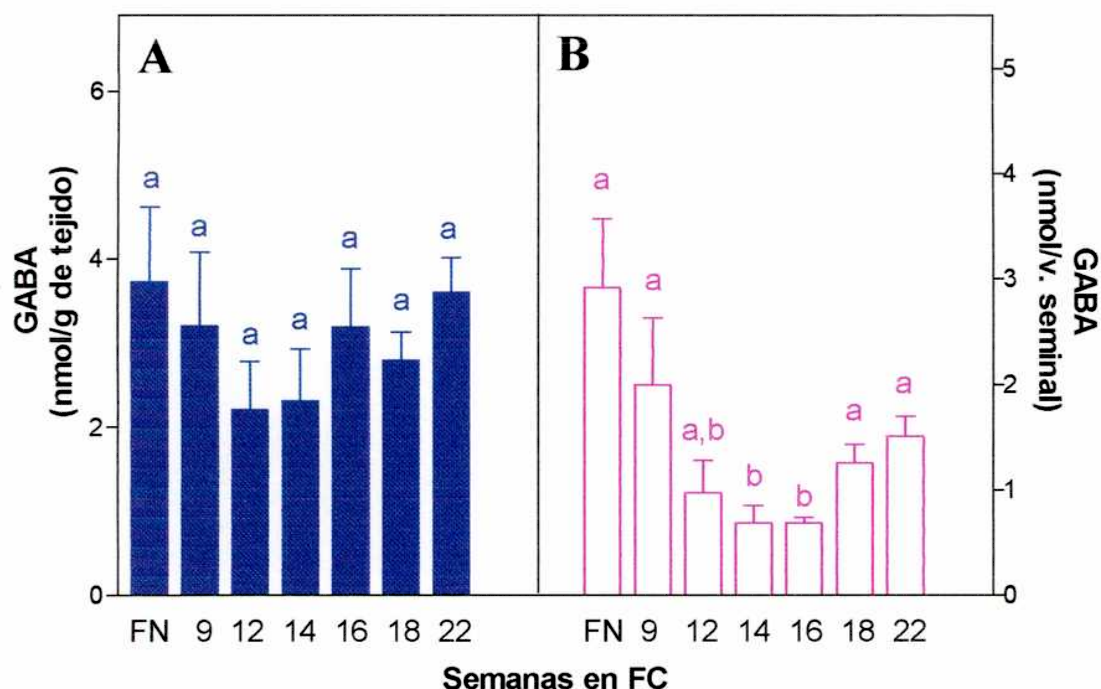


Figura 53. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES VESICULARES DE ACIDO γ -AMINO BUTIRICO (GABA).

La concentración y el contenido de GABA fueron determinados en cada vesícula seminal de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Panel A: Concentración de GABA (nmol/g de tejido) en vesículas seminales.

Panel B: Contenido de GABA (nmol/v. seminal) en vesículas seminales.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n= 6-8). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

En cambio, la permanencia en fotoinhibición durante 14-16 semanas, produjo una caída significativa en el contenido glandular de GABA. A tiempos prolongados de exposición a FC (18-22 semanas), el contenido gabaérgico fue restaurado (panel B).

3.3.1.2. Biosíntesis de GABA en vesículas seminales

3.3.1.2.1. Ácido glutámico. Niveles en vesículas seminales

3.3.1.2.1.1. En el proceso de desarrollo sexual

En hámsteres Dorados, la concentración vesicular de Glut ($\mu\text{mol/g}$ de tejido) disminuyó paulatinamente con la edad (Fig. 54, panel A). Cuando los niveles se expresaron en términos de $\mu\text{mol/mg}$ de proteínas, también se observó una caída gradual en la concentración de Glut durante la ontogenia (datos no mostrados). Por el contrario, el contenido de este aminoácido aumentó concomitantemente con el desarrollo sexual (Fig. 54, panel B).

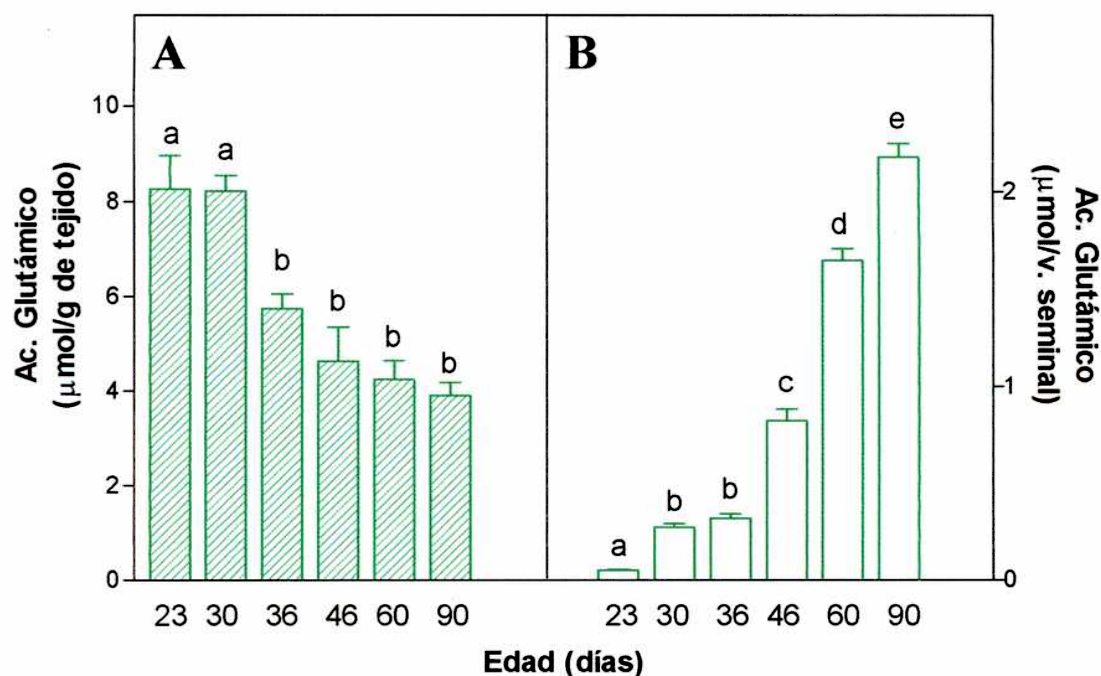


Figura 54. NIVELES VESICULARES DE ACIDO GLUTAMICO EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

La concentración y el contenido de ácido glutámico fueron determinados en cada vesícula seminal de hámsteres Dorados de 23,30,36,46,60 y 90 días de edad.

Panel A: Concentración de ácido glutámico ($\mu\text{mol/g}$ de tejido) en vesículas seminales.

Panel B: Contenido de ácido glutámico ($\mu\text{mol/v. seminal}$) en vesículas seminales.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

El análisis de regresión lineal entre el contenido vesicular de Glut y GABA, mostró un coeficiente $r = 0.930$ considerado estadísticamente muy significativo ($p < 0.0001$; Fig. 55).

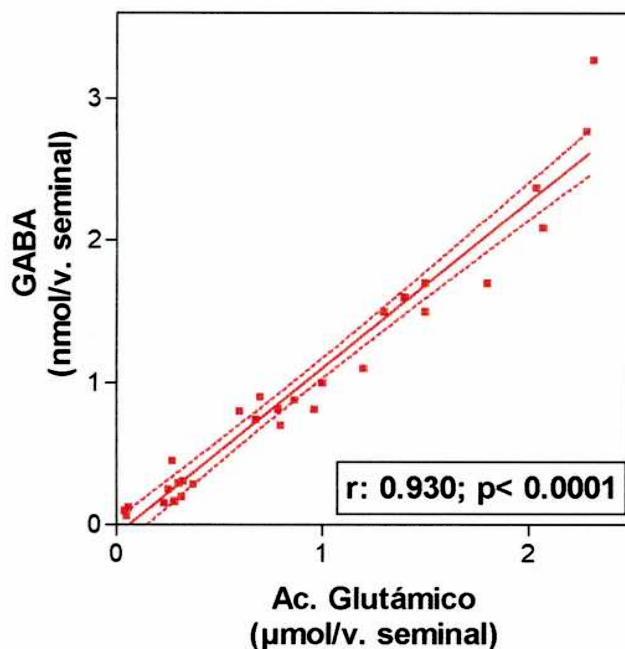


Figura 55. ANALISIS DE REGRESION LINEAL ENTRE EL CONTENIDO VESICULAR DE ACIDO γ -AMINO BUTIRICO (GABA) Y ACIDO GLUTAMICO EN EL PROCESO DE DESARROLLO SEXUAL.

El contenido de GABA y ácido glutámico fueron determinados en cada vesícula seminal de hámsteres Dorados de 23,30,36,46,60 y 90 días de edad.

Los parámetros analizados presentaron una correlación altamente significativa ($p < 0.0001$).

3.3.1.2.1.2. Influencia del fotoperíodo en los niveles de ácido glutámico en vesículas seminales

En la Fig. 56 (paneles A y B) se ilustran los niveles de Glut en vesículas seminales en los diferentes grupos experimentales estudiados: hámsteres adultos mantenidos en FN, y animales expuestos a FC entre 9 y 22 semanas. La exposición a FC durante 14-16 semanas, produjo una caída significativa tanto en la concentración ($\mu\text{mol/g}$ de tejido; panel A) como en el contenido ($\mu\text{mol/vesícula}$

seminal; panel B) de Glut en las vesículas seminales. En cambio, la permanencia durante 18-22 semanas en fotorestricción, originó una total restauración en los niveles (paneles A y B). Del mismo modo, cuando los resultados fueron expresados en términos de $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteínas o $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de ADN, la concentración vesicular de Glut descendió significativamente a las 14-16 semanas de exposición a FC, y recuperó sus niveles controles hacia las 18-22 semanas (datos no mostrados).

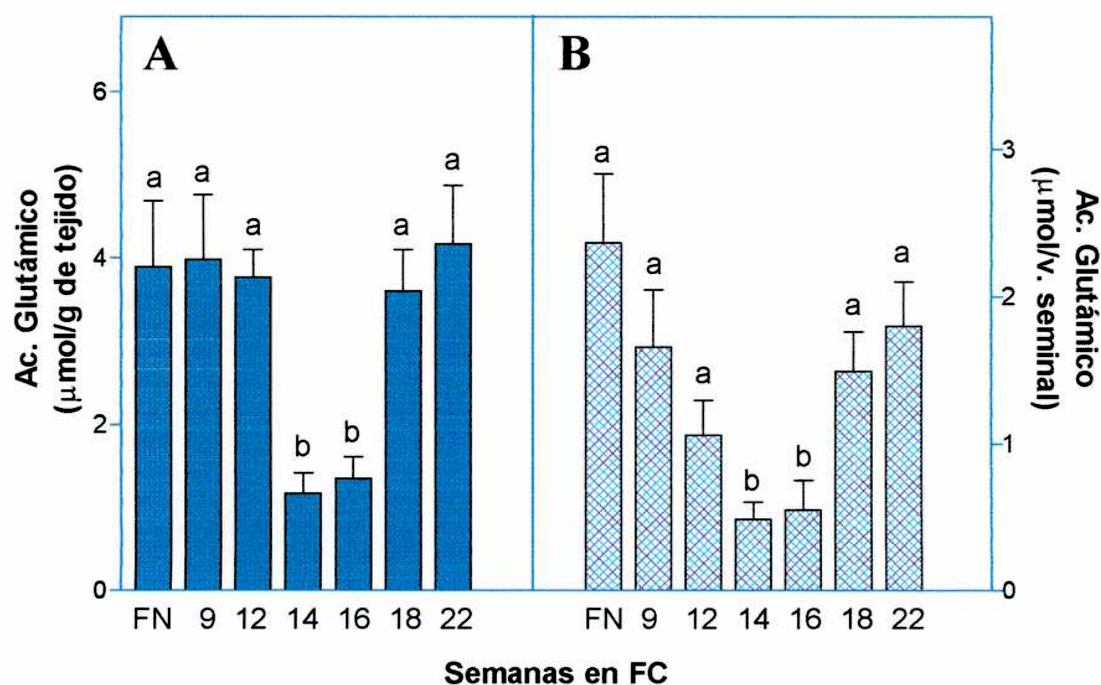


Figura 56. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE LOS NIVELES VESICULARES DE ÁCIDO GLUTÁMICO.

La concentración y el contenido de ácido glutámico fueron determinados en cada vesícula seminal de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Panel A: Concentración de ácido glutámico ($\mu\text{mol}/\text{g}$ de tejido) en vesículas seminales.

Panel B: Contenido de ácido glutámico ($\mu\text{mol}/\text{v. seminal}$) en vesículas seminales.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 6-8$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

El análisis de regresión lineal entre el contenido vesicular de Glut y GABA, mostró un coeficiente $r = 0.909$ considerado estadísticamente muy significativo ($p < 0.0001$; Fig. 57).

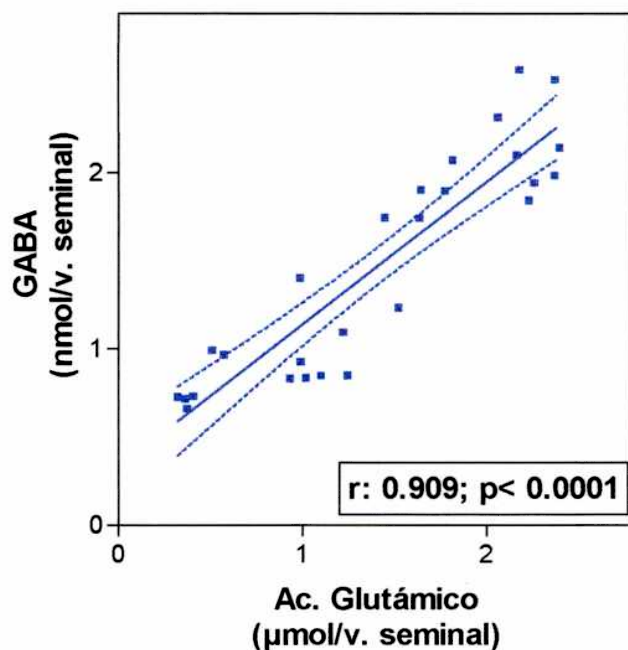


Figura 57. ANALISIS DE REGRESION LINEAL ENTRE EL CONTENIDO VESICULAR DE ACIDO γ -AMINO BUTIRICO (GABA) Y ACIDO GLUTAMICO. INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO.

El contenido de GABA y ácido glutámico en cada vesícula seminal fue determinado en hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN) o expuestos a fotoperíodo corto (FC) durante 9,12,14,16,18 y 22 semanas.

Los parámetros analizados presentaron una correlación altamente significativa ($p < 0.0001$).

4. NEUROTRANSMISORES Y FUNCION TESTICULAR. ESTUDIOS *IN VITRO*.

Con el fin de investigar el rol ejercido por GABA y 5-HT sobre la esteroidogénesis testicular, se evaluó la respuesta *in vitro* de la gónada a la presencia de dichos neurotransmisores en el Medio de incubación, mediante la producción de andrógenos por fragmentos gonadales y células intersticiales aisladas.

4.1. FRAGMENTOS TESTICULARES

El esquema experimental empleado se basa en la incubación de fragmentos gonadales en condiciones basales o en presencia de hCG; y con y sin el agregado de neurotransmisores en el Medio. A tal efecto, previamente se evaluó la influencia del tamaño de los fragmentos en la producción de andrógenos *in vitro*. La Fig. 58 muestra los niveles de T presentes en 1 ml de Medio luego de 6 hs. de incubación en condiciones basales y en presencia de un estímulo máximo de hCG (100mUI/ml), en relación al tamaño de los fragmentos testiculares obtenidos de hámsteres adultos mantenidos en FN.

Dentro del rango de 50-300 mg de testículo, se observó una variación proporcional entre el tamaño y los niveles de T; mientras que, fragmentos superiores a 300 mg produjeron niveles equivalentes de esta hormona. En base a estos resultados, se estableció el tamaño óptimo de muestra a emplear en los subsiguientes ensayos en: 50 a 100 mg en testículos de hámsteres prepuberales y adultos expuestos a FC, y 150-200 mg en animales adultos mantenidos en FN.

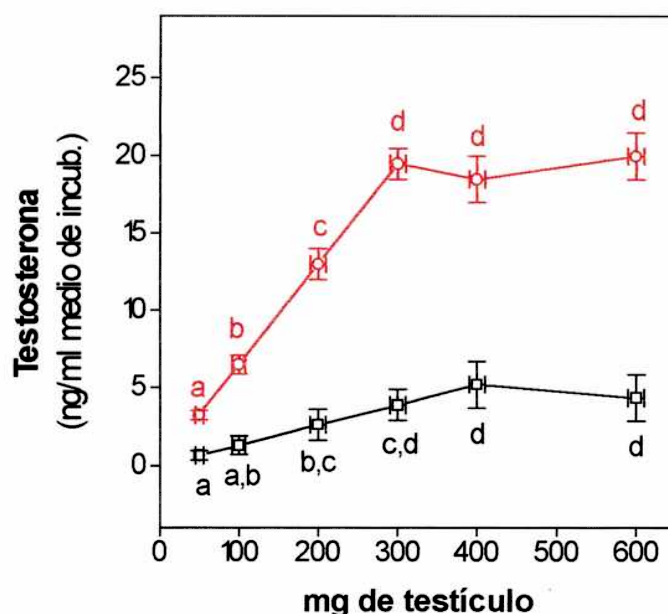


Figura 58. PRODUCCION DE TESTOSTERONA "IN VITRO" A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES.

Testículos decapsulados provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, fueron cortados en fragmentos de diferentes tamaños (entre 50 y 600 mg), e incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml).

□ : Condiciones basales.

○ : Estimulación máxima con hCG (100 mUI/ml).

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n = 5-6$). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

4.2. OBTENCION DE CELULAS INTERSTICIALES

Con el fin de establecer la técnica de preparación de células intersticiales en el hámster, pooles de 2-4 testículos de animales adultos mantenidos en condiciones estándares de luminosidad, fueron colocados en presencia de diferentes concentraciones de colagenasa (0.1, 0.2 y 0.3 mg/ml de Medio 199), durante distintos intervalos de tiempo (8, 10, 12 y 15 minutos), o bien las células fueron obtenidas por dispersión mecánica en ausencia de colagenasa. Los túbulos seminíferos se separaron posteriormente por filtración. Las células fueron

centrifugadas a baja velocidad, resuspendidas en Medio 199 conteniendo 0.1% de albúmina; y luego, identificadas y contadas al Microscopio Optico en presencia del colorante azul tripán. Las condiciones óptimas de collagenización para testículos de hámsteres fueron establecidas teniendo en cuenta el número de células obtenidas, la viabilidad celular, y el grado de contaminación de la preparación (Tabla 23); así como también, los niveles de T producidos en condiciones basales, en presencia de un estímulo intermedio de hCG (5mUI/ml) y con un estímulo máximo de hCG (100mUI/ml) (Tabla 24).

Colagenasa (mg/ml)	Tiempo (min)	Rendimiento (N° de células/ml)	Grado de contaminación	Viabilidad (% de células viables)
0		7.5×10^6	-/+	98
0.1	8	8×10^6	-	97.5
	10	16×10^6	-	98
	12	22×10^6	-/+	99
	15	24×10^6	-/+	99
0.2	8	20×10^6	-	98
	10	25×10^6	-/+	97.5
	12	31×10^6	-/+	99
	15	37×10^6	+	96
0.3	8	21×10^6	+	97
	10	26×10^6	+	94
	12	32×10^6	++	91
	15	39×10^6	++	92

Tabla 23. PARAMETROS EVALUADOS EN LA OPTIMIZACION DE LA TECNICA DE DISPERSION CELULAR EMPLEADA EN LA OBTENCION DE PREPARACIONES CRUDAS DE CELULAS INTERSTICIALES DE HAMSTERES.

El grado de contaminación con otros tipos celulares, el rendimiento y la viabilidad celular, fueron evaluados en preparaciones crudas de células intersticiales obtenidas a partir de testículos provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, empleando diferentes protocolos de dispersión celular.

Colagenasa (mg/ml)	Tiempo (min)	Testosterona (pg/ μ g de ADN)				
		hCG				
		0 (mUI/ml)	5 (mUI/ml)	100 (mUI/ml)		
0		100.54 $\pm$ 10.87	111.02 $\pm$ 32.16	150.98 $\pm$ 35.87		
0.1	8	89.56 $\pm$ 15.42	105.74 $\pm$ 36.02	227.09 $\pm$ 70.69		
	10	120.35 $\pm$ 21.30	189.73 $\pm$ 41.82	330.02 $\pm$ 95.62		
	12	143.55 $\pm$ 28.71	215.33 $\pm$ 57.42	430.65 $\pm$ 129.20		
	15	151.26 $\pm$ 30.05	202.48 $\pm$ 48.99	440.78 $\pm$ 97.49		
0.2	8	290.58 $\pm$ 26.65	444.54 $\pm$ 54.04	705.62 $\pm$ 73.51		
	10	389.73 $\pm$ 30.81	522.22 $\pm$ 67.53	871.29 $\pm$ 97.89		
	12	431.08 $\pm$ 35.82	674.19 $\pm$ 89.85	1056.98 $\pm$ 177.88		
	15	425.65 $\pm$ 25.89	681.70 $\pm$ 78.85	1071.08 $\pm$ 118.60		
0.3	8	287.82 $\pm$ 21.50	475.45 $\pm$ 48.42	725.62 $\pm$ 82.14		
	10	371.13 $\pm$ 28.16	516.76 $\pm$ 57.41	855.38 $\pm$ 86.73		
	12	401.94 $\pm$ 28.71	717.75 $\pm$ 100.49	1090.98 $\pm$ 186.62		
	15	418.03 $\pm$ 30.04	702.35 $\pm$ 108.65	1087.23 $\pm$ 154.41		

Tabla 24. PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA A PARTIR DE CELULAS INTERSTICIALES DE HAMSTERES OBTENIDAS EMPLEANDO DIFERENTES PROTOCOLOS DE DISPERSION CELULAR.

Células intersticiales provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, obtenidas empleando diferentes protocolos de dispersión celular, fueron incubadas durante 3 hs en Medio 199, en presencia o ausencia de 5 y 100 mUI/ml de hCG.

Mediante el empleo de la técnica de dispersión mecánica se obtuvo un alto porcentaje de viabilidad celular sin contaminaciones significativas de la preparación con otros tipos celulares (Tabla 23). Sin embargo, el rendimiento celular (Tabla 23), y los niveles de T (Tabla 24) producidos fueron muy bajos. A las tres concentraciones de colagenasa empleadas, incubaciones de 12 y 15 minutos, alcanzaron un mayor rendimiento celular (Tabla 23) y niveles más altos de T liberados al Medio (Tabla 24) que las incubaciones realizadas durante menos tiempo (8 y 10 minutos). Por otra parte, a los 12 y 15 minutos de incubación con concentraciones de colagenasa de 0.2 y 0.3 mg/ml, se obtuvo un rendimiento celular (Tabla 23) y una producción de T

(Tabla 24) similar, y significativamente mayor que a la concentración de 0.1 mg/ml. Sin embargo, con el empleo de 0.3 mg/ml durante 12 y 15 minutos, se alcanzó una menor viabilidad y una mayor contaminación del preparado que a la concentración de 0.2 mg/ml (Tabla 23). Finalmente, a la concentración de 0.2 mg/ml de collagenasa durante 12 y 15 minutos, se obtuvo un número de células similar (Tabla 23) y niveles de T semejantes (Tabla 24), pero a los 15 minutos de incubación, el grado de contaminación con otros tipos celulares fue mayor y la viabilidad celular menor que a los 10 minutos (Tabla 23).

En base a estos resultados, las condiciones óptimas para la preparación de células intersticiales a partir de testículos de hámsteres fueron fijadas en: obtención celular a partir de pooles de 2-4 testículos por la técnica de collagenización a una concentración de 0.2 mg/ml durante 12 minutos.

4.3. CURVAS DOSIS-RESPUESTA A hCG

4.3.1. Hámsteres adultos expuestos a fotoperíodo normal

4.3.1.1. Curva dosis-respuesta a hCG en fragmentos testiculares

Las curvas dosis-respuesta de T, DHT y Diol al estímulo con hCG, en fragmentos testiculares provenientes de hámsteres adultos expuestos a FN, son ilustradas en la Fig. 59 y la Tabla 25.

La producción basal de T fue 3 y 4 veces mayor que los niveles de DHT y Diol, respectivamente, secretados al Medio de incubación en ausencia de hCG. La Fig. 59 (panel A) ilustra la curva dosis-respuesta de T al estímulo con hCG en testículos de hámsteres adultos normales. La curva de producción de T *in vitro* presentó una dosis efectiva 50 (DE_{50})= 9.028 ± 0.330 mUI/ml, y alcanzó un estímulo máximo a la concentración de 12.5 mUI/ml. Dicho estímulo máximo triplicó los niveles de T en el Medio en comparación con el grupo basal.

La curva dosis-respuesta al estímulo con hCG correspondiente a DHT, en testículos de animales adultos mantenidos en FN, se encuentra ilustrada en la Fig. 59, panel B. La curva de producción de DHT *in vitro* presentó una $DE_{50}=9.769\pm0.461$ mUI/ml. El estímulo máximo con hCG (100 mUI/ml) triplicó los niveles de DHT presentes en el Medio en comparación con el grupo basal.

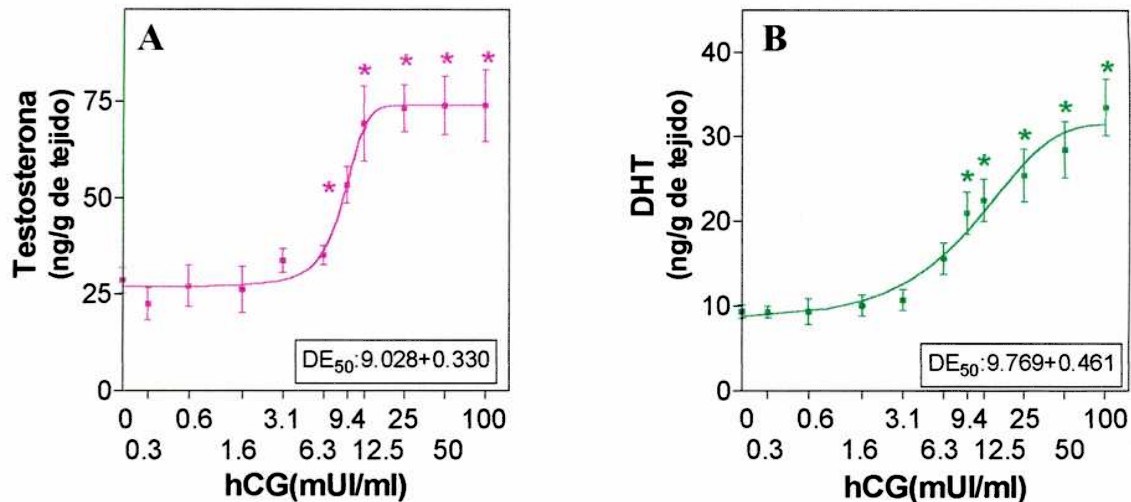


Figura 59. PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA Y DHT EN RESPUESTA A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE hCG, A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES PROVENIENTES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS NORMALES.

Fragmentos testiculares de tamaños semejantes provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de hCG.

Panel A: Producción "in vitro" de Testosterona.

Panel B: Producción "in vitro" de DHT.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n=5-6$). Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; *: $p<0.05$).

El agregado de hCG al Medio de incubación, no produjo cambios significativos en los niveles de Diol producidos, a ninguna de las concentraciones de hCG ensayadas (Tabla 25).

hCG (mUI/ml)	DIOL (ng/g de tejido)
0	6.91 $\pm$ 0.25
0.3	6.10 $\pm$ 0.22
0.6	5.67 $\pm$ 0.40
1.6	5.28 $\pm$ 0.41
3.1	6.08 $\pm$ 0.45
6.3	6.61 $\pm$ 0.45
9.4	6.84 $\pm$ 0.36
12.5	5.09 $\pm$ 0.43
25	6.05 $\pm$ 0.37
50	6.12 $\pm$ 0.40
100	6.35 $\pm$ 0.32

Tabla 25. PRODUCCION "IN VITRO" DE DIOL EN RESPUESTA A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE hCG, A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES PROVENIENTES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS NORMALES.

Fragmentos testiculares de tamaños semejantes provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de hCG.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n: 5-6). No se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

La Fig. 60 muestra la curva dosis-respuesta al estímulo con hCG correspondiente a la producción de andrógenos totales (T+DHT+Diol), en fragmentos testiculares obtenidos de hámsteres adultos expuestos a FN. A partir de dicha curva, se calculó una $DE_{50}=8.811\pm0.464$ mUI/ml, y se alcanzó una estimulación máxima a la concentración de 12.5 mUI/ml. El mayor estímulo de hCG empleado (100mUI/ml) elevó 2.5 veces los niveles de andrógenos en el Medio en comparación con el grupo basal.

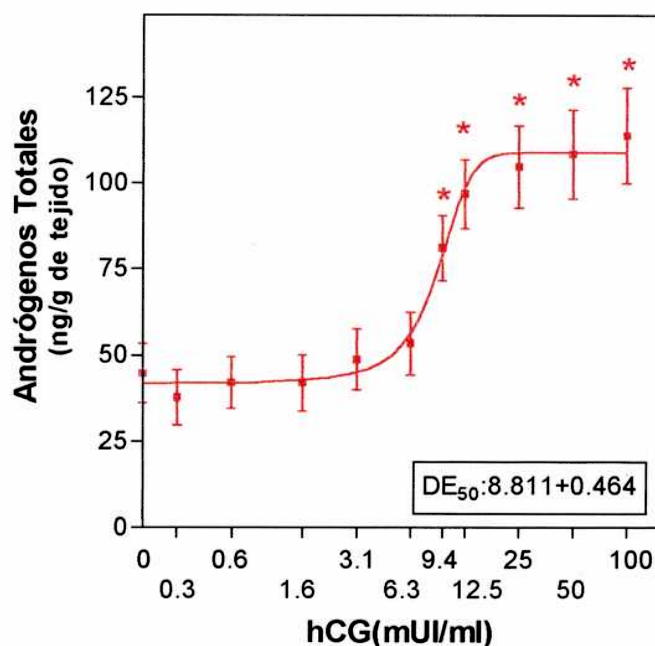


Figura 60. PRODUCCION "IN VITRO" DE ANDROGENOS TOTALES EN RESPUESTA A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE hCG, A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES PROVENIENTES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS NORMALES.

Fragmentos testiculares de tamaños semejantes provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de hCG. Se ha considerado a la producción "in vitro" de andrógenos totales como la sumatoria de los niveles de Testosterona, DHT y Diol secretados al medio.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n=5-6$). Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; *: $p<0.05$).

4.3.1.2. Curva dosis-respuesta a hCG en células intersticiales

La Fig. 61 muestra la producción de T a partir de preparaciones crudas de células de Leydig provenientes de hámsteres adultos mantenidos en FN. Así, 10^6 células fueron incubadas durante 3 horas con carbógeno y agitación, en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de hCG (0.5, 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, 25 y 100 mUI/ml). A partir de la curva dosis-respuesta se calculó una $DE_{50}=5.267\pm0.648$ mUI/ml. La producción de T alcanzó niveles máximos frente a un estímulo con 12.5 mUI/ml de hCG en el Medio de incubación. La mayor

concentración de hCG empleada (100mUI/ml), elevó 2.5 veces los niveles de T en el Medio en relación al grupo basal.

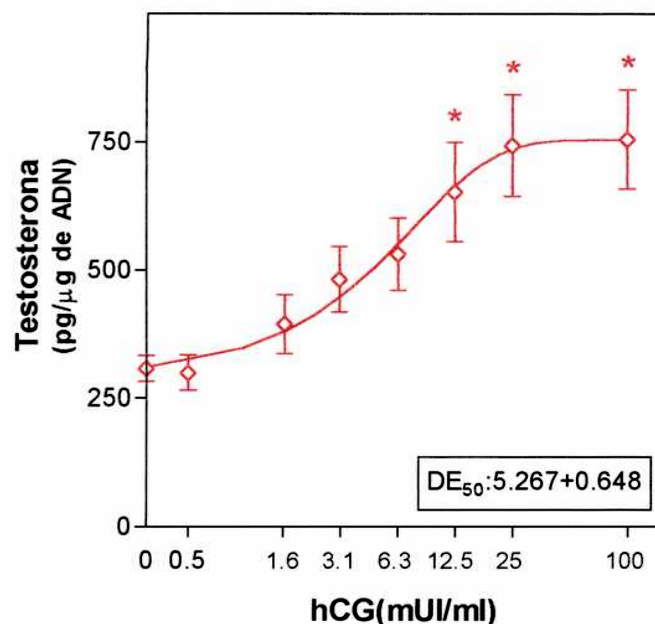


Figura 61. PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA EN RESPUESTA A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE hCG, A PARTIR DE CELULAS INTERSTICIALES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS NORMALES.

Células intersticiales provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubadas durante 3 hs en Medio 199, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de hCG.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n=5-6$). Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; *: $p<0.05$).

4.3.2. Hámsteres de 30 días de edad expuestos a fotoperíodo normal

4.3.2.1. Curva dosis-respuesta a hCG en fragmentos testiculares

La producción de T (Fig. 62, panel A), DHT (Fig. 62, panel B) y Diol (Fig. 62, panel C), en condiciones basales y en respuesta a concentraciones crecientes de hCG, fue evaluada en fragmentos testiculares provenientes de hámsteres prepúberes (30 días de edad) expuestos a FN.

La producción basal de Diol fue 9 y 2.5 veces mayor que los niveles de T y DHT, respectivamente, secretados al Medio de incubación en ausencia de hCG.

La curva de producción de T *in vitro* presentó una $DE_{50}=11.932\pm0.696$ mUI/ml. El estímulo máximo con hCG (100mUI/ml) cuadruplicó los niveles de T en el Medio en comparación con el grupo basal (Fig. 62, panel A).

La curva de producción de DHT *in vitro* permitió calcular una $DE_{50}=13.363\pm0.580$ mUI/ml. El estímulo máximo con hCG (100 mUI/ml) aumentó 3.5 veces los niveles de DHT presentes en el Medio en comparación con el grupo basal (Fig. 62, panel B).

La curva de producción de Diol *in vitro* presentó una $DE_{50}=10.532\pm0.502$ mUI/ml. El agregado de una concentración máxima de hCG (100mUI/ml), quintuplicó los niveles liberados durante las 6 hs de incubación (Fig. 62, panel C).

La Fig. 62 (panel D) muestra la curva dosis-respuesta al estímulo con hCG correspondiente a la producción de andrógenos totales (T+DHT+Diol), en fragmentos testiculares obtenidos de hámsteres prepuberales expuestos a FN. A partir de dicha curva se calculó una $DE_{50}=11.649\pm0.479$ mUI/ml. El estímulo máximo con hCG (100mUI/ml) quintuplicó los niveles de andrógenos en el Medio, en comparación con el grupo basal.

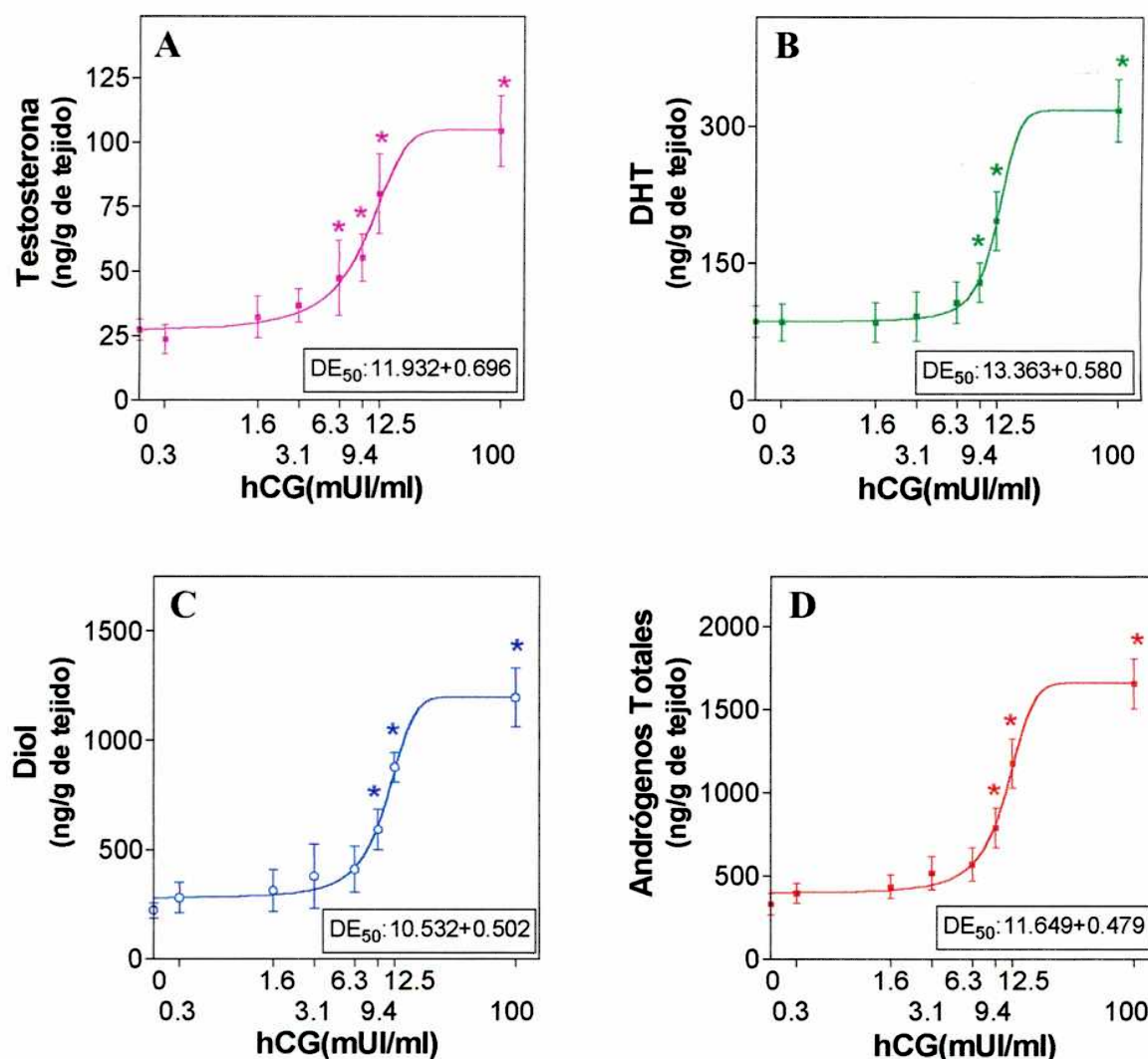


Figura 62. PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA, DHT, DIOL Y ANDROGENOS TOTALES EN RESPUESTA A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE hCG, A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES PROVENIENTES DE HAMSTERES DORADOS PREPUBERES.

Fragmentos testiculares de tamaños semejantes provenientes de hámsteres Dorados prepúberes mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de hCG. Se ha considerado a la producción "in vitro" de andrógenos totales como la sumatoria de los niveles de Testosterona, DHT y Diol secretados al medio.

Panel A: Producción "in vitro" de Testosterona.

Panel B: Producción "in vitro" de DHT.

Panel C: Producción "in vitro" de Diol.

Panel D: Producción "in vitro" de andrógenos totales.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n=5-6$). Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; *: $p<0.05$).

4.3.3. Hámsteres adultos expuestos a fotoperíodo corto durante 14 semanas

4.3.3.1. Curva dosis-respuesta a hCG en fragmentos testiculares

La Fig. 63 (paneles A, B, C y D) muestra las curvas dosis-respuesta al estímulo con hCG en fragmentos testiculares obtenidos de animales expuestos a FC durante 14 semanas.

La producción basal de Diol fue 8 y 4 veces mayor que los niveles de T y DHT, respectivamente, secretados al Medio de incubación en ausencia de hCG.

La curva de producción de T *in vitro* presentó una $DE_{50}=4.642\pm0.587$ mUI/ml, y alcanzó niveles máximos a la concentración de 9.4 mUI/ml. La mayor concentración de hCG utilizada (100mUI/ml), elevó 2.5 veces los niveles de T en el Medio de incubación en relación al grupo basal (Fig. 63, panel A).

La curva dosis-respuesta al estímulo con hCG correspondiente a DHT, se encuentra ilustrada en la Fig. 63 (panel B). La producción de DHT *in vitro* permitió calcular una $DE_{50}=5.961\pm0.600$ mUI/ml. El estímulo máximo con hCG (100 mUI/ml) duplicó los niveles de DHT presentes en el Medio en comparación con el grupo basal.

La producción de Diol alcanzó un estímulo máximo a la concentración de hCG de 12.5 mUI/ml, triplicando los niveles detectados en el grupo basal. A partir de la curva dosis-respuesta correspondiente a esta hormona se calculó una $DE_{50}=5.297\pm0.737$ mUI/ml (Fig. 63, panel C).

La Fig. 63 (panel D) muestra la curva dosis-respuesta al estímulo con hCG correspondiente a la producción de andrógenos totales (T+DHT+Diol), en fragmentos testiculares obtenidos de hámsteres adultos expuestos a FC durante 14 semanas. A partir de dicha curva se calculó una $DE_{50}=4.988\pm0.733$ mUI/ml. La concentración máxima de hCG empleada (100mUI/ml) aumentó 2.5 veces los niveles de andrógenos en el Medio en comparación con el grupo basal.

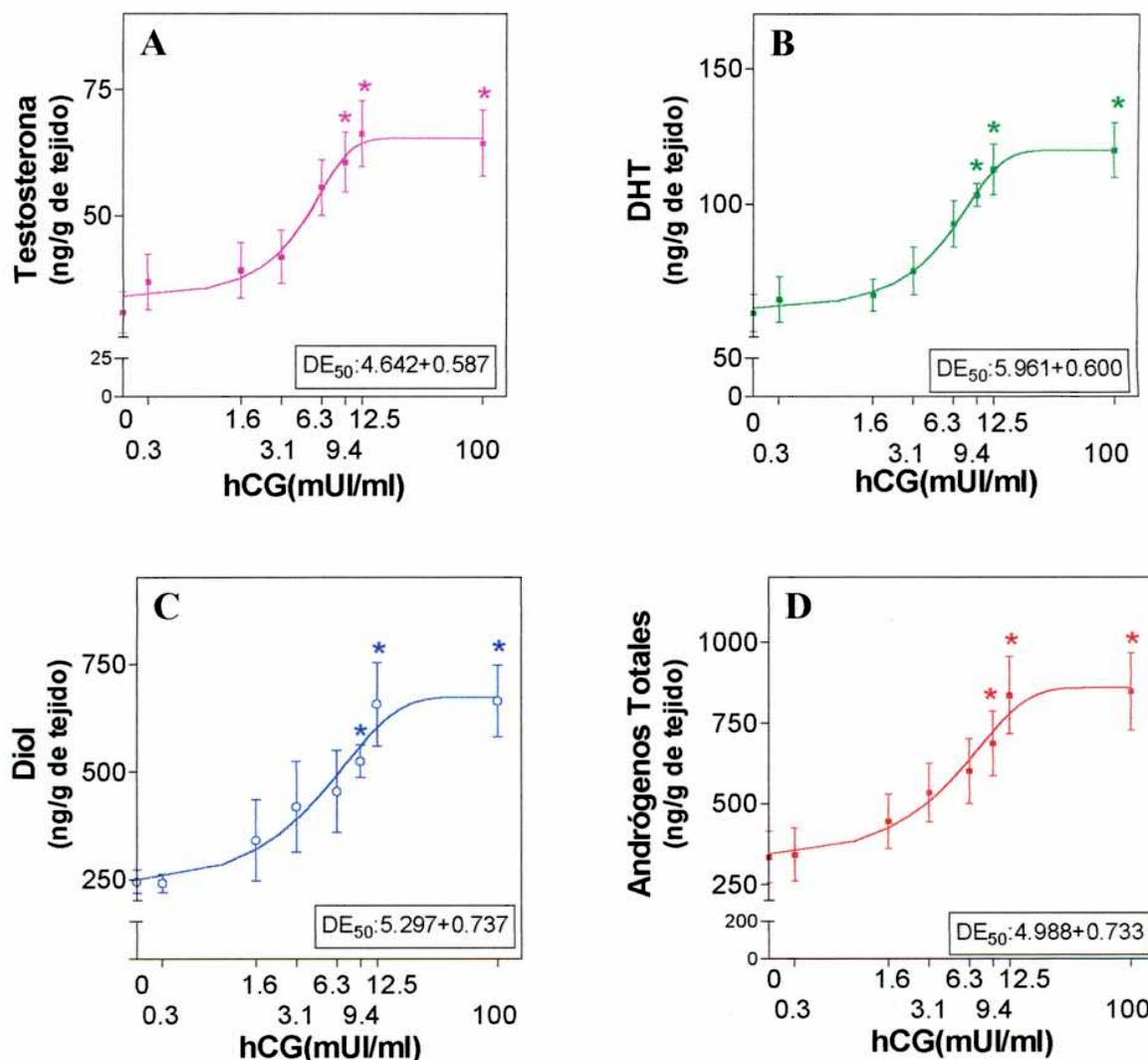


Figura 63. PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA, DHT, DIOL Y ANDROGENOS TOTALES EN RESPUESTA A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE hCG, A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES PROVENIENTES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS REGRESIONADOS.

Fragmentos testiculares de tamaños semejantes provenientes de hámsteres Dorados adultos expuestos durante 14 semanas a fotoperíodo corto, fueron incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de hCG. Se ha considerado a la producción "in vitro" de andrógenos totales como la sumatoria de los niveles de Testosterona, DHT y Diol secretados al medio.

Panel A: Producción "in vitro" de Testosterona.

Panel B: Producción "in vitro" de DHT.

Panel C: Producción "in vitro" de Diol.

Panel D: Producción "in vitro" de andrógenos totales.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n=5-6$). Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; *: $p<0.05$).

La producción total de andrógenos en respuesta al estímulo con hCG, en testículos provenientes de hámsteres adultos y prepuberales mantenidos en FN, no mostró modificaciones significativas en el valor de su DE_{50} (Figs. 60 y 62, panel D). En cambio, en fragmentos gonadales pertenecientes a hámsteres adultos expuestos a FC durante 14 semanas, la DE_{50} correspondiente a la curva de producción de andrógenos totales en respuesta a concentraciones crecientes de hCG, fue significativamente menor que la determinada en animales adultos e inmaduros sometidos a condiciones normales de luminosidad (Figs. 60, 62 y 63, panel D).

4.4. INFLUENCIA DE GABA SOBRE LA PRODUCCION DE ANDROGENOS

4.4.1. Hámsteres adultos expuestos a fotoperíodo normal

4.4.1.1. Influencia de GABA sobre la producción de andrógenos por fragmentos testiculares

Con el fin de estudiar el papel desempeñado por GABA en la producción de andrógenos gonadales, se incubaron fragmentos testiculares de hámsteres adultos expuestos a FN en condiciones basales o en presencia de un estímulo máximo con hCG (100 mUI/ml), y en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de dicho neurotransmisor en el Medio (10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M).

El agregado de GABA en el Medio de incubación, no produjo modificaciones significativas en la producción de T, DHT y Diol, en condiciones basales o post-hCG (Tabla 26).

Concentración de hCG (mUI/ml)	Concentración de GABA (M)	Producción de andrógenos <i>in vitro</i>		
		Testosterona (ng/g de tejido)	DHT (ng/g de tejido)	Diol (ng/g de tejido)
0	0	32.54±3.35	16.04±1.80	7.46±0.62
0	10 ⁻¹¹	35.33±3.84	15.72±2.92	6.97±0.49
0	10 ⁻¹⁰	30.41±3.65	13.20±1.65	7.12±0.73
0	10 ⁻⁹	28.37±3.05	12.34±2.66	7.05±0.66
0	10 ⁻⁸	33.86±4.55	17.18±1.97	7.25±0.67
0	10 ⁻⁷	30.70±3.21	14.54±2.04	6.84±0.53
0	10 ⁻⁶	36.22±4.11	13.36±2.14	7.11±0.45
0	10 ⁻⁵	35.78±3.33	18.27±3.06	7.32±0.61
100	0	99.71±9.88	29.61±3.25	9.12±0.92
100	10 ⁻¹¹	104.34±8.57	30.25±3.34	10.07±1.05
100	10 ⁻¹⁰	103.47±10.17	28.33±2.97	9.89±1.13
100	10 ⁻⁹	97.48±8.55	25.60±4.02	9.97±0.72
100	10 ⁻⁸	109.00±7.56	32.75±3.58	9.23±0.81
100	10 ⁻⁷	98.18±9.92	29.40±4.31	10.45±1.07
100	10 ⁻⁶	95.77±8.80	27.26±3.72	10.02±0.96
100	10 ⁻⁵	103.32±7.29	25.46±4.38	9.48±0.74

Tabla 26. EFECTO DE GABA SOBRE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA, DHT Y DIOL A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES PROVENIENTES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS NORMALES.

Fragmentos testiculares de tamaños semejantes provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), y con o sin el agregado de concentraciones crecientes de GABA en el medio.

Los valores representan la media ± ES (n = 5-6). No se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; p > 0.05).

4.4.1.2. Influencia de GABA sobre la producción de andrógenos en células intersticiales

Células intersticiales obtenidas de testículos de hámsteres adultos mantenidos en condiciones estándares de luminosidad, fueron incubadas en presencia o ausencia de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), y con y sin el agregado de concentraciones crecientes de GABA (10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M) (Tabla 27). La presencia de GABA en el Medio de incubación, no produjo cambios significativos en la producción de T basal y estimulada por hCG.

Concentración de GABA (M)	Producción de Testosterona <i>in vitro</i> (pg/ μ g de ADN)	
	Basal	hCG (100 mUI/ml)
0	240.52 $\pm$ 15.01	1302.55 $\pm$ 108.88
10^{-11}	249.36 $\pm$ 17.38	1274.54 $\pm$ 114.12
10^{-10}	248.44 $\pm$ 16.30	1250.98 $\pm$ 105.82
10^{-9}	245.38 $\pm$ 26.69	1351.14 $\pm$ 94.61
10^{-8}	240.87 $\pm$ 27.01	1280.56 $\pm$ 103.16
10^{-7}	242.03 $\pm$ 27.58	1322.40 $\pm$ 125.37
10^{-6}	245.56 $\pm$ 32.66	1353.77 $\pm$ 92.30
10^{-5}	246.82 $\pm$ 31.45	1298.67 $\pm$ 98.97

Tabla 27. EFECTO DE GABA SOBRE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA A PARTIR DE CELULAS INTERSTICIALES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS NORMALES.

Células intersticiales provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubadas durante 3 hs en Medio 199, en presencia o ausencia de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), y con o sin el agregado de concentraciones crecientes de GABA en el medio.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 5-6). No se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

4.4.2. Hámsteres de 30 días de edad expuestos a fotoperíodo normal

4.4.2.1 Influencia de GABA sobre la producción de andrógenos por fragmentos testiculares

Fragmentos testiculares provenientes de hámsteres prepúberes expuestos a FN, fueron incubados en condiciones basales o en presencia de 100 mUI/ml de hCG, con y sin el agregado de diferentes concentraciones de GABA en el Medio (10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M).

Concentración de hCG (mUI/ml)	Concentración de GABA (M)	Producción de andrógenos <i>in vitro</i>		
		Testosterona (ng/g de tejido)	DHT (ng/g de tejido)	Diol (ng/g de tejido)
0	0	28.32±2.96	128.02±8.98	238.87±38.92
0	10^{-11}	27.54±4.01	120.45±10.01	244.52±32.55
0	10^{-9}	26.22±3.66	132.54±8.65	232.84±43.90
0	10^{-7}	23.84±3.53	114.10±9.50	229.37±39.61
0	10^{-6}	27.11±4.45	122.08±9.41	226.72±42.08
0	10^{-5}	25.00±5.34	119.87±10.20	250.04±34.11
100	0	151.22±10.09	511.02±58.10	1250.42±154.12
100	10^{-11}	135.07± 9.05	496.32±45.51	1314.87±140.32
100	10^{-9}	129.94±10.72	451.12±28.27	1212.20±167.07
100	10^{-7}	140.48± 8.77	508.39±38.74	1283.16±150.22
100	10^{-6}	129.02± 9.81	527.06±44.18	1209.27±133.80
100	10^{-5}	148.83±12.89	487.64±52.90	1296.33±162.71

Tabla 28. EFECTO DE GABA SOBRE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA, DHT Y DIOL A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES PROVENIENTES DE HAMSTERES DORADOS PREPUBERES.

Fragmentos testiculares de tamaños semejantes provenientes de hámsteres Dorados prepúberes mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), y con o sin el agregado de concentraciones crecientes de GABA en el medio.

Los valores representan la media ± ES (n = 5-6). No se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control (test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

A ninguna de las concentraciones de GABA empleadas en el ensayo, se observaron cambios significativos en los niveles de T, DHT y Diol secretados al Medio, en condiciones basales y en presencia de un estímulo máximo de hCG (Tabla 28).

4.4.3. Hámsteres adultos expuestos a fotoperiodo corto durante 14 semanas

4.4.3.1. Influencia de GABA sobre la producción de andrógenos por fragmentos testiculares

Testículos regresionados provenientes de hámsteres adultos expuestos a FC durante 14 semanas, fueron incubados en presencia o ausencia de 100 mUI/ml de hCG, con y sin el agregado al Medio de incubación de concentraciones de GABA 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M.

La presencia de GABA en el Medio de incubación no afectó la producción de T, DHT y Diol, en ninguna de las condiciones experimentales analizadas (Tabla 29).

Concentración de hCG (mUI/ml)	Concentración de GABA (M)	Producción de andrógenos <i>in vitro</i>		
		Testosterona (ng/g de tejido)	DHT (ng/g de tejido)	Diol (ng/g de tejido)
0	0	38.33 $\pm$ 3.61	51.24 $\pm$ 5.83	257.35 $\pm$ 36.22
0	10 ⁻¹¹	37.45 $\pm$ 3.97	50.57 $\pm$ 4.91	250.38 $\pm$ 32.90
0	10 ⁻⁹	32.24 $\pm$ 3.29	52.84 $\pm$ 5.56	252.16 $\pm$ 33.97
0	10 ⁻⁷	33.78 $\pm$ 3.50	54.07 $\pm$ 6.05	260.44 $\pm$ 38.74
0	10 ⁻⁶	37.17 $\pm$ 4.05	52.73 $\pm$ 4.16	256.25 $\pm$ 40.14
0	10 ⁻⁵	35.80 $\pm$ 4.37	49.82 $\pm$ 5.22	251.53 $\pm$ 35.01
100	0	85.27 $\pm$ 5.91	91.26 $\pm$ 5.98	460.31 $\pm$ 34.65
100	10 ⁻¹¹	81.31 $\pm$ 4.75	96.52 $\pm$ 5.44	469.43 $\pm$ 40.15
100	10 ⁻⁹	90.04 $\pm$ 5.42	95.16 $\pm$ 6.72	442.30 $\pm$ 36.13
100	10 ⁻⁷	87.81 $\pm$ 4.67	89.49 $\pm$ 5.41	453.67 $\pm$ 37.20
100	10 ⁻⁶	89.20 $\pm$ 5.18	92.62 $\pm$ 4.12	466.72 $\pm$ 33.60
100	10 ⁻⁵	83.35 $\pm$ 3.99	95.40 $\pm$ 5.33	451.00 $\pm$ 42.72

Tabla 29. EFECTO DE GABA SOBRE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA, DHT Y DIOL A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES PROVENIENTES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS REGRESIONADOS.

Fragmentos testiculares de tamaños semejantes provenientes de hámsteres Dorados adultos expuestos durante 14 semanas a fotoperíodo corto, fueron incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), y con o sin el agregado de concentraciones crecientes de GABA en el medio.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n = 5-6). No se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; p > 0.05).

4.5. INFLUENCIA DE SEROTONINA SOBRE LA PRODUCCION DE ANDROGENOS

4.5.1. Hámsteres adultos expuestos a fotoperíodo normal

4.5.1.1. Influencia de serotonina sobre la producción de andrógenos por fragmentos testiculares

Con el fin de estudiar el rol de la 5-HT en la producción de andrógenos gonadales, se incubaron fragmentos testiculares de hámsteres adultos expuestos a FN en condiciones basales o en presencia de un estímulo máximo con hCG (100 mUI/ml), y en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de dicho neurotransmisor en el Medio (10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M) (Fig. 64, paneles A y B; y Fig. 65, paneles A y B).

Concentraciones entre 10^{-8} M y 10^{-5} M de 5-HT en el Medio de incubación, produjeron una caída significativa en la producción basal de T. El agregado de concentraciones de 5-HT entre 10^{-10} M y 10^{-5} M, en presencia de un estímulo máximo con hCG en el Medio, también disminuyó significativamente la producción de T (Fig. 64, panel A). La producción basal de DHT fue significativamente disminuída a concentraciones entre 10^{-9} M a 10^{-5} M de 5-HT; mientras que, la producción de DHT estimulada por hCG fue inhibida en presencia de concentraciones de 5-HT entre 10^{-8} M a 10^{-5} M (Fig. 64, panel B). El agregado de 5-HT al Medio de incubación, no produjo cambios significativos en la producción de Diol basal o estimulada con hCG (Fig. 65, panel A). Dado que, los niveles de Diol secretados representan sólo el 15% de los andrógenos totales producidos en condiciones basales, y el 8% de los liberados en presencia de un estímulo máximo de hCG; su influencia sobre la producción testicular de andrógenos totales (T+DHT+Diol) es mínima, razón por la que este parámetro fue igualmente inhibido por la presencia en el Medio de incubación de concentraciones de 5-HT entre 10^{-8} M y 10^{-5} M (Fig. 65, panel B).

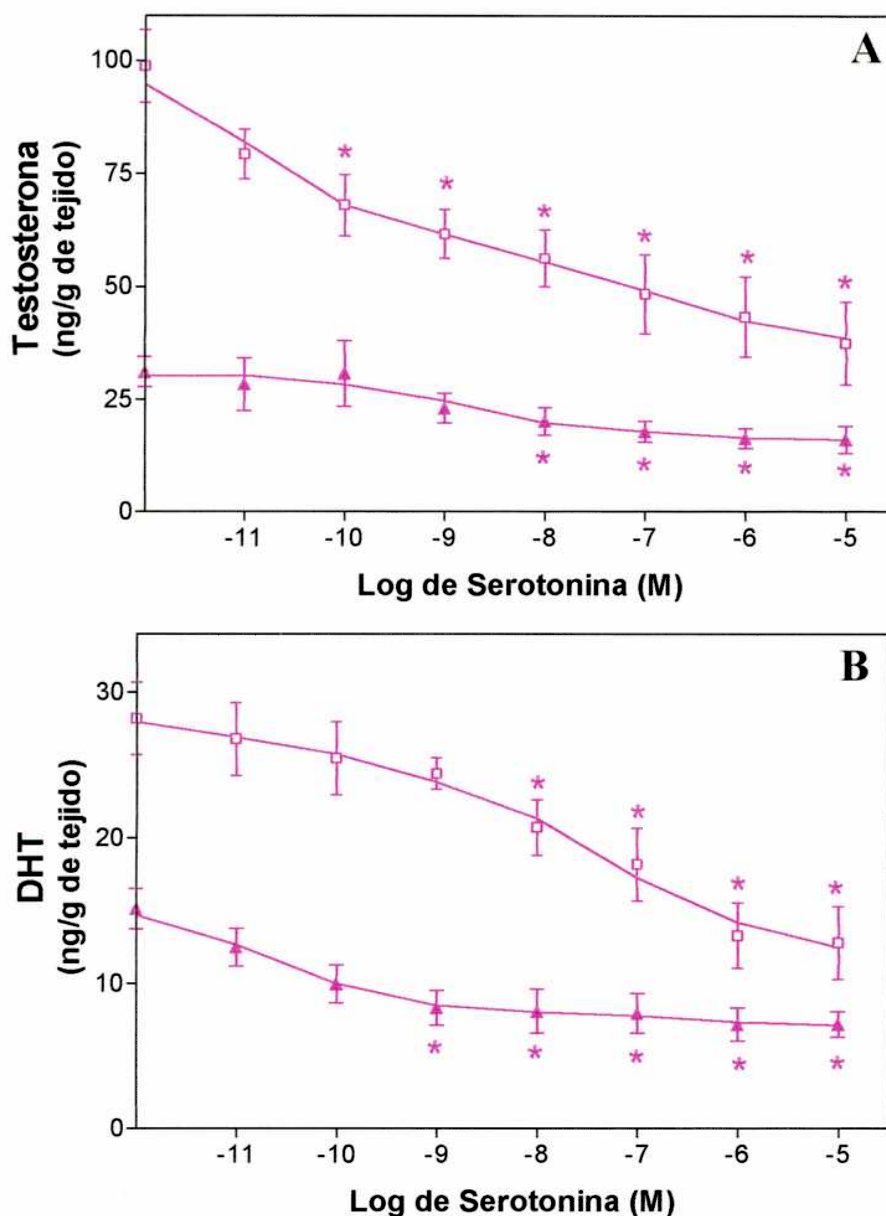


Figura 64. EFECTO DE SEROTONINA (5-HT) SOBRE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA Y DHT A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES PROVENIENTES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS NORMALES.

Fragmentos testiculares de tamaños semejantes provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), y con o sin el agregado de concentraciones crecientes de 5-HT en el medio.

▲: Condiciones basales.

□: Estimulación máxima con hCG (100mUI/ml).

Panel A: Producción "in vitro" de Testosterona.

Panel B: Producción "in vitro" de DHT.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n=5-6$). Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; *: $p<0.05$).

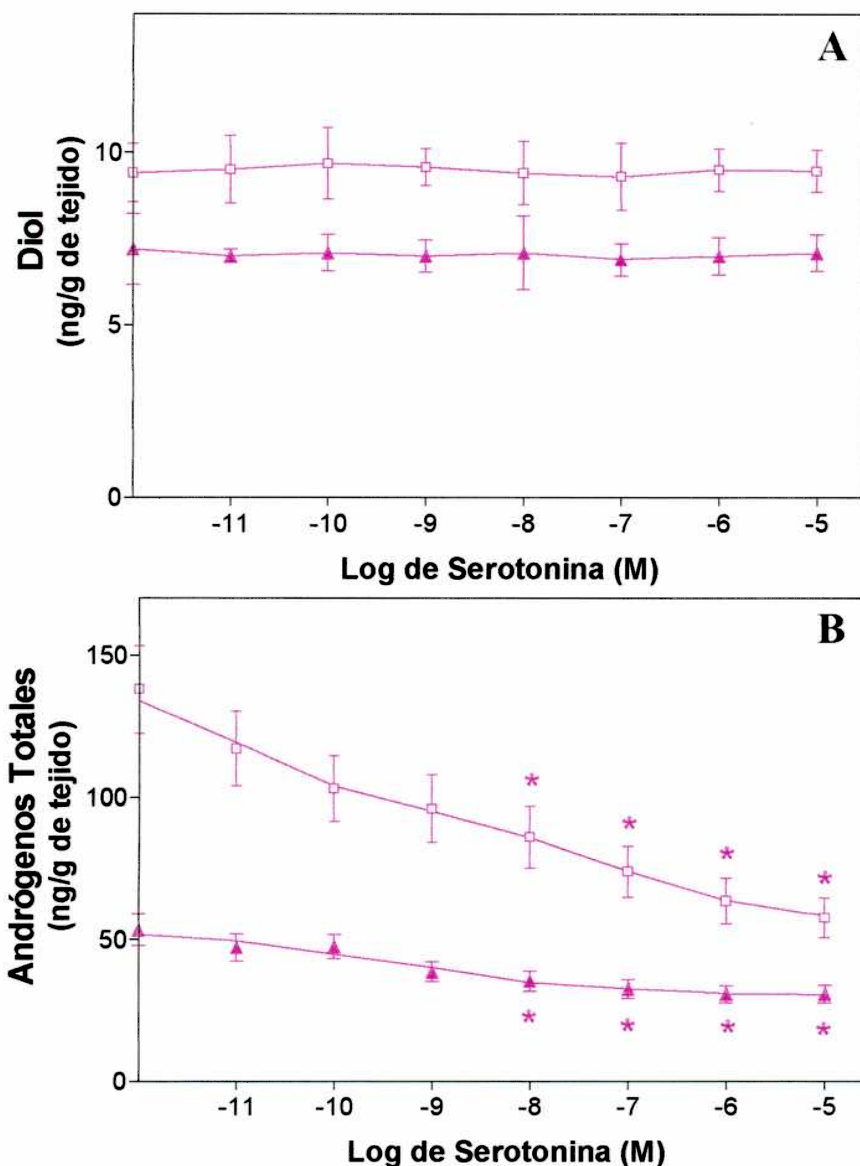


Figura 65. EFECTO DE SEROTONINA (5-HT) SOBRE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE DIOL Y ANDROGENOS TOTALES A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES PROVENIENTES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS NORMALES.

Fragmentos testiculares de tamaños semejantes provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), y con o sin el agregado de concentraciones crecientes de 5-HT en el medio. Se ha considerado a la producción "in vitro" de andrógenos totales como la sumatoria de los niveles de Testosterona, DHT y Diol secretados al medio.

▲: Condiciones basales.

□: Estimulación máxima con hCG (100mUI/ml).

Panel A: Producción "in vitro" de Diol.

Panel B: Producción "in vitro" de andrógenos totales.

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n=5-6$). Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; *: $p<0.05$).

4.5.1.2 Influencia de serotonina sobre la producción de andrógenos en células intersticiales

Preparaciones crudas de células de Leydig aisladas a partir de testículos provenientes de hámsteres adultos, mantenidos en condiciones estándares de luminosidad, fueron incubadas en presencia o ausencia de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), y con y sin el agregado de concentraciones crecientes de 5-HT: 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M (Fig. 66). La producción basal de T fue significativamente inhibida por concentraciones de 5-HT entre 10^{-9} M y 10^{-5} M. La presencia en el Medio de incubación de concentraciones de 5-HT entre 10^{-8} M y 10^{-5} M, produjo también una caída significativa en la producción de T estimulada por hCG (Fig. 66).

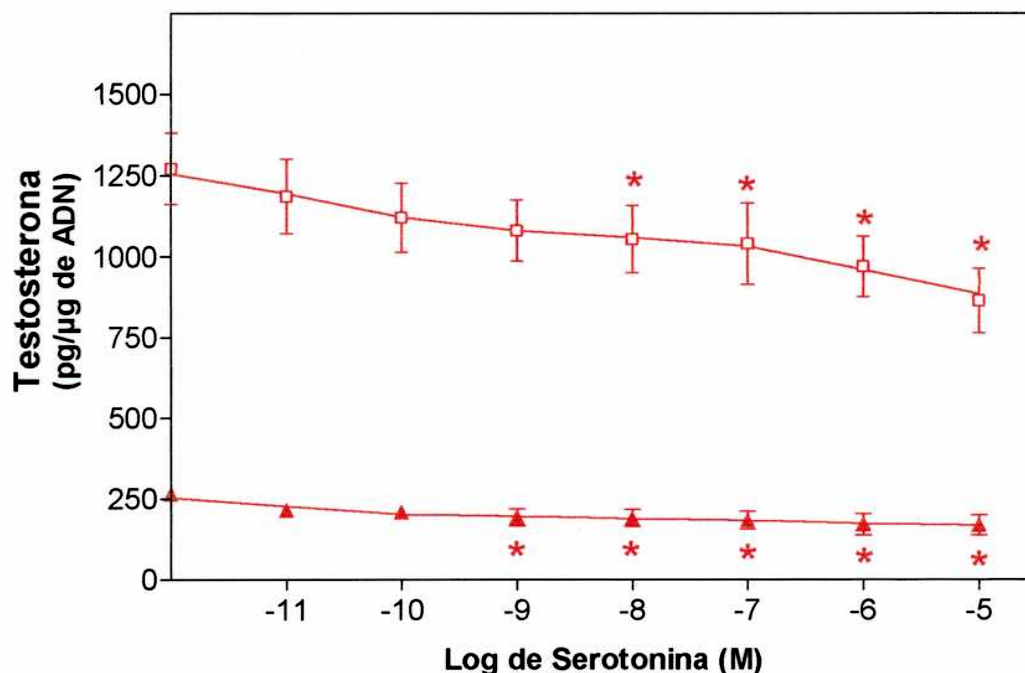


Figura 66. EFECTO DE SEROTONINA (5-HT) SOBRE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA A PARTIR DE CELULAS INTERSTICIALES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS NORMALES.

Células intersticiales provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubadas durante 3 hs en Medio 199, en presencia o ausencia de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), y con o sin el agregado de concentraciones crecientes de 5-HT en el medio.

▲: Condiciones basales.

◻: Estimulación máxima con hCG (100mUI/ml).

Los valores representan la media $\pm$ ES (n=5-6). Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; *: $p < 0.05$).

4.5.1.3. Influencia de dibutiril adenosina 3',5' monofosfato cíclico en la regulación serotoninérgica de la producción de andrógenos en células intersticiales

Células intersticiales provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en FN, fueron incubadas en Medio 199 en presencia o ausencia de: un estímulo máximo con hCG (100 mUI/ml), concentraciones crecientes de 5-HT (10^{-9} , 10^{-7} y 10^{-6} M), y una concentración 0.5 mM de dbAMPc (Fig. 67).

El estímulo máximo con hCG (100 mUI/ml) cuadruplicó los niveles de T presentes en el Medio en comparación con el grupo basal (panel A). El agregado de dbAMPc (0.5 mM) elevó la producción basal de T, a niveles similares a los detectables en estimulación máxima con hCG (panel A).

La producción de T estimulada por hCG, fue inhibida en presencia de concentraciones de 5-HT 10^{-7} M y 10^{-6} M; mientras que, la concentración de 10^{-9} M, no produjo modificaciones significativas en relación al grupo control (panel B).

El agregado de dbAMPc (0.5mM), aumentó significativamente la producción de T estimulada por hCG, en presencia de concentraciones de 5-HT 10^{-7} M y 10^{-6} M (panel B). No obstante, luego del agregado de dbAMPc, la liberación de T post-hCG en presencia de una concentración de 5-HT 10^{-6} M, permaneció significativamente disminuída en comparación con el grupo control (panel B).

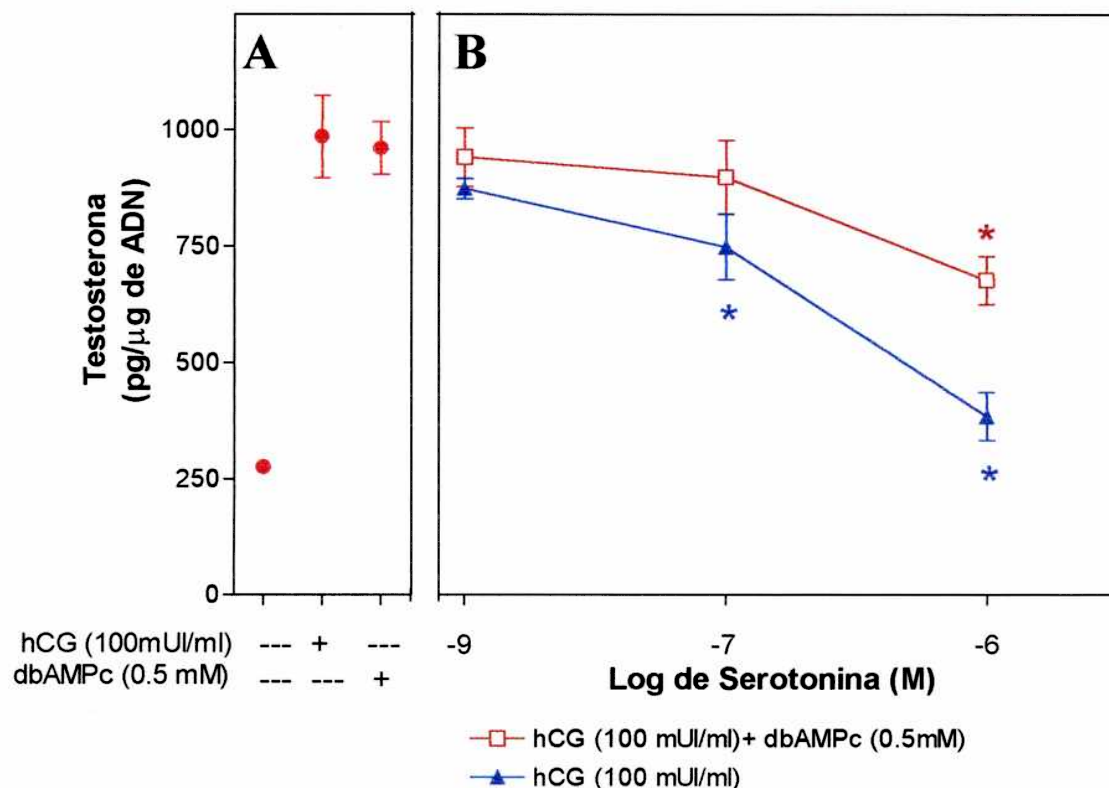


Figura 67. ROL DEL DIBUTIRIL ADENOSINA 3',5' MONOFOSFATO CICLICO (dbAMPc) EN LA REGULACION SEROTONINERGICA DE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA A PARTIR DE CELULAS INTERSTICIALES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS NORMALES.

Células intersticiales provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubadas durante 3 hs en Medio 199, en presencia o ausencia de: a) un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), b) concentraciones crecientes de serotonina, y c) dbAMPc (0.5 mM).

Los valores representan la media $\pm$ ES ($n=5-6$). Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; *: $p<0.05$).

4.5.1.4. Influencia del factor liberador de corticotrofina sobre la producción de andrógenos en células intersticiales

Preparaciones crudas de células intersticiales provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en FN, fueron incubadas en presencia o ausencia de: un estímulo máximo con hCG (100 mUI/ml), una concentración 10^{-6} M de CRF, y una dilución 1/100 de un anticuerpo específico anti-CRF (Fig. 68).

El agregado de CRF (10^{-6} M), disminuyó significativamente la producción de T basal y estimulada por hCG. En cambio, en presencia del anticuerpo anti-CRF, la liberación de T no fue modificada por el agregado de CRF en el medio de incubación.

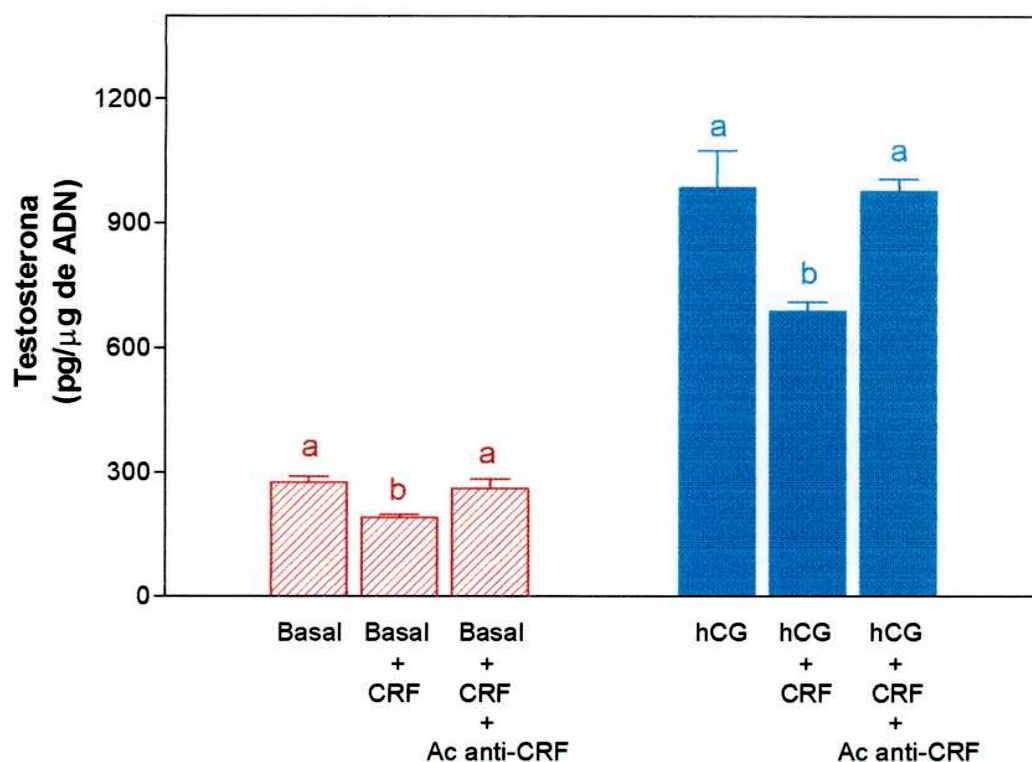


Figura 68. EFECTO DEL FACTOR LIBERADOR DE CORTICOTROFINA (CRF) SOBRE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA A PARTIR DE CELULAS INTERSTICIALES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS NORMALES.

Células intersticiales provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubadas durante 3 hs en Medio 199, en presencia o ausencia de: a) un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), b) CRF (10^{-6} M), y c) anticuerpo anti-CRF (dilución 1/100).

Los valores representan la media $\pm$ ES (n=5-6). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

4.5.1.5. Rol del factor liberador de corticotrofina en la regulación serotoninérgica de la producción de andrógenos en células intersticiales

Células intersticiales provenientes de hámsteres Dorados adultos expuestos a FN, fueron incubadas en presencia o ausencia de: un estímulo máximo con hCG (100 mUI/ml), una concentración 10^{-6} M de 5-HT, y diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10000 de un anticuerpo específico anti-CRF (Fig. 69).

La presencia de 5-HT (10^{-6} M), disminuyó significativamente la producción de T basal y estimulada con hCG en relación al grupo control.

El agregado del anticuerpo anti-CRF en diluciones 1/1000 y 1/10000, no produjo cambios significativos en la liberación de T al medio de incubación en presencia de 5-HT (10^{-6} M). En cambio, una dilución 1/100 del anticuerpo, bloqueó el efecto inhibitorio de 5-HT sobre la producción de T basal y estimulada con hCG.

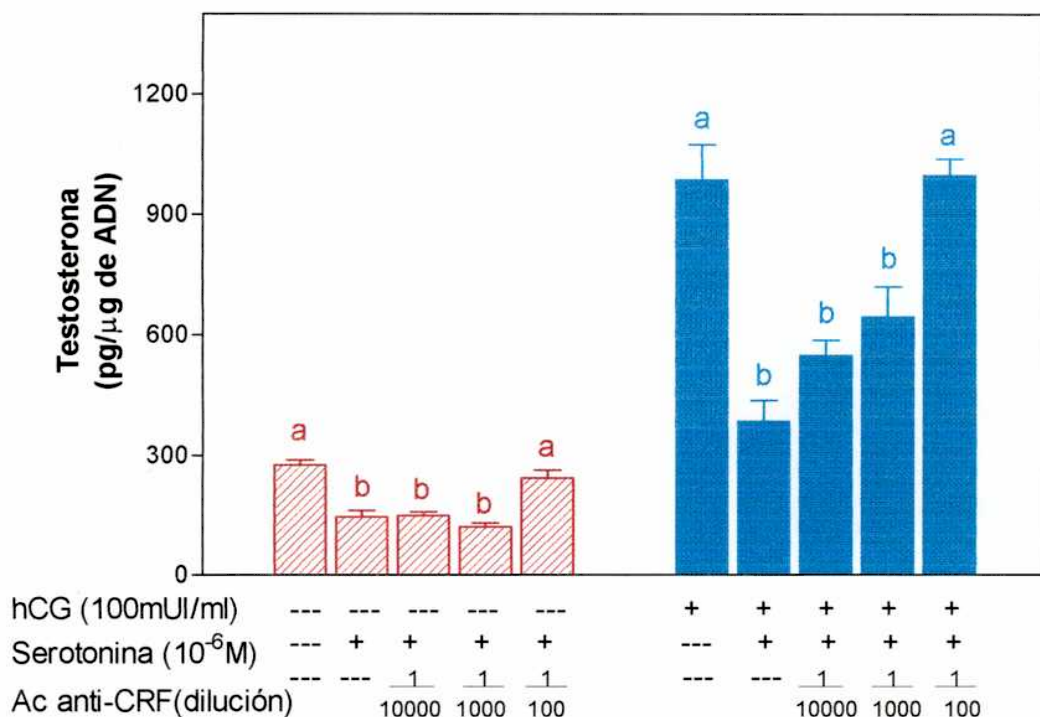


Figura 69. ROL DEL FACTOR LIBERADOR DE CORTICOTROFINA (CRF) EN LA REGULACION SEROTONINERGICA DE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA A PARTIR DE CELULAS INTERSTICIALES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS NORMALES.

Células intersticiales provenientes de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubadas durante 3 hs en Medio 199, en presencia o ausencia de: a) un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), b) serotonina (10^{-6} M), y c) anticuerpo anti-CRF (diluciones: 1/100, 1/1000, y 1/10000).

Los valores representan la media $\pm$ ES (n=5-6). Distintas letras denotan diferencias significativas (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

4.5.2. Hámsteres de 30 días de edad expuestos a fotoperíodo normal

4.5.2.1 Influencia de serotonina sobre la producción de andrógenos por fragmentos testiculares

Fragmentos testiculares provenientes de hámsteres prepúberes expuestos a FN, fueron incubados en condiciones basales o en presencia de 100 mUI/ml de

hCG, con y sin el agregado de diferentes concentraciones de 5-HT en el Medio (10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M) (Fig. 70, paneles A y B; y Fig. 71, paneles A y B).

No se observaron cambios significativos, a ninguna de las concentraciones de 5-HT utilizadas en el ensayo, tanto en los niveles de T (Fig. 70, panel A) como en los de DHT (Fig. 70, panel B) secretados al Medio.

La presencia de concentraciones de 5-HT entre 10^{-7} M y 10^{-5} M en el Medio de incubación, produjo una caída significativa en la producción de Diol en condiciones basales y post-hCG (Fig. 71, panel A).

Puesto que los niveles de Diol secretados duplican los de DHT, y óctuplican los de T, la producción gonadal de andrógenos totales en hámsteres prepúberes, fue significativamente inhibida por concentraciones de 5-HT entre 10^{-7} M y 10^{-5} M (Fig. 71, panel B).

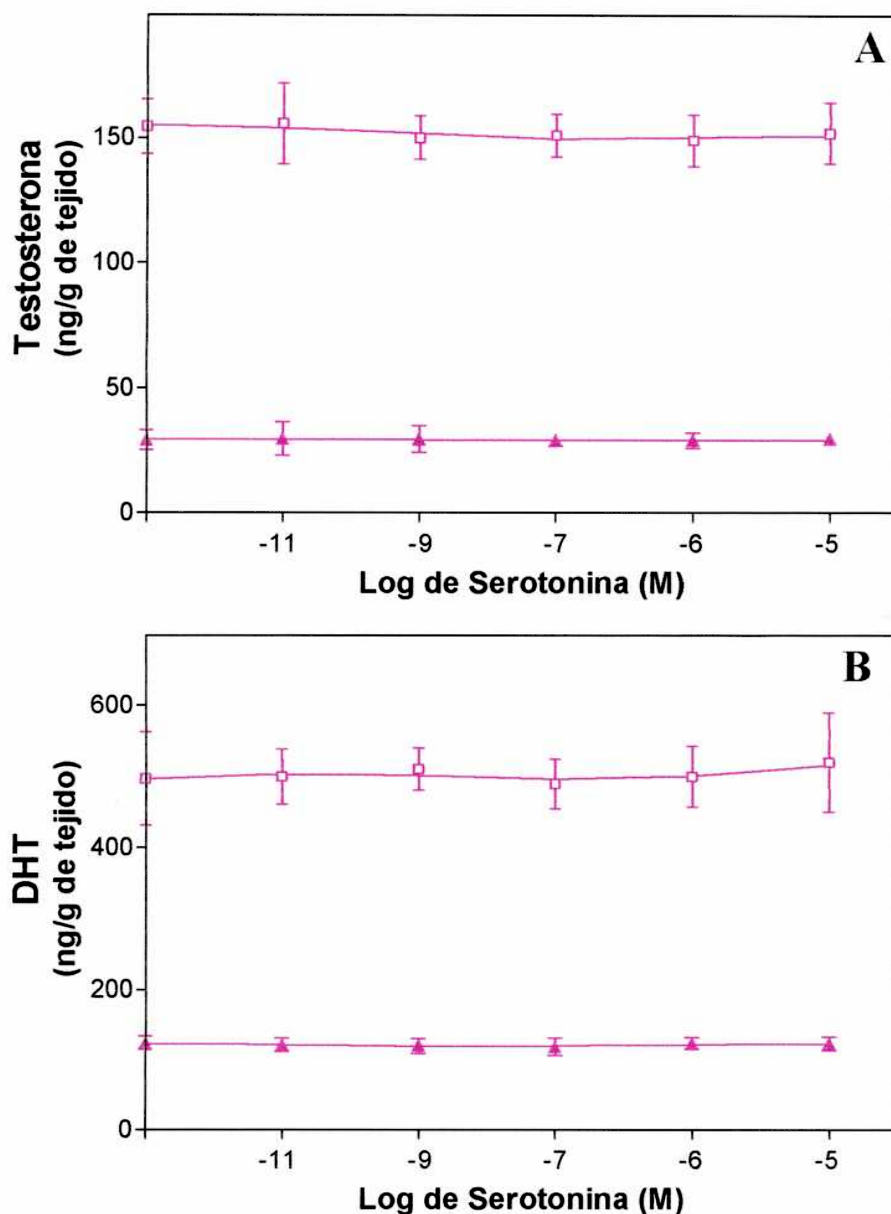


Figura 70. EFECTO DE SEROTONINA (5-HT) SOBRE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA Y DHT A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES PROVENIENTES DE HAMSTERES DORADOS PREPUBERES.

Fragmentos testiculares de tamaños semejantes provenientes de hámsteres Dorados prepúberes mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), y con o sin el agregado de concentraciones crecientes de 5-HT en el medio.

▲ : Condiciones basales.

□ : Estimulación máxima con hCG (100mUI/ml).

Panel A: Producción "in vitro" de Testosterona.

Panel B: Producción "in vitro" de DHT.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n=5-6). No se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

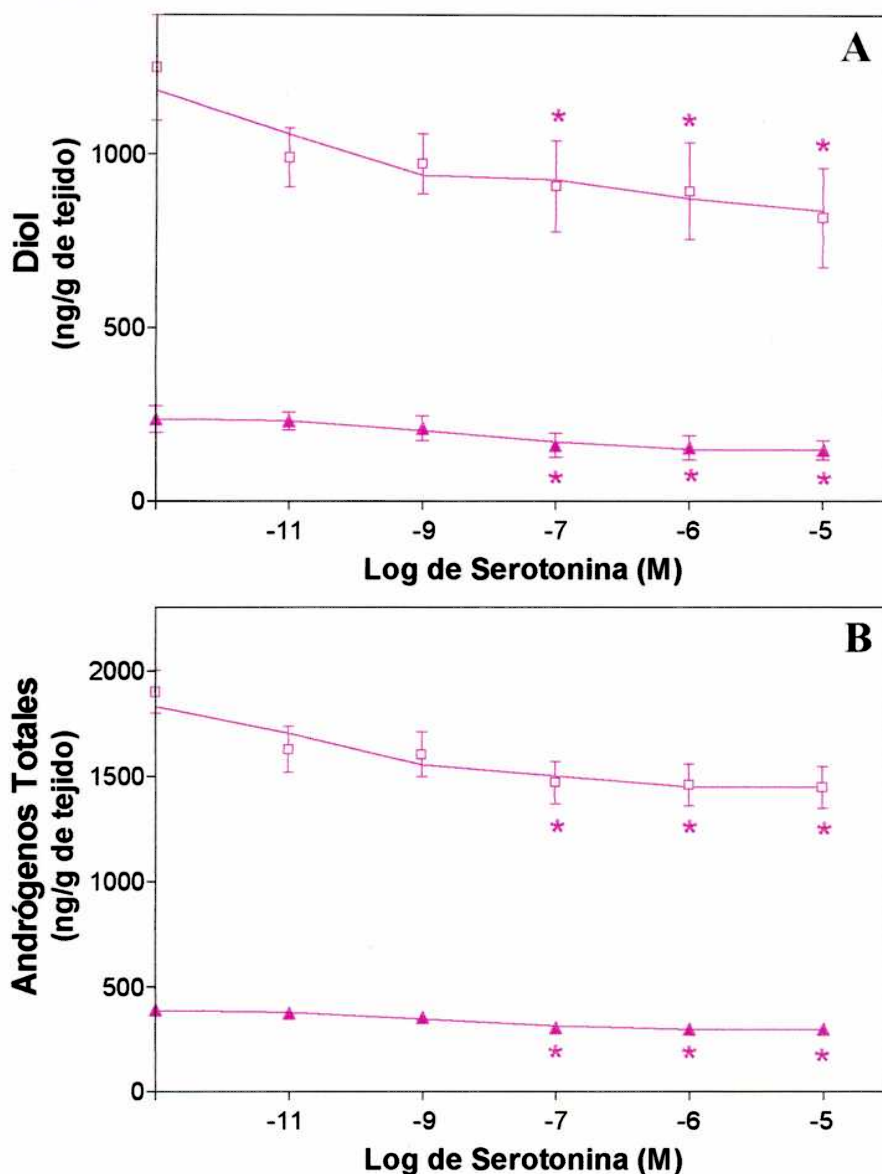


Figura 71. EFECTO DE SEROTONINA (5-HT) SOBRE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE DIOL Y ANDROGENOS TOTALES A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES PROVENIENTES DE HAMSTERES DORADOS PREPUBERES.

Fragmentos testiculares de tamaños semejantes provenientes de hámsteres Dorados prepúberes mantenidos en fotoperíodo normal, fueron incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), y con o sin el agregado de concentraciones crecientes de 5-HT en el medio. Se ha considerado a la producción "in vitro" de andrógenos totales como la sumatoria de los niveles de Testosterona, DHT y Diol secretados al medio.

▲: Condiciones basales.

□: Estimulación máxima con hCG (100mUI/ml).

Panel A: Producción "in vitro" de Diol.

Panel B: Producción "in vitro" de andrógenos totales.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n=5-6). Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; *: $p < 0.05$).

4.5.3. Hámsteres adultos expuestos a fotoperíodo corto durante 14 semanas

4.5.3.1. Influencia de serotonina sobre la producción de andrógenos por fragmentos testiculares

Testículos regresionados provenientes de hámsteres adultos expuestos a FC durante 14 semanas, fueron incubados en presencia o ausencia de 100 mUI/ml de hCG, con y sin el agregado al Medio de incubación de concentraciones de 5-HT 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M (Fig. 72, paneles A y B; Fig. 73, paneles A y B).

Concentraciones de 5-HT entre 10^{-7} M y 10^{-5} M, produjeron una caída significativa en la producción gonadal de T (Fig. 72, panel A), DHT (Fig. 72, panel B) y Diol (Fig. 73, panel A) en condiciones basales y en presencia de hCG.

En consecuencia, los niveles de andrógenos totales producidos por testículos regresionados, fueron significativamente afectados por el agregado de concentraciones de 5-HT entre 10^{-7} M y 10^{-5} M (Fig. 73, panel B).

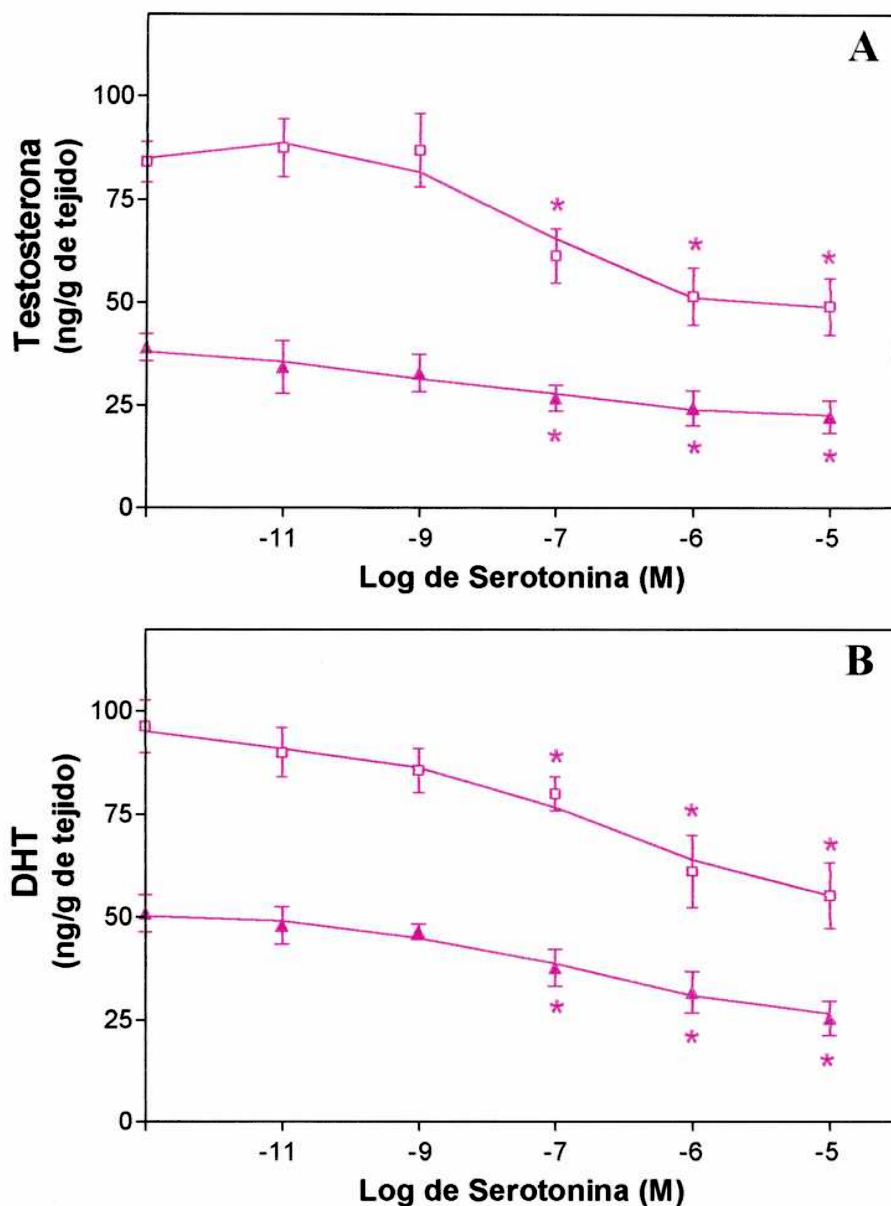


Figura 70. EFECTO DE SEROTONINA (5-HT) SOBRE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE TESTOSTERONA Y DHT A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES PROVENIENTES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS REGRESIONADOS.

Fragmentos testiculares de tamaños semejantes provenientes de hámsteres Dorados adultos expuestos durante 14 semanas a fotoperíodo corto, fueron incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), y con o sin el agregado de concentraciones crecientes de 5-HT en el medio.

▲ : Condiciones basales.

□ : Estimulación máxima con hCG (100mUI/ml).

Panel A: Producción "in vitro" de Testosterona.

Panel B: Producción "in vitro" de DHT.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n=5-6). Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; *: $p < 0.05$).

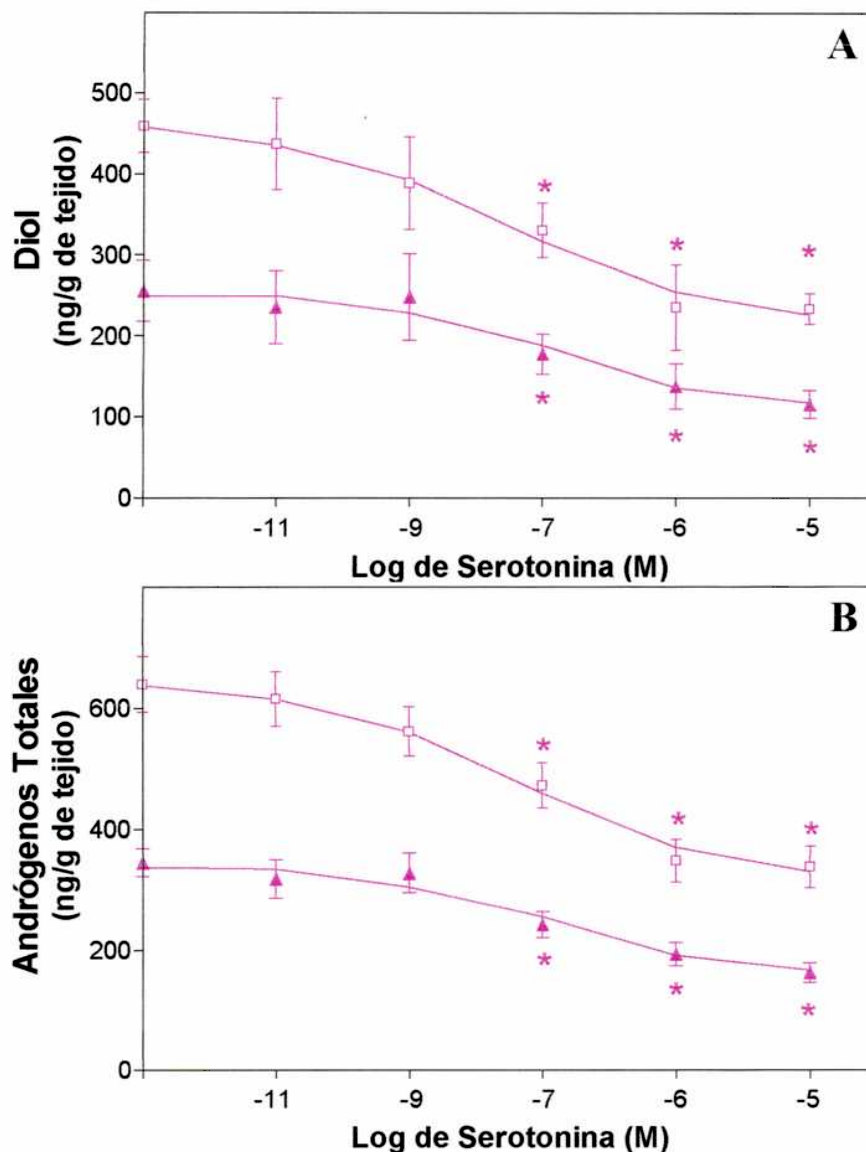


Figura 73. EFECTO DE SEROTONINA (5-HT) SOBRE LA PRODUCCION "IN VITRO" DE DIOL Y ANDROGENOS TOTALES A PARTIR DE FRAGMENTOS TESTICULARES PROVENIENTES DE HAMSTERES DORADOS ADULTOS REGRESIONADOS.

Fragmentos testiculares de tamaños semejantes provenientes de hámsteres Dorados adultos expuestos durante 14 semanas a fotoperíodo corto, fueron incubados durante 6 hs en medio Krebs-Ringer bicarbonato, en presencia o ausencia de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), y con o sin el agregado de concentraciones crecientes de 5-HT en el medio. Se ha considerado a la producción "in vitro" de andrógenos totales como la sumatoria de los niveles de Testosterona, DHT y Diol secretados al medio.

▲ : Condiciones basales.

□ : Estimulación máxima con hCG (100mUI/ml).

Panel A: Producción "in vitro" de Diol.

Panel B: Producción "in vitro" de andrógenos totales.

Los valores representan la media $\pm$ ES (n=5-6). Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo control (Test de Student-Newman-Keuls; *: $p < 0.05$).

DISCUSSION

En el reino animal, existe una sorprendente variedad de estrategias reproductivas representativas de las diferentes familias, taxones y especies. Dichas estrategias tienen una obvia significancia adaptativa puesto que tienden, por un lado, a optimizar las condiciones reproductivas de la especie garantizando así su perpetuidad, y por el otro, la aislan reproductivamente de otras especies evolutivamente emparentadas que comparten el mismo nicho ecológico. Un ejemplo de esta vasta divergencia de estrategias es la *reproducción estacional*. Este mecanismo reproductivo temporal, es característico de especies que habitan regiones templadas y circumpolares, y consiste en acotar la actividad sexual a una determinada época del año, de modo tal que el nacimiento de las crías se produzca cuando las condiciones ambientales son óptimas para la supervivencia de las mismas. Así, en especies como el caballo, en las cuales la gestación es de aproximadamente un año, la estación reproductiva coincide con la primavera, de manera que los potrillos nazcan en la próxima primavera. En cambio, en especies como la oveja doméstica, el ciervo, otros rumiantes y algunos carnívoros, cuyo período de gestación es de 4 a 7 meses, la actividad reproductiva ocurre en otoño; mientras que, en aquellas que presentan tiempos cortos de gestación, la función endócrina y gametogénica queda restringida a principios de la primavera. Ésto último ocurre en la mayoría de los roedores, incluyendo ratones y hámsteres en los cuales el tiempo de gestación oscila entre 16 días y 4 semanas.

Las fluctuaciones anuales en la longitud de los días permiten a los animales percibir información sobre los cambios de estación, y predecir indirectamente una variedad de condiciones ambientales tales como temperatura, humedad y disponibilidad de alimento. Así, el fotoperíodo actúa como una señal primaria externa que interactúa con relojes biológicos internos sincronizando el ciclo reproductivo anual durante la vida adulta, e influenciando también el desarrollo fetal y puberal. En el caso particular del hámster (Siberian) Djungarian (*Phodopus sungorus*), fotoperíodos inhibitorios retardan drásticamente el inicio de la pubertad (Hoffmann, 1978a). Contrariamente, el hámster macho (Syrian) Dorado (*Mesocricetus auratus*) alcanza la madurez sexual hacia la sexta semana de vida, independientemente de

las condiciones lumínicas ambientales (Darrow y col., 1980). Sin embargo, en ambas especies, el sistema reproductivo del hámster adulto es notoriamente sensible al fotoperíodo (Gaston y Menaker, 1967; Berndston y Desjardins, 1974; Elliot, 1976). La exposición de hámsteres sexualmente activos a fotoperíodos con menos de 12.5 hs. diarias de luz, conduce a una severa "regresión" reproductiva, que involucra la pérdida de la actividad testicular en el caso de machos, y una marcada caída del peso uterino y cesación de los ciclos vaginales en la hembra. Estos cambios serían análogos a los experimentados, durante el otoño-invierno, por los hámsteres salvajes Dorado y Djungarian en sus hábitats naturales: Siria y Norte de Siberia. La permanencia de animales adultos en cautiverio sometidos a fotoperíodo restrictivo por tiempo prolongado, desencadena la recuperación de la función gonadal. Este evento es conocido como "*recrudescencia espontánea*" puesto que la reactivación reproductiva se realiza en ausencia de fotoestimulación (Turek y col., 1975a).

Ciertos cambios funcionales y morfológicos ocurridos en el sistema reproductivo del hámster en desarrollo, han sido comparados con las modificaciones descritas durante la exposición de animales adultos a un proceso de regresión-recrudescencia inducido fotoperiódicamente. Al respecto, Reiter (1980) ha señalado que, la pérdida de los tipos celulares más avanzados en el ciclo espermatogénico, y la ausencia de lumen tubular durante la fase de máxima regresión gonadal, mimetizan las condiciones gonadales prepuberales. Asimismo, se ha descrito que, la producción de AMPc en respuesta a FSH, en cultivos de células de Sertoli de hámsteres adultos fotoinvolucionados, es similar a la observada en poblaciones celulares de animales en desarrollo. En cambio, en la fase de reactivación espontánea, la producción de AMPc estimulada por FSH, es comparable a la detectada en la adultez (Heindel, 1988). A pesar de las similitudes observadas entre la transición regresión-reactivación y el proceso de desarrollo sexual, se han descrito también ciertas diferencias entre ambos modelos. Entre dichas discrepancias podemos citar la presencia en testículos regresionados, de la barrera hemato-testicular ausente en las gónadas de animales inmaduros (Sinha Hikim y col., 1988a); y la visualización, en hámsteres expuestos a fotoperíodos breves, de un pericario considerablemente

mayor en las neuronas productoras de GnRH, en comparación con neuronas de hámsteres prepúberes y animales adultos mantenidos en FN. Esto indicaría que, durante el desarrollo puberal, aumenta la capacidad de síntesis y secreción de GnRH; mientras que, los bajos niveles de gonadotrofinas circulantes observados en animales en regresión, resultan de una inhibición en la secreción, pero no en la síntesis de esta hormona hipotalámica (Urbanski y col., 1992).

Teniendo en cuenta estos antecedentes de la literatura, nos resultó de interés realizar, en la presente Tesis, un estudio comparativo entre los mecanismos que controlan el desarrollo sexual, y aquellos que regulan los ciclos reproductivos anuales, a fin de establecer homologías y diferencias entre ambos procesos.

El tamaño corporal de un animal no sólo es representativo de su complejidad y especialización tisular, sino que suele brindar también ventajas o desventajas adaptativas (Hickman y col., 1986a). En el presente trabajo se ha observado que, los machos de las especies de hámsteres Dorado y Djungarian presentan, al momento del destete, un peso corporal equiparable. Sin embargo al alcanzar la adultez, el hámster Dorado macho posee una masa corporal cinco veces mayor que el hámster Djungarian macho. La etapa de mas rápido crecimiento coincide, en las dos especies, con el período prepuberal, y acompaña así a los importantes cambios fisiológicos que se manifiestan durante este momento del desarrollo. Comparativamente, la velocidad de crecimiento prepuberal en hámsteres Dorados machos es significativamente superior que la detectada en hámsteres de la especie Djungarian. Mientras que el hámster Dorado prosigue su crecimiento durante la etapa puberal, aunque a una menor velocidad; el hámster Djungarian alcanza su máximo tamaño corporal a los 46 días de edad. Los cambios ontogénicos en el peso corporal de ambas especies de hámsteres detectados en este trabajo, concuerdan con informes previos de la bibliografía (Darrow y col., 1980; Yellon y Goldman, 1984).

El hámster Djungarian adulto presenta un marcado ritmo anual, controlado fotoperiódicamente, en su peso corporal y color de pelaje. La exposición a FC disminuye en un 30% su masa corporal e induce la muda hacia el pelaje blanco característico del invierno; mientras que, fotoperíodos estimulatorios inducen una

ganancia en el peso y la recuperación de la tonalidad del pelo (Figala y col., 1973; Hoffmann, 1978b; Hoffmann, 1979). En esta especie, la pinealectomía evita la pérdida de masa corporal inducida por la exposición a fotoperíodo inhibitorio (Hoffmann, 1981). Se ha señalado que la pineal a través de la secreción de melatonina, induciría la reducción del peso corporal durante la permanencia en FC (Niklowitz y Hoffmann, 1988). Esta pérdida de peso ocasionada por fotoperíodos restrictivos ha sido correlacionada con una disminución en el contenido lipídico, particularmente a nivel de la grasa abdominal (Wade y Bartness, 1984), la cual es previa a la detección de cambios cuantitativos en la ingesta diaria de comida (Wade y Bartness, 1984). Asimismo, la inyección diaria de melatonina en hámsteres Djungarian mantenidos en FN, conduce a una caída significativa del peso corporal asociada con cambios en la carcasa lipídica (Wade y Bartness, 1984). De este modo, los cambios anuales en la masa corporal del hámster Djungarian serían debidas a alteraciones en la liberación de melatonina por la glándula pineal que modificarían procesos metabólicos claves del tejido adiposo (Niklowitz y Hoffmann, 1988). En este trabajo, no se han observado cambios apreciables en el peso corporal, color del pelaje y niveles lipídicos séricos del hámster Dorado durante la transición fotoperiódica regresión-recrudescencia. Datos previos de la literatura señalan que, aunque tanto en hámsteres Dorados como en animales de la especie Djungarian, la glándula pineal presenta su mayor actividad en condiciones restrictivas de luminosidad; ambas especies difieren en el patrón de secreción nocturna de melatonina. Mientras que el hámster Djungarian presenta un perfil *tipo C* (con un prolongado pico secretorio que involucra la mayor parte de la fase oscura), el hámster Dorado describe un patrón *tipo A* (con un pico hacia el final de la etapa de oscuridad) (Lerchl y Nieschlag, 1992; Niklowitz y col., 1992). Así, estos patrones distintivos en la secreción de melatonina pineal serían responsables de la respuesta diferencial de la masa corporal observable durante la etapa de regresión reproductiva en ambas especies.

El peso testicular ha sido ampliamente utilizado como índice de maduración sexual (Hoffmann, 1978c). Los resultados presentados en esta Tesis demuestran

que, las variaciones en el peso gonadal ocurridas durante el desarrollo sexual, son significativamente diferentes en las dos especies de hámsteres examinadas. Entre los 23 y 36 días de edad, se detectó la mayor velocidad de crecimiento gonadal tanto en hámsteres Dorados como en animales de la especie Djungarian, coincidiendo con un importante aumento en la concentración plasmática de las gonadotrofinas hipofisarias responsables de la proliferación y diferenciación celular en este órgano. Posteriormente, en hámsteres Dorados, se observó un aumento en el peso testicular paralelo a la edad; mientras que, las gónadas de hámsteres de la especie Djungarian, permanecieron prácticamente sin modificaciones hasta la adultez. Durante la ontogenia del hámster Dorado, el volúmen gonadal aumentó proporcionalmente con la edad del animal. En cambio, el peso testicular específico (g de peso testicular/cm³) permaneció sin modificaciones apreciables, y en valores cercanos a la unidad. En consecuencia, es razonable asumir que, el peso y el volúmen testicular incrementan a una velocidad equiparable durante el proceso de desarrollo sexual en el hámster Dorado.

Hámsteres de las especies Dorado y Djungarian presentan, al momento del destete y durante la vida adulta, un peso testicular relativo semejante; mientras que, en el resto de las edades analizadas (entre los 30 y 60 días), las gónadas de hámsteres de la especie Djungarian poseen un mayor peso en relación al tamaño corporal que los testículos del hámster Dorado.

Tanto en hámsteres Dorados como en animales de la especie Djungarian, los niveles proteicos gonadales aumentan significativamente a partir de los 30 días de edad, coincidiendo con el marcado incremento en la concentración plasmática de FSH y LH. Datos de la literatura indican que, en esta etapa del desarrollo, las células de Sertoli adquieren la capacidad de síntesis y secreción hacia el lumen tubular de proteínas tales como el activador del plasminógeno, transferrina, inhibina, glicoproteínas sulfatadas, ABP, mitógenos y factores de crecimiento (Sanborn y col., 1986; Griswold, 1988). Asimismo, durante la etapa prepuberal, las células de Leydig presentan una mayor velocidad de proliferación y diferenciación, procesos metabólicos asociados a una activa síntesis proteica (Ge y col., 1996).

Los resultados presentados en esta Tesis demuestran que, la exposición de hámsteres Dorados adultos a FC durante 14-16 semanas, produce una caída del 80-85% en el volúmen y el peso testicular, sin modificaciones apreciables en el peso específico gonadal. Estos resultados concuerdan con informes previos de la literatura (Gaston y Menaker, 1967; Turek y col., 1975a; Ghosh y col., 1992), y mimetizan las variaciones sufridas en los niveles séricos de LH, FSH, PRL y andrógenos.

Asimismo, en el presente trabajo se observó que, durante la etapa de máxima regresión reproductiva, ocurre una disminución significativa en el contenido gonadal de ADN y proteínas, que coincide con una drástica reducción en el número de células germinales testiculares, y con la cesación de la actividad secretoria de las células de Sertoli (Sinha Hikim y col., 1988a; Sinha Hikim y col., 1988b). En cambio, la concentración testicular de ADN aumentó marcadamente durante este período. En condiciones estándares de luminosidad, el testículo presenta una mezcla de células haploides y diploides. Datos de la literatura señalan que, la exposición a FC ocasiona una significativa caída en el número de células gametogénicas, mientras que, el contenido de células de Sertoli y Leydig permanece constante (Sinha Hikim y col., 1988a; Sinha Hikim y col., 1988b). Así, en la fase de involución, el testículo contiene una población celular netamente diploide, que explica el incremento observado en la cantidad de ADN presente por g de tejido.

Aunque la actividad secretoria de las células de Sertoli se encuentra notoriamente disminuía durante la fase de fotoinhibición, Desjardins y col. (1971), sugirieron que, las células de Leydig, espermatogonias y espermatoцитos primarios remanentes no presentarían modificaciones significativas en su capacidad de sintetizar proteínas. En consecuencia, sería de esperar que, la concentración proteica gonadal no fuera afectada o disminuyera parcialmente durante la exposición a FC. Sin embargo, en el presente trabajo, se observó un leve aumento en la concentración de proteínas testiculares en condiciones restrictivas de luminosidad. Estos resultados podrían explicarse tomando en consideración las marcadas alteraciones morfológicas observadas por Ghosh y col. (1992) en células de Sertoli y Leydig provenientes de hámsteres regresionados. Dichas modificaciones incluyen

una reducción del volúmen celular, y el subsiguiente aumento en el número de células por g de tejido, a pesar de la falta de variación en el cantidad total de células de Sertoli y Leydig presentes en el testículo.

Los cambios observados en el peso testicular durante el desarrollo sexual y la exposición de hámsteres adultos a fotoperíodos restrictivos, fueron acompañados por alteraciones similares ocurridas en las glándulas reproductivas accesorias. En hámsteres Dorados, el epidídimo, próstata y vesículas seminales presentaron un patrón de crecimiento concomitante con la edad del animal. En cambio, en hámsteres de la especie Djungarian, dichos órganos sexuales mostraron la mayor velocidad de crecimiento entre los 23 y 36 días de edad, disminuyendo luego en la etapa puberal, para permanecer prácticamente sin cambios en las edades correspondientes a adultos jóvenes. En todo momento del proceso de desarrollo sexual, la contribución de la masa vesicular y prostática al peso corporal fue levemente mayor en hámsteres de la especie Djungarian. En cambio, el peso epididimario relativo no mostró cambios especie específicos al momento del destete y en animales adultos; aunque fue significativamente superior en el hámster Djungarian entre los 30 y 60 días de edad.

En epidídimos y vesículas seminales de hámsteres Dorados, se detectó un marcado aumento en los niveles proteicos durante las etapas prepuberal y puberal, que se asocia con un incremento en el número celular y grado de especialización de estos órganos descrito en la literatura (Robaire y Hermon, 1988; Luke y Coffey, 1994; Setchell y col., 1994).

En hámsteres Dorados se observó, un significativo descenso en el peso de las glándulas sexuales accesorias durante el período de máxima regresión reproductiva fotoinducida, que se correlaciona con una marcada caída en los niveles circulantes de andrógenos gonadales. Puesto que, estos órganos reproductivos son hormono-dependientes, es esperable que su masa y funcionalidad sufran variaciones paralelas a las detectadas en la concentración sérica de andrógenos. Los niveles epididimarios de proteínas y ADN disminuyeron notoriamente durante la exposición a FC, en concordancia con la interrupción del aporte gonadal de fluidos y espermatozoides al epidídimo descrita por Johnson y Bartke (1991). En vesículas seminales

provenientes de hámsteres adultos mantenidos en FC, se detectó una significativa disminución en el contenido de proteínas y ADN, y un importante aumento en la concentración vesicular de estos parámetros. Se ha descrito que, a diferencia de los profundos cambios observados en las glándulas de otros roedores durante la reducción de los niveles androgénicos, las vesículas seminales del hámster, sufren alteraciones menos pronunciadas en el tamaño y número de sus células epiteliales, y en la cantidad y calidad de proteínas secretadas durante la deprivación hormonal (Pinho y Mata, 1992). Estos datos bibliográficos podrían explicar en parte, las variaciones observadas, en el presente trabajo, en los niveles vesiculares de proteínas y ADN durante la etapa de máxima involución reproductiva.

Los resultados de esta Tesis, describen un aumento significativo en el peso de los testículos y las glándulas sexuales accesorias; así como también en el contenido tisular de proteínas y ADN durante la fase de recrudescencia. Estos resultados concuerdan con los conceptos citados previamente por Turek y Van Cauter (1994), sobre una activación, en el período de reactivación espontánea, de mecanismos refractarios que toman a los animales insensibles a la longitud de los días.

La función reproductiva masculina se encuentra principalmente regulada por hormonas sintetizadas y secretadas desde la glándula pituitaria y el testículo. La hipófisis anterior controla el crecimiento y la actividad testicular a través de la producción de dos hormonas glicoproteicas: LH y FSH. LH se une a receptores específicos en las células de Leydig del intersticio testicular, y estimula diferentes procesos relacionados con la síntesis de esteroides andrógenicos. Las células de Sertoli localizadas en los túbulos seminíferos poseen receptores para FSH. La unión de FSH a sus receptores de membrana estimula la actividad secretoria de las células de Sertoli, y es requisito esencial para la multiplicación y diferenciación de las células germinales (Clermont, 1993). El control de la función testicular involucra también a la PRL, otra hormona proteica originada en la hipófisis. Esta hormona que posee sitios de unión específicos en las células de Leydig, regula el número de receptores gonadales de LH y estimula, en el hámster, la secreción de FSH, controlando de este modo la funcionalidad del sector tubular (Bartke, 1985). El principal andrógeno

producido por los testículos de mamíferos es la T, hormona fundamental en la regulación de la fisiología reproductiva del macho. Al respecto, la T controla funciones primordiales tales como la espermatogénesis, maduración de los espermatozoides en el epidídimo, el crecimiento y la actividad secretoria de las glándulas sexuales accesorias, la conducta copulatoria y territorialidad (Bartke, 1985).

Los resultados presentados en este trabajo muestran que, en hámsteres Dorados, los niveles séricos de LH y FSH sufren fluctuaciones similares durante el proceso de desarrollo sexual, alcanzando sus máximos niveles circulantes en las etapas de prepubertad y pubertad temprana. Estos cambios en las concentraciones circulantes de gonadotrofinas están de acuerdo con hallazgos de otros autores (Vomachka y Greenwald, 1979; Urbanski y col., 1992), coinciden con el importante aumento detectado, en este trabajo, en los niveles periféricos de Diol, y preceden al significativo incremento en la concentración circulante de T y DHT ocurrido entre los 46 y 60 días de edad. Variaciones similares en los niveles plasmáticos de T y DHT durante la ontogenia del hámster Dorado, fueron descritas por Vomachka y Greenwald (1979). No existen datos bibliográficos previos relacionados con los niveles séricos de Diol en diferentes etapas del desarrollo reproductivo del hámster Dorado. Sin embargo, el claro incremento observado en la concentración de esta hormona durante el período prepuberal, concuerda con estudios metabólicos realizados por otros autores (Terada y col., 1980). Al respecto, Yabumoto y col. (1985) describieron que, los testículos de animales inmaduros, presentan actividades 5α - y 5β -reductasas significativamente superiores a las detectadas en gónadas de hámsteres adultos. En hámsteres prepúberes, la actividad 5β -reductasa parece confinada a las células de Sertoli, mientras que la 5α -reducción tendría lugar en las células intersticiales.

Hámsteres de la especie Djungarian, presentaron variaciones en sus niveles séricos de LH, T y DHT similares a las descritas en hámsteres Dorados, y coincidentes a las publicadas precedentemente en la literatura (Yellon y Goldman, 1984; Lerchl y Nieschlag, 1995). En cambio, a diferencia de lo ocurrido en la rata y en

el hámster Dorado, especies en las cuales el principal andrógeno testicular durante la etapa prepuberal es el Diol; en hámsteres Djungarian inmaduros, los niveles séricos de este andrógeno 5α -reducido fueron equiparables a la concentración circulante de T.

La exposición de hámsteres Dorados adultos a FC causó una significativa caída en los niveles circulantes de LH, FSH y PRL; y la posterior restauración de los mismos durante la fase de recrudescencia reproductiva espontánea. Este marcado descenso en la concentración sérica de hormonas hipofisarias detectado en la fase de regresión, concuerda con datos de otros autores (Berndtson y Desjardins, 1974; Turek y col., 1975b; Tamarkin y col., 1976a; Bex y col., 1978). A las 9 semanas de permanencia en fotoinhibición, los niveles periféricos de PRL mostraron una notoria disminución en comparación con el grupo control. Esta hormona que presenta receptores en el intersticio testicular (Charreau y col., 1977), regula la secreción hipofisaria de FSH en el hámster (Bartke y col., 1981a). En consecuencia, la hipoprolactinemia detectada en esta fase temprana de la regresión reproductiva, sería responsable, en parte, del concomitante descenso en los niveles de FSH. Durante la transición involución-reactivación, FSH resultó ser la primer hormona hipofisaria en recuperar sus niveles circulantes normales. Ha sido descripto que fotoperíodos breves, desencadenan una marcada involución testicular, con una disminución en el volúmen de los túbulos seminíferos y en el tamaño de las células de Sertoli, fenómeno que revierte el ciclo espermatogénico a sus primeros estadios (Sinha Hikim y col., 1989a). En cambio, durante la fase de recrudescencia se ha observado la recuperación de dichos parámetros morfométricos (Sinha Hikim y col., 1988a). Así, la temprana caída y restauración en los niveles séricos de FSH actuaría, durante la regresión-recrudescencia resultante de la exposición a FC, y en cada ciclo reproductivo anual del hámster, como una señal primaria induciendo las alteraciones morfológicas y funcionales observadas en los túbulos seminíferos y en el proceso espermatogénico.

La inhibina B es un heterodímero $\alpha\beta_B$ secretado por las células de Sertoli en respuesta a la estimulación con FSH (Bicsak y col., 1987), capaz de retroregular

negativamente la secreción de esta hormona hipofisaria (Tilbrook y col., 1991; Clarke y col., 1993). Contrariamente, la producción de inhibina A ($\alpha\beta_A$), sería independiente de FSH y estaría modulada por otros factores paracrinós aportados por el epitelio (Parvinen y col., 1986). En el presente trabajo se evaluaron los niveles circulantes de inhibina B, a través de la utilización de un método altamente específico que cuantifica los dímeros $\alpha\beta_B$, sin presentar reacciones cruzadas con inhibina A, activinas y sub-unidades β libres existentes en la circulación general. Mientras que, la exposición de hámsteres Dorados a FC durante 9 semanas, produjo una marcada caída en los niveles séricos de FSH; la concentración periférica de inhibina B disminuyó significativamente recién a las 12 semanas de permanencia en fotorestricción. El mantenimiento de niveles circulantes de inhibina B relativamente elevados durante la fase de descenso de FSH, permite especular que, en los primeros estadios de la regresión gonadal fotoinducida, la liberación de inhibina B desde las células de Sertoli, no sería estrictamente dependiente de esta gonadotrofina. Así, factores paracrinós originados en otras poblaciones celulares del testículo sensibles a los importantes niveles de LH que aún permanecen en circulación, podrían modular también la secreción de inhibina B en esta fase. Por otra parte no puede descartarse que, las células de Leydig que persisten funcionalmente activas en este estadio temprano de la regresión gonadal, participen en la producción de inhibina B (Maddocks y Sharpe, 1989; Risbridger y col., 1989; de Winter y col., 1992b). Hacia las 12-14 semanas de exposición a fotoperíodo inhibitorio, los mínimos niveles periféricos de FSH, correlacionaron con una caída del 75% en la concentración sérica de inhibina B. Previamente, Kirby y col. (1993), empleando un ensayo incapaz de discriminar las inhibinas tipo A, B y sub-unidades α libres, describieron también una caída significativa en la reactividad α durante la fase de máxima regresión gonadal. En este trabajo hemos podido observar que, la restauración de los niveles periféricos de FSH durante la fase de recrudescencia espontánea, no es acompañada por modificaciones en la concentración de inhibina B. Es posible que, a tiempos mayores de permanencia en FC, en los cuales otros autores han señalado una completa recuperación morfológica y funcional de la célula de Sertoli (Sinha

Hikim y col., 1989a), los niveles circulantes de inhibina B también sean restablecidos. Así, las discrepancias observadas en el presente trabajo entre las concentraciones séricas de FSH e inhibina B durante la reactivación reproductiva temprana, podrían resultar del requerimiento de un período de latencia para la restauración de la funcionalidad de las células de Sertoli, que involucre el restablecimiento de la barrera hemato-testicular (Kliesch y col., 1991), la producción de los principales componentes biosintéticos intracelulares (aparato de Golgi, retículo endoplasmático, ribosomas) (Sinha-Hikim y col., 1989a), y la reactivación total de la síntesis de T, hormona que juega un papel fundamental en la regulación de la función gonadal (Mooradian y col., 1987). Alternativamente, isoformas de FSH biológicamente inactivas, podrían ser secretadas en estadios tempranos de la recrudescencia (Rulli y col., 1996). De modo similar, Kirby y col. (1993) demostraron que, cuando hámsteres Dorados regresionados son transferidos a FN, la concentración sérica de FSH aumenta rápidamente, mientras que, la reactividad α no incrementa hasta tres semanas después del restablecimiento de la concentración de esta hormona hipofisaria. Es interesante señalar que, la relación observada, entre los niveles de inhibina y FSH durante la regresión-recrudescencia del hámster Dorado, fue previamente descrita en la oveja; a pesar de las diferencias existentes entre estas especies reproductivamente fotodependientes (Lincoln y Mc Neilly, 1989).

El descenso detectado en la concentración sérica de LH durante la permanencia en condiciones restrictivas de luz, sería responsable de las modificaciones morfométricas descritas por Sinha Hikim y col. (1989b) en las células de Leydig regresionadas. Dichos cambios involucran una disminución en el volumen del retículo endoplasmático liso de las células de Leydig, organela considerada como el sitio de mayor concentración de las enzimas involucradas en la biosíntesis de hormonas esteroideas. Así, estas alteraciones en el compartimiento intersticial, podrían explicar en parte, el descenso significativo en los niveles séricos y testiculares de T, DHT y Diol observado, en el presente trabajo, en hámsteres foto-involucionados. Los niveles de andrógenos detectados en la fase de involución, coinciden con resultados previamente presentados por otros autores (Bex y col.,

1978; Berndston y Desjardins, 1974; Turek y col., 1975a; Chandrashekar y Bartke, 1989). Hámsteres Dorados inmaduros y animales adultos sometidos a regresión fotoinducida, presentaron concentraciones séricas de T equiparables, y significativamente menores a las detectadas en animales adultos normales. Estos resultados concuerdan con las semejanzas morfológicas a nivel gonadal descritas por Reiter (1980) en estos períodos. Sin embargo, los animales prepuberales describieron un aumento significativo en los niveles séricos de Diol; mientras que, una marcada caída en la concentración periférica de esta hormona fue detectada hacia las 14-16 semanas de exposición a FC. Así, en gónadas regresionadas, T sigue siendo el andrógeno producido en mayor proporción, aunque sus niveles circulantes representan solamente el 14% de la concentración sérica detectable en animales adultos activos. El descenso observado en la concentración de Diol durante la permanencia en fotoinhibición, podría resultar a partir de una reducción en los niveles gonadales de su precursor, y del menor estímulo del proceso esteroidogénico como consecuencia de la disminución en la secreción hipofisaria de gonadotrofinas. Por otro lado, no pueden excluirse cambios en la actividad específica de las enzimas metabolizantes de T.

Paralelamente al descenso en los andrógenos gonadales, durante la permanencia en fotoperíodo inhibitorio, se observó una caída significativa en los niveles epididimarios de estas hormonas. La T y DHT (principal metabolito activo de T), en combinación con una amplia variedad de factores, regulan la actividad del epidídimo (Brooks, 1981). En varias especies, los andrógenos son esenciales para el normal crecimiento y desarrollo de este órgano, y el mantenimiento de sus funciones diferenciadas tales como la adquisición de la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Orgebin-Crist y col., 1981). Así, la disminución en los niveles tisulares de hormonas sexuales, podría ser una de las señales que conducen a la involución morfológica y funcional ocurrida en el epidídimo durante el mantenimiento de los animales en condiciones inhibitorias de luminosidad; mientras que, la restauración espontánea de los niveles séricos de LH y FSH observada después de 16-18 semanas en FC, desencadenaría la recuperación del peso y la actividad

esteroidogénica gonadal, y consecuentemente, la restauración en la concentración intratistular de andrógenos y funcionalidad epididimaria.

El crecimiento de cualquier órgano involucra un incremento concomitante en la actividad biosintética de ADN (Coffey, 1974), ARN y proteínas (Morris y col., 1987). La actividad ODC, enzima limitante en el camino biosintético de las PA, constituye un parámetro de alta sensibilidad en la determinación de eventos tróficos (Tabor y Tabor, 1984). Mientras que un aumento en la producción de estos policationes está asociado con el crecimiento y la especialización celular; la reducción de sus niveles trae como consecuencia una disminución en la proliferación y diferenciación de las células (Russell y Durie, 1978; Russell, 1985). Las PA al estar cargadas positivamente a pH fisiológico, interactúan con constituyentes celulares de carga negativa tales como ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos (Marton y Morris, 1987; Schuber, 1989), controlando de este modo procesos metabólicos claves. Además, estos policationes actuarían como mediadores en el mecanismo de acción de diversas hormonas, y a modo de señales paracrinas entre distintas poblaciones celulares (Scalabrino y col., 1991). La actividad ODC incrementa rápidamente en respuesta a una gran variedad de estímulos tróficos como por ejemplo hormonas, factores de crecimiento, agentes regenerativos, promotores tumorales y factores ambientales (Pegg, 1986).

Los resultados presentados en este trabajo muestran que, el pasaje de hámsteres adultos machos desde condiciones estándares de luminosidad a fotoperíodo inhibitorio ocasiona, a tiempos cortos, una caída significativa en el contenido gonadal de Put, Esd y Esp, y en la actividad ODC expresada por testículo. Durante la permanencia en FC por tiempo prolongado (18-22 semanas), estos parámetros son restaurados. Dichas modificaciones en el contenido total de PA y en la actividad ODC, se correlacionan con las variaciones ocurridas a nivel del peso testicular. Contrariamente, cuando se analizó la concentración testicular de PA (expresadas por g de tejido y mg de proteínas), se observó un marcado aumento de la misma en los testículos regresionados. El grado de ploidía diferencial existente entre los testículos activos e involucionados, toma a la concentración de ADN

gonadal, un parámetro inadecuado para la expresión de los niveles de PA y de la actividad ODC presentes por célula; impidiendo consecuentemente, la comparación de datos entre el grupo control y el grupo de máxima regresión tisular.

Existen dos explicaciones alternativas para el incremento en la concentración de PA detectado en los testículos involucionados. En primer lugar, podemos suponer que el aumento en los niveles gonadales de estos polipéptidos durante la fase de regresión, resulta de una mayor actividad ODC, interconversión vía acetil-derivados y/o incorporación desde la circulación general. Cuando se analizó la actividad específica ODC testicular se observó que la misma incrementa como consecuencia de la exposición a FC, alcanzando sus mayores niveles a las 12 semanas, y precediendo en 2 a 4 semanas a la máxima concentración de PA gonadales detectada. Así, en el tejido testicular, el aumento en la actividad enzimática conduciría a la posterior elevación en los niveles de PA vía síntesis *de novo*. Por otra parte, el contenido total de A-PA en el testículo varió paralelamente con el peso del órgano; mientras que, la permanencia en condiciones de fotoinhibición no modificó la concentración gonadal de A-PA. El presente estudio reveló una marcada correlación entre el contenido testicular de PA y sus acetil derivados durante la transición fotoperiódica regresión-recrudescencia. La acetilación juega un importante papel en el mantenimiento de los niveles celulares normales de PA, y de sus funciones asociadas (Casero y Pegg, 1993). Además, existen claras evidencias indicando que ciertos efectos de las PA son expresados a través de sus formas acetiladas (Canellakis y col., 1989). En consecuencia, los resultados obtenidos en este estudio, y datos previos de otros autores en otras especies (Seiler y Dezeure, 1990; Casero y Pegg, 1993; Shapell y col., 1993) sugieren que, estos componentes acetilados podrían actuar como reguladores homeostáticos del "pool" intracelular de PA adaptándolo a las necesidades fisiológicas. Así, el aumento en la concentración gonadal de Put, Esd y Esp, cuando la atrofia testicular es máxima, resultaría conjuntamente en una mayor síntesis *de novo* de estos polipéptidos como consecuencia del incremento en la actividad ODC, y en un balance en la interconversión con sus acetil derivados. Dicha elevación en los niveles de PA

gonadales cuando la atrofia del tejido es máxima, y la concentración circulante de LH y FSH (mensajeros primarios en la estimulación de la esteroidogénesis y espermatogénesis testicular) permanece disminuída, nos permite especular que las PA actuarían a modo de factores tróficos induciendo la recuperación del peso, morfología y funcionalidad testicular en el período de recrudescencia espontánea. Al respecto, datos previos de la literatura señalan que las PA mediarían los efectos de hormonas y factores de crecimiento en células testiculares de rata, y modularían las divisiones mitóticas y meióticas ocurridas durante la espermatogénesis (Shubhada y col., 1989b; Hakovirta y col., 1993).

Sin embargo, no podemos excluir una segunda explicación para el incremento detectado en la concentración de PA durante la fase de regresión. Este aumento podría resultar también de una producción diferencial de PA por los distintos tipos celulares presentes en el testículo, y a partir de los cambios morfológicos ocurridos durante la involución gonadal. Si la regresión involucra una pérdida selectiva de aquellos tipos celulares que producen bajos niveles de PA, y en consecuencia, un enriquecimiento del testículo en aquellas células que contienen importantes niveles de estos policationes, estos cambios en la composición celular gonadal podrían conducir a un aparente aumento en la concentración de PA en el órgano regresionado. Para clarificar este controvertido punto, deberían emplearse modelos experimentales capaces de determinar los niveles de PA presentes en células de Sertoli, Leydig y germinales durante la exposición a FN y FC.

Con el propósito de estudiar el rol ejercido por las PA en los órganos sexuales accesorios durante la involución-reactivación reproductiva, se utilizó como tejido comparativo a las vesículas seminales. Estas glándulas contienen significativos niveles de PA, y en contraste con la próstata, no realizan una activa secreción de estos componentes (Piik y col., 1977). El patrón de PA detectado en las vesículas seminales fue similar al descrito en el testículo. El contenido de estos policationes y la actividad ODC (expresada por glándula) variaron paralelamente con el peso de las vesículas. En cambio, la concentración de PA mostró un significativo aumento durante el período de involución. De los tres policationes, Esd presentó cambios

menos pronunciados durante la transición regresión-recrudescencia. Cabe recordar que la Esd juega un rol clave en la regulación de la vía metabólica de interconversión de las PA, actuando como sustrato de la Esp sintetasa y como precursor en la formación de Put vía AT y oxidasas (Bolkenius y Seiler, 1987). La actividad específica ODC, disminuyó significativamente en respuesta a la fotoinhibición. En consecuencia, el aumento observado en la concentración vesicular de PA durante el período de regresión, no resultaría de una síntesis *de novo* de estos policationes. Estos resultados concuerdan con datos previos de nuestro Laboratorio los cuales señalan que, en vesículas seminales de ratón, existe una marcada dependencia de la actividad ODC en relación a PRL (Gonzalez y col., 1991). Así, la caída en la actividad ODC y en los niveles de PRL circulantes en animales regresionados, indicaría que, también en el hámster, esta hormona hipofisaria juega un papel fundamental en la regulación de esta actividad enzimática. La concentración intracelular de PA es modulada por un balance entre incorporación y biosíntesis por un lado, y retroconversión y eflujo por otro (Shappell y col., 1993). Cuando la biosíntesis es inhibida o inactivada, el crecimiento puede ser sustentado con PA exógenas (Kramer y col., 1989; Pilz y col., 1990; Nicoll y col., 1994). Entonces, el transporte de PA dentro y fuera de la célula se torna crítico para el mantenimiento del "pool" intracelular de estos policationes (Seiler y Dezeure, 1990). Así podemos especular que, en lugar de la síntesis *de novo*, otras fuentes se mobilizan para restablecer los niveles de PA glandulares, y consecuentemente, la actividad ODC no sería un pre-requisito para la restitución de la integridad de las vesículas seminales durante la etapa de recrudescencia reproductiva. La incorporación de PA desde la circulación general con un probable origen testicular, brinda una explicación alternativa para el aumento en la concentración de estos policationes en vesículas seminales durante el período de involución reproductiva. Pero también, cambios en la composición celular de esta glándula durante la fase de regresión, podrían conducir a un aparente incremento de la concentración de PA. Así, la pérdida preferencial de aquellos tipos celulares que contienen bajos niveles de PA es una hipótesis que no puede ser excluída.

El contenido de acetil derivados varió concomitantemente con el peso de la glándula, y se correlacionó con el contenido de PA presente en las vesículas seminales durante la transición regresión-recrudescencia inducida por la exposición a FC. Un aumento significativo de la concentración vesicular de A-put, N¹A-esd y N¹A-esp fue detectado durante el período de máxima involución reproductiva. Aunque el mecanismo por el cual las PA y sus formas acetiladas afectan la función celular no ha sido bien establecido, es sabido que, si las PA no están presentes, las células no crecen o sobreviven (Kramer y col., 1989). Entonces, cambios foto-relacionados en los niveles de Put, Esd y Esp, tanto en testículos como en vesículas seminales, podrían desencadenar el crecimiento y regeneración de estos órganos reproductivos durante la fase de recrudescencia espontánea ocurrida a tiempos prolongados de permanencia en fotorestricción, o bien actuar como señales secundarias mediando la acción de hormonas y factores tróficos en esta etapa.

Las alteraciones endócrinas asociadas con la regresión-recrudescencia del aparato reproductivo en el hámster adulto, así como también, los cambios hormonales que desencadenan el proceso de maduración sexual, estarían bajo el control de diversos neurotransmisores hipotalámicos, entre ellos, catecolaminas, 5-HT, dopamina, opioides, y aminoácidos excitatorios (Brown, 1971; Müller y col., 1972; Ondo y col., 1976; Price y col., 1978; Price y col., 1979; Blank y col., 1979; Sarkar y col., 1981; Steger y col., 1982; Moguilevsky y col., 1985; Colwell y col., 1991; Urbanski y col., 1992). Sin embargo, la influencia de estos compuestos no se limita al sistema nervioso central, sino que se ha descrito también la presencia de ciertos neurotransmisores en órganos periféricos no neuronales en donde podrían ejercer localmente un rol fisiológico. Trabajos previos de nuestro Laboratorio han permitido detectar importantes concentraciones de norepinefrina, epinefrina, dopamina (Campos y col., 1990a), 5-HT (Campos y col., 1990b) y GABA (Ritta y col., 1987) en el testículo de la rata prepuberal y adulta; neurotransmisores que modularían la capacidad esteroideogénica gonadal afectando la funcionalidad de las células de Leydig. Basados en estos antecedentes, y teniendo en cuenta las significativas variaciones ocurridas en la concentración androgénica testicular durante el proceso

de maduración sexual y en la transición fotoperiódica regresión-recrudescencia en el hámster macho, nos resultó de interés evaluar la presencia de GABA y 5-HT en diferentes estadios funcionales de la gónada y glándulas sexuales accesorias (prepubertad, pubertad, adultez, regresión, reactivación); y su posible impacto sobre el proceso esteroidogénico.

El presente estudio nos permitió detectar la presencia de GABA en gónadas de las dos especies de hámsteres estudiadas, en diferentes etapas del desarrollo ontogénico. Un claro incremento en la concentración gonadal de GABA durante el período prepuberal pudo observarse tanto en hámsteres Dorados como en hámsteres de la especie *Djungarian*. Un perfil similar en la concentración gabaérgica en testículos de rata, ha sido previamente descrito por Ritta y Calandra (1986). Cuando el contenido testicular de GABA fue evaluado, se observó un perfil especie dependiente. Así, en hámsteres Dorados, el contenido gabaérgico gonadal aumentó paulatinamente a lo largo del proceso de desarrollo sexual, mientras que, en hámsteres de la especie *Djungarian*, se detectó un significativo incremento en la fase prepuberal. Al correlacionar los niveles testiculares de GABA con la concentración plasmática de gonadotrofinas y andrógenos se puede observar que, el aumento ocurrido en los niveles del neurotransmisor durante la etapa prepuberal del hámster Dorado coincide con los máximos niveles circulantes de LH y Diol detectados; mientras que, el importante incremento en el contenido gabaérgico gonadal en el período puberal-adulto, se asocia con significativos niveles séricos de LH, T y DHT. Sin embargo, estas conclusiones no pueden ser extendidas al hámster *Djungarian*. Por esta razón, podríamos suponer que, a pesar de las similitudes existentes entre estas dos especies de hámsteres, GABA desempeñaría un rol especie específico durante la maduración de la función gonadal.

Paralelamente, hemos analizado la presencia de GABA en testículos de hámsteres Dorados adultos sometidos a diferentes condiciones de luminosidad. Los niveles gonadales de GABA son significativamente alterados durante la transición fotoperiódica regresión-recrudescencia. Durante la fase de involución, se observa un marcado incremento en la concentración gabaérgica testicular, que se correlaciona

con una significativa disminución en los niveles circulantes de gonadotrofinas, y en el contenido intratesticular de T, DHT y Diol. Los importantes niveles de GABA detectados en testículos regresionados, podrían ser el resultado de un genuino aumento en la capacidad biosintética gonadal de este neurotransmisor, una mayor incorporación de GABA desde la circulación general o inervación periférica, o bien de alteraciones en el catabolismo gabaérgico. Alternativamente, el incremento testicular de GABA en la fase de regresión, podría derivar de una producción diferencial del neurotransmisor en las distintas poblaciones celulares presentes en el testículo, y de un selectivo enriquecimiento, en aquellos tipos celulares que contienen altos niveles gabaérgicos. La permanencia prolongada en condiciones de fotoinhibición, que conduce al restablecimiento de la capacidad biosintética y secretoria hipofisaria y gonadal en esta especie, permitió observar un retorno de los niveles testiculares de GABA a sus niveles controles.

En el presente estudio se detectó también, la presencia de 5-HT y de su principal catabolito el 5-HIAA en testículos del hámster Dorado. La concentración serotoninérgica en el parénquima gonadal, aumenta marcadamente durante la etapa prepuberal del desarrollo sexual, en la cual se detectan los máximos niveles séricos de LH y Diol; y en el período puberal-adulto, caracterizado por significativos niveles circulantes de gonadotrofinas y T. De manera similar, en la cápsula testicular aislada, los máximos niveles de 5-HT y 5-HIAA fueron detectados en animales inmaduros y adultos jóvenes. Por otra parte, en el período de máxima regresión reproductiva resultante de la exposición a FC durante 14 semanas, el contenido testicular de 5-HT y 5-HIAA disminuyó significativamente, coincidiendo con los mínimos niveles séricos de LH y la menor concentración gonadal de andrógenos detectada. La permanencia durante tiempo prolongado (22 semanas) en condiciones restrictivas de luminosidad, no provocó cambios significativos en los niveles serotoninérgicos gonadales, señalando que, este neurotransmisor no ejercería un rol relevante durante el restablecimiento de la funcionalidad testicular. Cabe recordar que, en la etapa de recrudescencia espontánea, los niveles séricos de LH han sido restaurados; mientras que, la concentración testicular de T si bien se encuentra

elevada en relación con el período de máxima involución gonadal, permanece aún notoriamente disminuída en comparación con el grupo control.

Los resultados presentados sugieren que, GABA y 5-HT podrían actuar a modo de factores regulatorios locales autocrinos y/o paracrinos de la función gonadal en el hámster. Así, los niveles significativos de estos neurotransmisores encontrados en etapas del desarrollo sexual y condiciones fotoperiódicas caracterizadas por elevadas concentraciones circulantes de LH y FSH, nos permitirían inferir un rol modulador estimulador o inhibitorio de 5-HT y GABA en la acción de las gonadotrofinas sobre la esteroidogénesis testicular. Alternativamente, no puede descartarse, una participación gabaérgica y/o serotoninérgica en la funcionalidad del sector tubular y en la producción testicular de espermatozoides.

La presencia de 5-HT y GABA en la gónada del hámster puede derivar de diferentes orígenes.

La circulación general y la irrigación arterial, podría aportar al testículo neurotransmisores sintetizados en sistema nervioso central y/u otros tejidos periféricos neuronales. Las gónadas están irrigadas por la arteria espermática que recorre el margen epididimario del testículo, rodea el polo caudal, describe ondulaciones alrededor de la superficie libre, penetra en el parénquima testicular en la vecindad de la rete testis y a partir de allí se ramifica (Setchell y col., 1994). La 5-HT presente en sangre está principalmente contenida en gránulos secretorios dentro de las plaquetas quedando solamente un 10% libre (Chik y col., 1986; Gonzales y col., 1992). Shafer y col. (1981), determinaron que la concentración sérica de GABA en ratas macho es de aproximadamente $0.63 \pm 0.21 \mu\text{M}$. Minuk y Maccannell (1988), y más recientemente Leader y col. (1992), establecieron que la concentración plasmática media de GABA en humanos es $0.3 \pm 0.03 \mu\text{M}$. La maduración testicular ocurrida durante el desarrollo reproductivo, involucra un aumento en la vascularización gonadal (Kormano, 1967). Asimismo, los testículos regresionados del hámster Dorado que se asemejan a las gónadas inmaduras (Lincoln, 1981; Berkowitz y Heindel, 1984), presentan una reducción del 85.5% en el volúmen absoluto de los vasos sanguíneos existentes por órgano, en comparación

con los niveles hallados en animales controles gonadalmente activos (Sinha Hikim y col., 1988a; Sinha Hikim y col., 1988b). Durante la recrudescencia reproductiva fotoinducida, Mayerhofer y col. (1989a) han detectado profundos cambios en la microvascularización testicular que involucran eventos angiogénicos y una regeneración de nuevos vasos a partir del tejido pre-existente. Teniendo en cuenta estos datos de la literatura no es posible descartar que, parte de los significativos niveles testiculares de 5-HT y GABA detectados en las gónadas del hámster en periodos claves del proceso de maduración sexual y la transición fotoperiódica regresión-recrudescencia, procedan de la circulación general.

Por otra parte, el testículo presenta una importante inervación periférica, principalmente desde el nervio espermático superior, el cual podría proveer a la gónada con neurotransmisores producidos en el sistema nervioso central o periférico. En la mayoría de las especies estas fibras inervan la cápsula testicular acompañando a los vasos sanguíneos que la recorren (Risley y Skreptos, 1964; Norberg y col., 1967a). Se han observado numerosas fibras inervando el músculo liso de la túnica albugínea en el mono rhesus y hombre (Yamashita, 1939; Hodson, 1970); la túnica vascular en el toro (Shioda y Nishida, 1966); y también la túnica vaginalis en el perro, gato y hombre (Yamashita, 1939; Corona, 1953). Por otra parte, se detectaron fibras nerviosas que penetran al interior del testículo inervando el tejido intersticial y a las células mioides de los túbulos seminíferos en el gato, mono rhesus y hombre (Norberg, 1967b; Baumgarten y Holstein, 1967; Hodson, 1970; Nistal y col., 1982; Okkels y Sand, 1940; Campenhout, 1949; Mayerhofer, 1996; Setchell y col., 1994). Estudios histoquímicos parecen indicar que la rata es una excepción, puesto que los mismos describen la presencia de fibras nerviosas fluorescentes en la túnica albugínea y la túnica vascular del testículo, así como también en el mediastino y acompañando a las arterias y arteriolas gonadales, pero no han sido capaces de identificar nervios en las cercanías de las células de Leydig o penetrando los túbulos seminíferos (Dayan, 1970; Bell & Mc Lean, 1973; Zhu y col., 1995). No obstante, el parénquima testicular de la rata podría recibir neurotransmisores a través de una inervación indirecta común en el sistema nervioso periférico. La inervación indirecta

involucra la liberación de neurotransmisores desde varicocitos (acumulaciones de vesículas portadoras de neurotransmisores) al fluido intersticial a fin de que los mismos alcancen rápidamente las células blanco portadoras de receptores (Burnstock, 1986; Mayerhofer, 1996). No existen datos en la literatura sobre el patrón de innervación testicular en el hámster, y/o cambios asociados con la edad y el fotoperíodo.

Campos y col. (1990b) observaron que, la excisión del nervio espermático superior proveniente del plexo renal y en íntimo contacto con la arteria espermática, causa una caída del 34% en los niveles serotoninérgicos presentes en el testículo de la rata. La importante concentración de 5-HT detectada en la cápsula testicular del hámster Dorado, y en menor grado en el parénquima gonadal, señalarían un probable origen neural de este neurotransmisor, aunque fuentes alternativas no pueden ser excluidas. Comparativamente, debe evaluarse la posibilidad de que GABA alcance la gónada por innervación extrínseca, tal como fue previamente descrito en las trompas de Falopio (Fernandez y col., 1985; Celotti y col., 1986). La información bibliográfica relacionada con modificaciones en el número y calidad de las fibras nerviosas que innervan el testículo durante el desarrollo sexual es escasa. Nistal y col. (1982) observaron un aparente incremento de varicocitos adyacentes a las células mioideas en el testículo de niños y hombres hipogonadales. Prince (1992) describió un marcado aumento en el número de fibras nerviosas desde el estadio neonatal al prepuberal. Similarmente, en el presente trabajo, hemos detectado un significativo incremento en los niveles gonadales de 5-HT y GABA durante la prepubertad en el proceso de desarrollo sexual del hámster.

Los mastocitos testiculares y las células de Leydig, han sido postulados como fuentes serotoninérgicas gonadales (Kops y col., 1990; Tinajero y col., 1993a). Los mastocitos derivan de células troncales del sistema hematopoyético que migran a tejidos periféricos en los cuales bajo el control de factores locales sufren diferenciación y proliferación (Kitamura y col., 1981; Kitamura, 1989). La presencia de abundantes gránulos secretorios en el citoplasma de los mastocitos, es un excelente marcador de su diferenciación celular (Gaytan y col., 1992). Estas células contienen

importantes concentraciones de histamina (Mayerhofer y col., 1989b) y 5-HT en sus gránulos (Enerback, 1986; Gaytan y col., 1990), y serían la principal fuente secretoria de 5-HT en el testículo de la rata (Aguilar y col., 1995). En el hámster, los mastocitos gonadales se encuentran ubicados en la periferia del testículo bajo la cápsula testicular cercanos a los nervios y vasos sanguíneos sub-capsulares; mientras que, en los espacios intersticiales, no han sido detectados (Mayerhofer y col., 1989b). Contrariamente, en el testículo humano normal, se ha descrito la presencia de mastocitos en tejido intersticial (Nistal y col., 1984; de Kretser y Kerr, 1994). Durante el procesamiento del material realizado en el presente trabajo a fin de separar la cápsula del parénquima testicular, los mastocitos podrían quedar adheridos a la misma y contribuir, en parte, a la importante concentración de 5-HT detectada en la cápsula testicular del hámster a todas las edades del proceso de maduración sexual, y en los diferentes estadios de la transición regresión-recrudescencia analizados. Aún no se conoce cual sería la importancia funcional de estas células en el testículo. Sin embargo, se ha observado la aparición de abundantes mastocitos durante la etapa de recuperación que sigue a la destrucción selectiva de las células de Leydig con etileno dimetano sulfonato (EDS), conjuntamente con un incremento en la concentración de 5-HT en el fluido intersticial y la cápsula testicular de la rata (Gaytan y col., 1992; Aguilar y col., 1995). Estos resultados sugieren que los compuestos producidos en los mastocitos gonadales, tendrían un rol clave en la restauración de la actividad normal del testículo (Sharpe y col., 1988; Aguilar y col., 1995). Sin embargo, en el presente estudio, los niveles de 5-HT permanecieron significativamente bajos en la etapa de recrudescencia gonadal espontánea resultante de la exposición de hámsteres machos a FC durante tiempo prolongado. Esto señalaría que, la 5-HT no ejercería un rol relevante durante el restablecimiento de la funcionalidad testicular en condiciones fisiológicas normales.

En 1990b, Campos y col., detectaron la presencia de 5-HT en células intersticiales aisladas de rata. Posteriormente, Tinajero y col., (1993a) demostraron que las células de Leydig de rata liberan importantes concentraciones de esta amina al Medio de cultivo en respuesta a un estímulo agudo con hCG mediante un

mecanismo dependiente de AMPc. Sin embargo, en 1995, Aguilar y col., no hallaron cambios significativos en los niveles testiculares de 5-HT luego del tratamiento de las ratas con EDS, sugiriendo que, en la rata, las células de Leydig no serían una fuente importante de 5-HT gonadal.

En el presente trabajo se ha detectado una significativa correlación entre las variaciones ocurridas en el contenido testicular de GABA y Glut, tanto en el proceso de maduración reproductiva de las dos especies de hámsteres analizadas, como en la transición fotoperiódica regresión-recrudescencia en hámsteres Dorados. La exposición a FC durante 14 semanas, produjo un aumento del 100% en la actividad específica GAD en el testículo, coincidente con una marcada disminución en los niveles gonadales de Glut, y un importante incremento en la concentración tisular de GABA. En sistema nervioso central, la síntesis de GABA emplea como sustrato fisiológico al Glut y depende de la actividad enzimática GAD. Tillakaratne y Tobin (1986), Tobin (1989), y Tilakaratne y col. (1992), demostraron la presencia en el testículo de la rata de ARNms correspondientes a la forma de la enzima GAD de peso molecular 67.000. Mediante el empleo de la técnica de hibridización *in situ* se detectaron ARNms codificantes para GAD de diferentes tamaños en espermatoцитos y espermátidas localizados en los túbulos seminíferos de rata (Persson y col., 1990; Tillakaratne y col., 1992). Asimismo, Persson y col. (1990) identificaron inmunoreactividad GAD en espermatozoides de eyaculados humanos. Los niveles de ARNms fueron bajos durante el período prepuberal, y aumentaron gradualmente a lo largo del proceso de maduración sexual de la rata (Persson y col., 1990). Estos antecedentes de la literatura concuerdan con el marcado incremento en el contenido gabaérgico gonadal detectado durante el desarrollo puberal del hámster. En consecuencia, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que, el Glut sería una importante fuente endógena de GABA a nivel testicular. Sin embargo, caminos metabólicos alternativos que conducen también a la síntesis gonadal de este neurotransmisor no pueden ser descartados. En diferentes tejidos periféricos GABA es sintetizado también a partir de Put mediante la actividad de MAOs o DAOs (Seiler, 1980; Andersson y Henningsson, 1980; Andersson y col., 1980). El análisis de

regresión lineal entre el contenido gonadal de Put y GABA, detectó una estrecha correlación entre ambas variables. Así, paralelamente a los niveles glutamatérgicos testiculares y la actividad GAD, las PA podrían actuar como una fuente adicional en la síntesis de GABA en las gónadas del hámster.

Alternativamente, los significativos niveles de 5-HT y GABA detectados durante la ontogenia y la transición fotoperiódica regresión-recrudescencia en el hámster, podrían resultar de modificaciones en su catabolismo. La presencia de 5-HT y de su principal metabolito el 5-HIAA en la gónada del hámster, evidencia la existencia de una degradación enzimática de la 5-HT por actividad de una MAO testicular. El cálculo de la relación 5-HIAA/5-HT realizado en el presente trabajo, permite describir variaciones en el catabolismo de este neurotransmisor. En parénquima testicular del hámster Dorado, dicha relación aumenta levemente durante el período prepuberal-puberal. Sin embargo, en la adultez esta relación es tres veces mayor que la detectada a los 23 días de edad. Comparativamente, en la cápsula testicular, la relación 5-HIAA/5-HT se duplica a los 90 días de edad. Estos resultados señalan que, durante la fase adulta, además del significativo aumento en los niveles serotoninérgicos, existe un marcado incremento en el catabolismo de la 5-HT tanto en el parénquima como en la cápsula testicular. Estos resultados coinciden con un estudio previo realizado por Ellis y col. (1972), en el que demuestran que, la actividad MAO en el testículo de la rata, se localiza en el sector intersticial y en las paredes de los túbulos seminíferos. Estos autores señalan además, que la actividad MAO, se encuentra directamente relacionada con el grado de desarrollo testicular y la capacidad biosintética de andrógenos de la gónada. La exposición de hámsteres Dorados adultos a FC, no produjo cambios significativos en la relación 5-HIAA/5-HT capsular, mientras que, en parénquima testicular, dicha relación fue notoriamente disminuída durante la permanencia en fotoperíodo inhibitorio. En consecuencia es razonable especular que, en condiciones restrictivas de luminosidad, en las cuales los niveles serotoninérgicos gonadales descienden significativamente, el catabolismo de este neurotransmisor es bloqueado a fin de preservar sus niveles basales que serían de relevancia fisiológica.

La metabolización de GABA, es dependiente de la actividad de la enzima GABA-T. En cerebro, la administración del ácido amino-oxiacético, un inhibidor de la actividad GABA-T, aumenta marcadamente los niveles tisulares del neurotransmisor (Perry y Hansen, 1973; Bernasconi y col., 1982). Así, la actividad GABA-T ejercería un rol fundamental en el mantenimiento del equilibrio homeostático en la concentración gabaérgica cerebral. Contrariamente, el empleo de este inhibidor, no produce cambios en la concentración de GABA presente en la glándula adrenal, ovario y oviducto de la rata (Erdö y col., 1982; Caron y col., 1988). Nuestros resultados demuestran que, en hámsteres Dorados adultos, la inyección intra-peritoneal de ácido amino-oxiacético a la dosis fisiológica de 35 mg/kg de peso corporal, no modifica significativamente la concentración gabaérgica testicular. Sin embargo, debe evaluarse también la posibilidad de que este inhibidor de la actividad GABA-T no alcance el tejido testicular como consecuencia de la presencia de la barrera hematotesticular, y/o se requieran concentraciones superiores del mismo para detectar alteraciones en el catabolismo gonadal de GABA.

En el aparato genital femenino, además de los niveles significativos de GABA detectados en el ovario (Erdö y col., 1982; Apud y col., 1984; Erdö, 1984; Erdö y col., 1984; Fernandez-Pardal y col., 1984; Erdö y Kiss, 1986; Louzan y col., 1986; Erdö y col., 1989; Erdö y Wolff, 1990), se ha descrito también la presencia de este neurotransmisor en órganos sexuales accesorios tales como el útero (Fernandez-Pardal y col., 1984; Gimeno y col., 1986; Louzan y col., 1986; Erdö y Wolff, 1990) y oviducto (Del Rio, 1981; Erdö y col., 1982; Apud y col., 1984; Erdö, 1984; Erdö y col., 1984; Fernandez-Pardal y col., 1984; Cellotti y col., 1986; Erdö y Amenta, 1986; Erdö y Kiss, 1986; Erdö y col., 1986; Gimeno y col., 1986; Louzan y col., 1986; Murashima y Kato, 1986; Erdö y col., 1989; Erdö y Wolff, 1990). Los resultados presentados en este trabajo, describen la presencia de GABA en epidídimo y vesículas seminales del hámster Dorado, en diferentes estadios del proceso de desarrollo sexual, y durante la transición fotoperiódica regresión-recrudescencia. En dichos órganos reproductivos, la concentración tisular de GABA fue significativamente mayor en la etapa prepuberal. El descenso detectado en la

concentración gabaérgica a lo largo del proceso de maduración sexual podría resultar en una disminución en la biosíntesis tisular de GABA y/o de una menor incorporación del neurotransmisor desde fuentes externas. Alternativamente, la disminución observada en la concentración gabaérgica en epidídimos y vesículas seminales del hámster durante el período puberal-adulto, podría responder a un marcado aumento en los tipos celulares que no contienen GABA como consecuencia de procesos de proliferación y diferenciación. El incremento detectado en el contenido gabaérgico durante la etapa adulta, permite descartar la primera posibilidad, y valida la hipótesis de un aumento en el número de células que no presentan al neurotransmisor; asociado con una mayor actividad biosintética y/o una mayor captación de GABA por los tipos celulares portadores de este neurotransmisor.

La exposición a FC, aumentó significativamente la concentración epididimaria de GABA; mientras que, indujo una marcada caída en el contenido tisular del neurotransmisor. Por otra parte, no se observaron cambios foto-dependientes en la concentración de GABA presente en vesículas seminales, mientras que, el contenido del neurotransmisor descendió significativamente durante el período de máxima involución reproductiva. Estos resultados señalarían que, el epidídimo y las vesículas seminales presentan, durante la fase de regresión, una notoria pérdida en el número de células, preferencialmente en aquellos tipos celulares que no contienen GABA.

Receptores gabaérgicos tipo A (Erdő y Wekerle, 1990; Wistrom y Meizel, 1993; Blackmore y col., 1994) y proteínas transportadoras de GABA (Aanesen y col., 1995; Aanesen y col., 1996) han sido identificados en las membranas de células germinales. En consecuencia, GABA podría ejercer un efecto directo sobre la viabilidad y/o funcionalidad de los espermatozoides.

Por otra parte, Erdő y Amenta (1986) señalaron que, GABA podría regular la actividad secretoria del oviducto. Tillakaratne y col. (1992) describieron la presencia de ARNms correspondientes a las proteínas GAD de pesos moleculares 65000 y 67000 en el oviducto de la rata, que actuarían distintivamente sobre la motilidad ciliar y la función secretoria de este órgano. Comparativamente, las vesículas seminales

presentan células epiteliales, mayoritariamente cilíndricas pseudoestratificadas, que contienen gránulos secretorios (Geneser, 1988b). Las alteraciones detectadas en los niveles vesiculares de GABA a lo largo del proceso de maduración sexual, y durante la exposición de animales adultos a FC, podrían estar asociadas con los cambios morfológicos y funcionales observados en las vesículas seminales del hámster en estos períodos. Así, mientras que la proliferación y diferenciación del epitelio glandular ocurridas durante la adquisición de la función sexual, se correlacionan con un gradual aumento en el contenido vesicular de GABA; la significativa disminución de los niveles gonadales de andrógenos detectada en condiciones lumínicas restrictivas, que disminuye el número y tamaño de las células epiteliales y conduce a la pérdida del material secretorio glandular (Pinho y Mata, 1992), ocurre concomitantemente con el marcado descenso en los niveles vesiculares gabaérgicos detectado durante la exposición a FC. Así, este neurotransmisor podría participar activamente en la modulación de la secreción tisular en los diferentes estadios funcionales de las vesículas seminales del hámster.

Como se ha citado previamente para el testículo, la presencia de GABA en epidídimos y vesículas seminales del hámster, puede derivar a partir de la innervación y/o irrigación local de los mismos, o bien de su síntesis endógena.

La exposición de hámsteres Dorados adultos a FC durante 14 semanas, que condujo a una marcada caída en los niveles epididimarios de Glut, y a un aumento significativo en la concentración gabaérgica; no produjo cambios significativos en la actividad GAD específica de este órgano. En consecuencia, a diferencia de lo ocurrido en testículo, Glut no sería una fuente importante en la biosíntesis epididimaria de GABA, pudiendo desempeñar algún otro rol fisiológico en este órgano. En 1994, Kvidera y Carey señalaron que, la síntesis epididimaria de glutamina a partir de glutamato, amonio y ATP, crearía el ambiente óptimo para la maduración espermática, mantendría el balance ácido-base, removería el amoníaco luminal, y produciría la glutamina necesaria para la biosíntesis de ácidos nucleicos.

El aumento paulatino en el contenido epididimario de GABA observado en este trabajo a lo largo del desarrollo puberal; así como también, la marcada caída en los

niveles gabaérgicos en epidídimos regresionados, se correlaciona con el número de espermatozoides detectado por otros autores en este órgano reproductivo durante dichas etapas (Sinha Hikim y col., 1988a; Van Haaster y de Rooij, 1993). Así, las alteraciones descritas en los niveles epididimarios de GABA, podrían responder a cambios cuantitativos ocurridos en la población de células sexuales GAD-positivas (Persson y col., 1990; Tillakaratne y col., 1992), durante la ontogenia y la transición fotoperiódica regresión-recrudescencia.

Los cambios detectados en el contenido de GABA en las vesículas seminales durante el proceso de maduración sexual y la transición fotoperiódica regresión-recrudescencia del hámster Dorado, presentaron una marcada correlación con las variaciones ocurridas en los niveles de Glut y Put en este órgano sexual. En consecuencia, los niveles gabaérgicos presentes en estas glándulas, podrían resultar de la síntesis endógena del neurotransmisor, aunque fuentes alternativas deben ser también consideradas.

Con el fin de analizar el rol ejercido por GABA y 5-HT en la producción testicular de andrógenos, en forma independiente de las acciones de otros factores y hormonas extragonadales, se diseñaron experimentos *in vitro* en los que se determinó la respuesta esteroidogénica en presencia de los neurotransmisores en el Medio de incubación. Previo al desarrollo de dichos protocolos, se procedió a establecer las condiciones experimentales adecuadas para la evaluación de la producción de T, DHT y Diol a partir de fragmentos testiculares y/o células intesticiales provenientes de hámsteres inmaduros y adultos mantenidos en FN, o de animales fotoregresionados.

Durante el análisis de la producción de andrógenos en presencia de concentraciones crecientes de hCG en el Medio de incubación, pudo observarse que, fragmentos testiculares provenientes de animales adultos mantenidos en FC, requirieron aproximadamente la mitad de hCG que los testículos activos para alcanzar el 50% de la estimulación máxima. Datos previos de la literatura señalan la existencia de un menor número de receptores a hCG/LH en testículos involucionados (Bex y Bartke, 1977; Klemcke y col., 1981). Sinha Hikim y col., (1989c), han

propuesto que, dicha reducción en el número de receptores gonadales a LH resultaría de una disminución en la superficie de las células de Leydig, puesto que, la cantidad de receptores por unidad de área celular no varía durante la fase de regresión. No obstante, es sabido que, la ocupación de una pequeña fracción de los receptores gonadales de LH en la rata, es suficiente para alcanzar la respuesta esteroidogénica máxima (Catt y col., 1980). Por otra parte, no se han detectado cambios de afinidad en los receptores a LH como resultado la exposición a FC (Bex y col., 1978; Klemcke y col., 1984). En consecuencia, los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten suponer que, los receptores a hCG/LH localizados en testículos regresionados, serían más sensibles a la estimulación hormonal que los presentes en gónadas de animales adultos normales. Similarmente, en el ratón de pies blancos, otra especie que sufre alteraciones reproductivas estacionales, Knotts y Glass (1988) detectaron que las células de Leydig inactivas como consecuencia de la exposición a FC, presentan una sensibilidad incrementada a la estimulación con hCG y dbAMPc.

La DE_{50} en respuesta a hCG, calculada en testículos de animales prepuberales, fue similar a la obtenida en gónadas de hámsteres adultos mantenidos en FN. Entre los 14 y 28 días de edad, se ha observado, en el testículo de la rata, células de Leydig precursoras que presentan receptores de LH cortos y no funcionales consistentes solamente en su dominio extracelular. A partir de los 28 días de edad, estas células precursoras se transforman en células de Leydig funcionales caracterizadas por la presencia de un importante número de receptores a hCG/LH en su membrana plasmática (Bortolussi y col., 1990; Zhang y col.; 1994; Ge y col., 1996). A partir de los datos bibliográficos precedentes, y teniendo en cuenta las semejanzas existentes entre el desarrollo sexual de la rata y el hámster Dorado (Bartke, 1985), es posible inferir que, los hámsteres prepúberes de 36 días de edad utilizados en los experimentos *in vitro* en el presente trabajo, poseen células de Leydig morfológica y funcionalmente desarrolladas. Así, la respuesta similar a la estimulación con hCG encontrada entre animales adultos e inmaduros, podría resultar de la existencia de receptores funcionales en ambos estadios, y de la

ausencia de variaciones en la afinidad y/o sensibilidad durante el proceso de maduración reproductiva.

En hámsteres adultos mantenidos en condiciones estándares de luminosidad, el andrógeno producido en mayor proporción es la T, presentando una concentración testicular entre 2 y 3 veces superior a la de DHT, y 7 veces más alta que la hallada para Diol. Comparativamente, en los presentes estudios *in vitro*, la producción basal y post-hCG de T triplicó y duplicó, respectivamente, los niveles de DHT secretados, y superó significativamente los niveles de Diol liberados al Medio.

En hámsteres Dorados, la concentración sérica de Diol a los 30 días de edad, es 5 veces superior que los niveles circulantes de T y DHT. De igual modo, en los experimentos *in vitro*, la producción de Diol basal y estimulada con hCG, fue significativamente superior a los niveles de DHT liberados al Medio, y 8 veces más alta que la producción de T detectada.

En gónadas involucionadas de hámsteres Dorados adultos, la principal hormona sexual es la T, la cual muestra una concentración 5 veces superior a los niveles de DHT y Diol. No obstante, la concentración de T en testículos regresionados representa sólo el 25% de los niveles detectables en las gónadas funcionalmente activas de animales adultos mantenidos en FN. En cambio, los estudios *in vitro* efectuados en el presente trabajo señalan que, la producción basal y post-hCG de Diol en fragmentos testiculares provenientes de hámsteres adultos expuestos a FC, es entre 8 y 10 veces más alta que la observada para T, y quintuplica los niveles de DHT secretados al Medio de incubación. Por otra parte, las concentraciones de DHT y Diol liberadas al Medio a partir de testículos involucionados, son 9 y 45 veces mayores que los niveles gonadales de estas hormonas determinados *in vivo*. Estos resultados demuestran que la significativa caída en el contenido de andrógenos testiculares detectada en los hámsteres mantenidos en fotoinhibición, no puede ser atribuida exclusivamente a la ausencia de factores estimulatorios hipofisarios (LH, FSH y PRL). Así, puede especularse que durante la permanencia en FC, existiría también una regulación negativa de la esteroidogénesis ejercida por algún factor extra-gonadal; no apreciable en los

experimentos *in vitro* realizados con fragmentos testiculares aislados. Al respecto, Barfuss y col. (1969), describieron que la irradiación corporal que altera la síntesis de melatonina en la pineal de la rata, produce también marcados cambios en la síntesis de andrógenos. Este rol inhibitorio ejercido por la melatonina sobre la esteroidogénesis testicular es mediado por la liberación de las gonadotrofinas hipofisarias (Reiter y col., 1976; Tamarkin y col., 1976b; Goldman y col., 1979; Cardinali, 1981). Sin embargo, en 1972, Ellis incubando fragmentos de tejido testicular y microsomas de rata, en presencia de precursores radiactivos, detectó que la melatonina inhibía la actividad de las enzimas 17α -hidroxilasa y 17-20 liasa. Recientemente, Valenti y col. (1995) y Giusti y col. (1997) señalaron que, en experimentos *in vitro* realizados con células de Leydig de rata y humanos, la melatonina inhibe la esteroidogénesis, a través de una reducción en la producción de AMP_c no relacionada con el sistema adenilato ciclasa dependiente de LH. Entonces, además del conocido efecto inhibitorio ejercido por la melatonina sobre la secreción hipofisaria de LH, FSH y PRL, esta hormona pineal, podría actuar directamente sobre el testículo disminuyendo la actividad esteroidogénica del mismo. Comparativamente, Chandrashekar y Bartke (1989), describieron una significativa caída en el contenido testicular de 17α -hidroxiprogesterona, androstenodiona y T durante la exposición de hámsteres Dorados adultos a FC. Este descenso en los niveles gonadales de andrógenos, se asocia con una disminución en la síntesis y/o acción de las enzimas 17α -hidroxilasa, 17-20 liasa y 17β -hydroxiesteroide deshidrogenasa.

En los experimentos realizados con fragmentos testiculares provenientes de hámsteres regresionados, la producción basal de T fue similar a la detectada en animales adultos e inmaduros mantenidos en FN; mientras que, en respuesta a un estímulo máximo con hCG (100mUI/ml), las gónadas fotoinvolucionadas secretaron un 15% y un 50% menos de T que los testículos adultos normales y prepuberales, respectivamente. Estos resultados concuerdan con estudios *in vitro* realizados previamente por Bartke y col. (1985b), y con experimentos *in vivo* en los cuales se detecta una significativa caída en el contenido testicular de los precursores requeridos en la síntesis de T a partir de progesterona durante la permanencia en

fotorrestricción (Chandrashekar y Bartke, 1989). Recientemente Bartke y col. (1996), propusieron que, las gónadas regresionadas tienen reducida su capacidad de sintetizar andrógenos como consecuencia de los cambios morfométricos ocurridos en las células de Leydig durante esta etapa. Sin embargo, en los estudios *in vitro* realizados en este trabajo, ha sido posible observar que, los testículos regresionados sintetizan DHT y Diol en mayor proporción que los animales adultos fotoestimulados; y producen cantidades semejantes de Diol, pero la mitad de DHT que las gónadas inmaduras. Con el agregado al Medio de incubación de un estímulo máximo de hCG (100 mUI/ml), los testículos involucionados liberan concentraciones de DHT y Diol significativamente mayores que las producidas por las gónadas adultas activas, pero menores que las detectables en los experimentos efectuados con testículos inmaduros. Así, las gónadas regresionadas aunque presentan una actividad biosintética de T menor a la observable en testículos adultos normales, no poseen reducida su capacidad esteroidogénica, puesto que, secretan DHT y Diol en niveles significativamente superiores, asemejando la funcionalidad gonadal prepuberal. Reiter, en 1980, basándose en las similitudes morfológicas gonadales existentes entre las etapas de prepubertad y regresión, propuso que la exposición de hámsteres adultos a FC revertiría la funcionalidad testicular a estadios de inmadurez reproductiva. Sin embargo, los presentes resultados indicarían que el testículo involucionado como resultado de la permanencia en fotorrestricción, alcanzaría una condición intermedia entre la etapa inmadura y adulta, que involucraría un aumento en la actividad de las enzimas metabolizantes de T: 5 α -reductasa y 3 α -hidroxiesteroide óxido-reductasa, en comparación con animales adultos gonadalmente activos.

Los experimentos realizados en presencia de GABA y 5-HT, permiten concluir que, la 5-HT ejerce un efecto inhibitorio sobre la producción de andrógenos *in vitro* en las gónadas del hámster. En cambio, el agregado de GABA en el Medio, no generó alteraciones en la producción basal y post-hCG de andrógenos, en testículos y células intersticiales provenientes de hámsteres adultos mantenidos en condiciones normales de luminosidad, como así tampoco en gónadas inmaduras y

fotoregresionadas. En los citados experimentos se descartó un efecto letal tóxico de los neurotransmisores, analizando la viabilidad celular luego de distintos tiempos de incubación.

Nuestro Laboratorio previamente describió una acción regulatoria de GABA sobre la función testicular en la rata. Este neurotransmisor estimularía la producción de andrógenos en testículos enteros (Ritta y col., 1987) y en células intersticiales de rata (Ritta y col., 1991), vía receptores de membrana tipos A y B, los cuales coexisten en las células de Leydig (Ritta y col., 1991). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo, podríamos especular un rol especie-específico de GABA en el testículo. Mientras que en la rata, este neurotransmisor potenciaría la acción estimuladora ejercida por la LH hipofisaria sobre la esteroidogénesis; en el hámster, GABA participaría en la regulación de otro/s procesos metabólicos gonadales que también sufren drásticas alteraciones durante el desarrollo puberal y la transición fotoperiódica involución-reactivación. Al respecto, se han detectado ARNms codificantes para GAD, la principal enzima biosintética de GABA, en espermatoцитos y espermátidas (Persson y col., 1990; Tillakaratne y col., 1992); y se ha establecido la presencia de receptores GABA tipo A (Erdö y Wekerle, 1990; Wistrom y Meizel, 1993; Blackmore y col., 1994) y proteínas transportadoras en membranas de espermatozoides (Aanesen y col., 1995; Aanesen y col., 1996). Además, Cohn y col. (1982) y Persson y col. (1990), señalaron un posible efecto del neurotransmisor sobre la viabilidad y motilidad del espermatozoides.

En concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo señalando una regulación serotoninérgica negativa de la esteroidogénesis gonadal en el hámster, estudios de otros autores indican que, también en la rata, la presencia de 5-HT en cultivos de células de Leydig, disminuye significativamente la producción de T basal y estimulada por hCG (Tinajero y col., 1992).

En gónadas de hámsteres adultos mantenidos en FN, el efecto modulador negativo de la 5-HT sobre la esteroidogénesis, fue visualizable en la producción *in vitro* de T y DHT. En cambio, la liberación de Diol al Medio de incubación no mostró cambios en presencia del neurotransmisor. La producción basal de T y DHT resultó

inhibida en un rango de concentraciones de 5-HT similares. Contrariamente, la producción de T post-hCG, mostró ser más sensible al efecto regulador de la 5-HT que la secreción de DHT. Así, en testículos funcionalmente activos de hámsteres adultos, la 5-HT inhibiría el proceso esteroideogénico, disminuyendo en consecuencia, el contenido de T y DHT, principal metabolito de la T en esta fase del desarrollo.

En los experimentos realizados con células intersticiales aisladas a partir de gónadas adultas activas, se requirieron concentraciones de 5-HT iguales o mayores de 10^{-8} M para inhibir la producción de T estimulada por hCG. En cambio, en fragmentos testiculares, una concentración 10^{-10} M de 5-HT disminuyó significativamente la liberación de T post-hCG. Estos resultados señalarían que, el control serotoninérgico de la esteroideogénesis gonadal, podría ser influenciado por una regulación paracrina entre el compartimiento tubular y el sector intersticial. Al respecto, otros autores han indicado que, las células de Sertoli producen ciertos factores (interleuquina 1, inhibina, β -endorfinas) capaces de modular la actividad de las células de Leydig (Knotts y Glass, 1988; Voglmayr y col., 1990; Sharpe, 1993; Tháká y col., 1993). Por otra parte, en el presente trabajo, no se emplearon células de Leydig puras sino preparaciones crudas las cuales contienen otras poblaciones celulares del intersticio. Sin embargo, la proporción de las mismas es menor en dichas preparaciones de células, que en los experimentos realizados con fragmentos gonadales. Así, la diferencial sensibilidad a la 5-HT en células aisladas y fragmentos testiculares, podría resultar de una regulación de la producción de T por otros tipos celulares presentes en el intersticio, tales como macrófagos, fibroblastos, linfocitos, células plasmáticas y en menor grado mastocitos (de Kretser y Kerr, 1994).

La acción estimuladora de la LH sobre la producción de andrógenos gonadales es ejercida a través de su unión a receptores específicos ubicados en la membrana de las células de Leydig (Loosfelt y col., 1989; McFarland y col., 1989), una proteína Gs que activa a la adenilato ciclasa ocasionando un aumento en la síntesis de AMPc (Duffau y col., 1973), y la fosforilación, mediante una PKA, de proteínas intracelulares que regulan la expresión génica y traducción de enzimas claves en el proceso biosintético de esteroides (Podestá y col., 1976; Hall y col., 1979; Pon y col.,

1986; Rommerts y Cooke, 1988; Epstein y Orme-Johnson, 1991). La modulación negativa de la 5-HT sobre la producción de andrógenos gonadales inducida por hCG/LH, puede ser ejercida en uno o varios niveles diferentes de esta cascada de eventos involucrados en la transducción intracelular de la señal estimuladora resultante de la unión de la hormona a su receptor de membrana. Los resultados obtenidos en el presente trabajo señalan que, el agregado de dbAMPc a incubaciones de células intersticiales en presencia de 5-HT, bloquea significativamente el efecto inhibitorio ejercido por este neurotransmisor sobre la producción de T estimulada por hCG. En consecuencia, 5-HT actuaría modulando negativamente la actividad de la adenilato ciclasa productora de AMPc probablemente a través de una proteína Gi. Alternativamente, 5-HT podría regular algún paso metabólico previo en la transducción de la señal hormonal, tal como la interacción entre LH y su receptor específico, y/o la funcionalidad de la proteína Gs. Por otra parte, aunque el agregado de una concentración 0.5mM de dbAMPc en el Medio de incubación, aumentó significativamente la producción de T post-hCG en presencia de una concentración 10^{-6} M de 5-HT, la misma permaneció disminuída con respecto al grupo control en ausencia del neurotransmisor. Estos resultados señalarían que se requieren concentraciones de dbAMPc superiores a 0.5 mM para revertir en su totalidad el efecto inhibitorio de la 5-HT, o alternativamente, este neurotransmisor regularía también eventos posteriores a la formación de AMPc en la cascada de mensajeros relacionados con la transmisión intracelular del estímulo gonadotrófico. Al respecto, Ellis (1972), incubando precursores radiactivos con preparaciones de microsomas y fragmentos de tejido testicular de rata, estudió el efecto de la 5-HT sobre las distintas etapas enzimáticas de la esteroidogénesis. Dicho trabajo demostró que la 5-HT inhibe en forma no competitiva a las enzimas 17α -hidroxilasa, 17-20 liasa y 17 ceto-reductasa, lo que se traduce en un bloqueo en la conversión de ^{14}C -progesterona en T radiactiva en ambas preparaciones testiculares.

5-HT es el principal neuromodulador en la producción de CRF en el cerebro (Holmes y col., 1982), y estimula la secreción del mismo a partir de fragmentos

hipotalámicos (Calogero y col., 1989). Este péptido se halla ampliamente distribuido en el sistema nervioso central (Petrusz y Merchenthaler, 1992). CRF estimula la secreción de péptidos activos tales como ACTH, β -endorfinas y MSH, a través de receptores específicos localizados en los corticotropos de la glándula pituitaria anterior y el lóbulo intermedio, vía mecanismos dependientes de AMPc (Aguilera y col., 1983; Wynn y col., 1983; Wynn y col., 1984). En lo que respecta a la función reproductiva, CRF actúa a nivel hipotalámico inhibiendo la secreción de GnRH, lo que produce una reducción en la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH (Veldhuis y col., 1986). Sin embargo, se ha detectado también la presencia de CRF en tejidos periféricos entre los cuales se incluyen células endócrinas del páncreas, tracto gastrointestinal, adrenal, pulmón, placenta, ovario y testículo de diferentes especies (Kruseman y col., 1982; Yoon y col., 1983; Suda y col., 1984; Bruhn y col., 1987; Petraglia y col., 1987; Audhya y col., 1989; Fabbri y col., 1990a; Fabbri y col., 1990b; Mastorakos y col., 1992). En el testículo, CRF ha sido localizado en células de Leydig y en células germinales (Yoon y col., 1983), y su ARNm presenta niveles comparables a los detectables en el cerebro medio (Thompson y col., 1987). 5-HT es un potente estimulador de la secreción de CRF en células de Leydig de rata (Tinajero y col., 1992).

En el presente trabajo hemos detectado que, concentraciones 10^{-6} M de CRF disminuyen significativamente la producción de T basal y estimulada por hCG en preparaciones crudas de células intersticiales provenientes de hámsteres adultos normales. Esta regulación negativa ejercida por CRF sobre la producción de andrógenos gonadales, es evitada por la incubación simultánea con un anticuerpo específico contra CRF.

Por otra parte, la acción inhibitoria de 5-HT sobre la producción de T basal y estimulada por hCG, fue bloqueada con diluciones 1/100 del anticuerpo anti-CRF. Estos resultados indican que, el efecto modulador negativo de 5-HT sobre la esteroidogénesis en el hámster, sería ejercido a través de CRF. Coincidentemente, informes previos de Fabbri y col. (1990b) y Tinajero y col. (1992) señalan que, la 5-HT actuando a través de receptores 5-HT_2 presentes en las membranas de las

células de Leydig de rata, estimula la secreción de CRF a través de la activación de una PKC y la hidrólisis de fosfoinosítidos, independientemente de la formación de AMPc y de la estimulación de proteínas Gi. A su vez, el CRF secretado por las células de Leydig, inhibiría la producción de AMPc estimulada por LH, mediante un mecanismo de acción similar al empleado por la 5-HT, dependiente del sistema de fosfoinosítoles y de la activación de PKC (Ulisse y col., 1990).

En testículos prepuberales, concentraciones de 5-HT entre $10^{-7}M$ a $10^{-5}M$ inhibieron exclusivamente la producción de Diol basal y estimulada por hCG; mientras que, los niveles de T y DHT no fueron modificados. Como se ha mencionado anteriormente, Diol es el andrógeno producido en mayor concentración durante esta fase del desarrollo sexual. Datos bibliográficos señalan que, las células de Leydig inmaduras de rata, producen principalmente andrógenos 5α -reducidos (Inano y col., 1967; Cochran y col., 1979; Corpechot y col., 1981; Chubb y Ewing, 1981; Tapanainen y col., 1984), y presentan altos niveles de las enzimas metabolizantes de T: 5α -reductasa y 3α -hidroxiesteroide óxido-reductasa (Podestá y col., 1976; Yoshizaki y col., 1978; Muroño y Washburn, 1989). Estudios metabólicos previos realizados por otros autores en testículos inmaduros del hámster Dorado, describen un aumento significativo en la actividad 5α -reductasa durante el estadio prepuberal (Tsuji y col., 1984). Este incremento en la actividad enzimática disminuye la concentración gonadal de T, y eleva los niveles de sustrato disponibles para la enzima 3α -hidroxiesteroide óxido-reductasa, y en consecuencia, aumenta la concentración gonadal de Diol. La actividad 5α -reductasa es detectable principalmente en las células intersticiales ante la influencia de LH y FSH (Yabumoto y col., 1985). Así, el efecto inhibitorio ejercido por la 5-HT en la síntesis gonadal de andrógenos a partir de progesterona, disminuiría significativamente la producción *in vitro* de Diol, principal hormona sexual masculina en esta etapa del desarrollo. Alternativamente, no puede ser descartarse, una regulación directa de la 5-HT sobre la actividad 5α -reductasa y/o 3α -hidroxiesteroide óxido-reductasa en las gónadas inmaduras del hámster.

En testículos regresionados, concentraciones de 5-HT mayores o iguales a $10^{-7}M$, disminuyeron significativamente la producción basal y estimulada por hCG en los tres andrógenos analizados: T, DHT y Diol. En cambio, como se describiera anteriormente, en testículos inmaduros solamente la liberación Diol es afectada por este neurotransmisor, y en animales adultos gonadalmente activos, sólo la producción de T y DHT es influenciable por 5-HT.

Este efecto distintivo de la 5-HT sobre la esteroidogénesis según el estadio funcional testicular, avala la hipótesis sobre la existencia, en gónadas regresionadas, de una situación fisiológica intermedia entre la actividad metabólica característica de testículos prepuberales y adultos.

En resumen, la actividad esteroidogénica testicular presenta profundos cambios durante la maduración sexual y la transición fotoperiódica regresión-recrudescencia. La capacidad biosintética de andrógenos detectable en cada una de estas fases resultaría de un balance entre los niveles de melatonina y hormonas hipofisarias circulantes (LH, FSH, PRL), y la presencia de factores moduladores locales. En particular, los altos niveles de 5-HT detectados en períodos en los que la concentración sérica de LH es elevada, y los estudios de producción de andrógenos *in vitro* realizados en presencia del neurotransmisor, nos sugieren que 5-HT regularía la esteroidogénesis gonadal, amortiguando el efecto estimulador ejercido por la LH sobre este proceso. La actividad serotoninérgica actuaría, por lo menos, sobre la producción celular de AMPc o en eventos previos en la transducción de la señal estimuladora gonadotrófica, y sería mediada por la acción de CRF sobre la esteroidogénesis testicular. Contrariamente, la presencia de GABA en el testículo del hámster no influenciaría la síntesis de esteroides, pudiendo modular la espermatogénesis u otros procesos gonadales.

CONCLUSIONES

Los estudios realizados en el presente trabajo de Tesis permitieron obtener las conclusiones que se enumeran a continuación.

1) El estudio comparativo efectuado entre hámsteres de las especies Dorado y Djungarian permitió describir modificaciones especie-específicas en:

- ♦ El tamaño corporal y el peso de los órganos reproductivos durante el proceso de desarrollo sexual.
 - Aunque en las dos especies, la etapa de mayor desarrollo corporal coincidió con el período prepuberal; en hámsteres Dorados, la velocidad de crecimiento en la fase de inmadurez fue significativamente superior a la detectada en la especie Djungarian. Hámsteres Dorados prosiguieron su crecimiento corporal durante la etapa puberal aunque a una menor velocidad; en cambio, hámsteres de la especie Djungarian alcanzaron su máximo desarrollo reproductivo a los 46 días de edad.
 - Los testículos y las glándulas sexuales accesorias, en hámsteres de la especie Djungarian, presentaron una mayor relevancia en relación al tamaño corporal, que los órganos reproductivos en hámsteres Dorados.
- ♦ La masa corporal, contenido lipídico y coloración de pelaje durante la exposición a FC.
 - A diferencia de los cambios descritos por otros autores en el peso corporal, niveles lipídicos y coloración de pelaje en hámsteres de la especie Djungarian expuestos a FC; no se observaron alteraciones apreciables en estos parámetros durante la permanencia de hámsteres Dorados en condiciones restrictivas de luminosidad.
- ♦ En los niveles circulantes de gonadotrofinas y hormonas sexuales a lo largo del desarrollo sexual.
 - En hámsteres Dorados, la concentración sérica de gonadotrofinas alcanzó sus niveles máximos entre los 36 y 46 días de edad. En cambio, en hámsteres de la especie Djungarian, los niveles circulantes de LH mostraron un primer incremento a los 30 días, y un posterior aumento en la fase puberal (46-60 días de edad).
 - Si bien en ambas especies se detectó la mayor concentración sérica de T y DHT durante la pubertad, en hámsteres Dorados se observó un significativo incremento en los niveles circulantes de Diol durante el período de inmadurez. En cambio, en hámsteres de la especie Djungarian, los niveles periféricos de este metabolito 5 α -reducido no mostraron

modificaciones apreciables en ninguna etapa del desarrollo. Así, en el hámster Dorado, como ha sido previamente descrito en la rata, Diol sería el principal andrógeno producido por las células de Leydig durante el período prepuberal. Esta conclusión no puede ser extendida al hámster Djungarian, que presenta concentraciones equiparables de T y Diol en esta fase del desarrollo reproductivo.

2) *El diseño experimental consistente en la exposición de hámsteres Dorados adultos a FC durante diferentes intervalos de tiempo, nos ha permitido concluir que:*

- ♦ La permanencia en condiciones restrictivas de luminosidad durante 14-16 semanas (período de máxima *regresión* reproductiva), produce una caída significativa en el peso testicular y de las glándulas sexuales accesorias, en el contenido de ADN y proteínas en estos órganos, en los niveles séricos de hormonas hipofisarias y andrógenos, y en la concentración testicular y epididimaria de T, DHT y Diol. Dichos parámetros son parcial o totalmente restaurados hacia las 22 semanas de exposición a FC (período de *recrudescencia espontánea*).
- ♦ El significativo descenso observado en los niveles testiculares de hormonas sexuales durante la etapa de regresión reproductiva, no respondería a una reducción en la capacidad esteroidogénica de las gónadas involucionadas como resultado de las alteraciones ocurridas en el testículo durante esta fase.
 - En los experimentos *in vitro* realizados con fragmentos testiculares provenientes de hámsteres adultos expuestos a FC durante 14 semanas, la producción de T estimulada con hCG disminuyó en un 15% respecto a los niveles hormonales secretados desde gónadas activas. Sin embargo, en testículos regresionados, la producción de andrógenos totales (T+DHT+Diol) fue 7 veces superior en comparación con la detectada en gónadas de animales adultos mantenidos en FN. Así, puede especularse que en la etapa de regresión testicular, además de una ausencia de estimulación hipofisaria, existiría también una regulación negativa de la esteroidogénesis ejercida por algún factor extra-gonadal. El desarrollo de experimentos *in vitro* con fragmentos testiculares aislados, permite independizarse de dicho factor extra-testicular, y demuestra que, las gónadas fotoregresionadas, presentan una importante actividad esteroidogénica.

- ♦ La actividad secretoria de inhibina B desde las células de Sertoli, presentaría una dependencia diferencial, respecto de los niveles séricos de FSH, según el estadio de la transición regresión-recrudescencia fotoperiódica.
 - En etapas tempranas de la regresión gonadal fotoinducida, la concentración sérica de inhibina B, no sería estrictamente dependiente de esta gonadotrofina; puesto que, hacia las 9 semanas de permanencia en FC, se detectaron niveles circulantes de inhibina B elevados y concentraciones periféricas de FSH notoriamente disminuídas. En cambio, en la etapa de máxima regresión testicular, la secreción de inhibina B desde las células de Sertoli, requeriría la estimulación por FSH. Así, se observó que, a las 14-16 semanas de exposición a FC, las concentraciones circulantes de FSH e inhibina B alcanzaron sus mínimos niveles. Finalmente, en estadios tempranos de la recrudescencia espontánea, se detectaron niveles séricos de FSH equiparables a los presentados por el grupo control. Sin embargo, la concentración de inhibina B permaneció significativamente disminuída en relación con el grupo de animales mantenido en FN. En consecuencia, la concentración sérica de FSH, no desencadenaría una recuperación en los niveles circulantes de inhibina B en esta fase de reactivación.
- ♦ Durante la involución reproductiva, se produce una significativa elevación en la concentración de PA en testículos y vesículas seminales; mientras que, en la fase de recrudescencia, las PA recuperan sus niveles controles. Estos cambios foto-relacionados en la concentración de PA tanto en testículos como en vesículas seminales del hámster, podrían desencadenar el crecimiento y la regeneración de estos órganos reproductivos durante la fase de reactivación espontánea, a través del restablecimiento de su peso, morfología y funcionalidad; o bien actuar como señales secundarias mediando la acción de hormonas y/o factores tróficos en esta etapa.
- ♦ El significativo aumento en la concentración testicular de PA en la fase de regresión, resultaría conjuntamente de una mayor síntesis *de novo* de estos policationes y de un balance en la interconversión con sus acetil derivados. Contrariamente, en vesículas seminales, el incremento en la concentración de PA durante la exposición a FC, no se encontraría asociado a un aumento en la actividad ODC, pudiendo responder a la movilización de otras fuentes tales como la incorporación desde la circulación general, con un probable origen testicular, y a la interconversión con sus formas acetiladas. Así en las

vesículas seminales del hámster, al igual que lo descripto previamente en las glándulas de la rata, la ODC sería altamente dependiente de los niveles circulantes de PRL.

3) El estudio comparativo efectuado entre hámsteres Dorados adultos expuestos a FC, y animales en diferentes estadios del desarrollo sexual (prepubertad, pubertad y adultez) nos ha permitido concluir que:

- ♦ Ciertos cambios endócrinos y funcionales ocurridos en la transición regresión-recrudescencia fotodependiente, mimetizan las variaciones detectadas durante el desarrollo sexual del hámster.
 - En la fase de máxima regresión reproductiva, se observó una severa caída en el peso de los testículos y órganos sexuales accesorios, con una significativa reducción en el contenido de ADN y proteínas de los mismos. Posteriormente, en la etapa de recrudescencia espontánea estos parámetros presentaron un notorio incremento, en forma análoga a lo detectado durante el desarrollo puberal en hámsteres Dorados.
 - En el período de involución, se observó una marcada disminución en los niveles circulantes de LH, FSH y PRL. En etapas tempranas de la reactivación reproductiva espontánea, similarmente a lo ocurrido en el período prepuberal, los niveles séricos de gonadotrofinas presentaron un aumento significativo; mientras que, PRL permaneció disminuída.
 - Durante la fase de regresión, se detectó una significativa disminución en los niveles séricos, gonadales y epididimarios de T, DHT y Diol. A las 22 semanas de permanencia en FC, se observó una reactivación en la producción gonadal de hormonas sexuales, que mimetiza la adquisición de la capacidad biosintética de andrógenos en los testículos puberales.
- ♦ No obstante, se han detectado también, eventos metabólicos propios de la fase de regresión, no equiparables a los sucesos bioquímicos característicos de la prepubertad.
 - Los testículos regresionados presentan concentraciones de T, DHT y Diol significativamente menores a las detectadas en gónadas activas. En cambio, aunque los testículos prepuberales producen T y DHT en baja proporción, la concentración de Diol en esta fase del desarrollo sexual alcanza sus niveles máximos.

- Las gónadas de animales adultos expuestos a FC requirieron, para alcanzar el 50% de la estimulación máxima sobre la producción *in vitro* de andrógenos, la mitad de la concentración de hCG empleada por los testículos prepuberales y adultos activos. Por lo tanto, los testículos fotoinvolucionados, presentarían una mayor sensibilidad a la estimulación con hCG en comparación con las gónadas de animales inmaduros y adultos mantenidos en FN.
- Los testículos involucionados, presentaron una producción *in vitro* de T semejante a la detectada en testículos maduros; mientras que, la secreción de DHT y Diol desde los mismos, fue equiparable a la observada en gónadas inmaduras. En consecuencia, el testículo regresionado en lugar de poseer una capacidad esteroidogénica prepuberal, alcanzaría una condición fisiológica intermedia entre las fases de inmadurez y adultez.

4) *El estudio de neurotransmisores en órganos reproductivos nos permitió concluir que:*

- ♦ Los testículos del hámster presentan importantes niveles de ácido GABA y 5-HT.
- ♦ Durante el proceso de desarrollo sexual, los niveles gonadales de GABA en hámsteres de las especies Dorado y Djungarian, sufren marcadas alteraciones detectándose, en la etapa prepuberal y en la fase adulta, un significativo aumento en el contenido gabaérgico testicular.
- ♦ En el desarrollo puberal del hámster Dorado, los niveles de 5-HT en cápsula y parénquima testicular presentan marcadas modificaciones. La concentración serotoninérgica gonadal alcanza sus niveles máximos durante la prepubertad y adultez, dos etapas del desarrollo caracterizadas por importantes concentraciones circulantes de gonadotrofinas y hormonas sexuales.
- ♦ El contenido testicular de GABA y 5-HT es claramente sensible a las alteraciones en el fotoperíodo. En la etapa de máxima regresión reproductiva, la concentración gabaérgica incrementa marcadamente; mientras que, los niveles testiculares de 5-HT describen una significativa disminución. Durante la reactivación espontánea, la concentración gonadal de GABA retorna a sus niveles controles. En cambio, el contenido serotoninérgico permanece

significativamente bajo, señalando que, la 5-HT no ejercería un rol relevante durante el restablecimiento de la funcionalidad testicular en condiciones fisiológicas normales.

- ♦ GABA es sintetizado endógenamente en el testículo del hámster, empleando al Glut como precursor. Sin embargo, su síntesis alternativa a partir de PA, no puede ser descartada.
 - Las alteraciones detectadas en los niveles gabaérgicos testiculares durante el proceso de desarrollo sexual en los hámsteres Dorado y Djungarian, se correlacionaron con los cambios ocurridos en el contenido de Glut en este órgano.
 - El contenido testicular de Glut presentó, durante la transición fotoperiódica regresión-recrudescencia, modificaciones semejantes a las descritas por los niveles gonadales de GABA. Asimismo, en la fase de máxima involución testicular, se detectó un importante incremento en la actividad GAD gonadal, que correlaciona con un notorio aumento en la concentración gabaérgica, y una significativa caída en los niveles glutamatérgicos.
 - Durante la exposición a FC, los niveles testiculares de GABA y Put describieron perfiles de variación similares.
- ♦ El metabolismo de 5-HT a 5-HIAA, sería un punto clave en la regulación de los niveles gonadales del neurotransmisor.
 - En la fase adulta, además del importante aumento detectado en los niveles serotoninérgicos gonadales, el catabolismo testicular de 5-HT a 5-HIAA presentó también un incremento significativo.
 - La permanencia en FC, que descende significativamente el contenido serotoninérgico gonadal, disminuyó marcadamente el catabolismo de 5-HT en el parénquima testicular.
- ♦ Los epidídimos y las vesículas seminales del hámster, presentan importantes niveles GABA, que participarían en la modulación de procesos metabólicos claves de estos órganos reproductivos accesorios.
- ♦ En el desarrollo sexual del hámster Dorado, los niveles epididimarios y vesiculares de GABA sufren marcadas alteraciones, detectándose el máximo contenido tisular del neurotransmisor, durante el período puberal-adulto.
- ♦ El contenido de GABA en epidídimos y vesículas seminales del hámster, es notoriamente sensible a las condiciones fotoperiódicas, descendiendo significativamente durante la fase de máxima regresión reproductiva.

-
- ♦ La concentración gabaérgica epididimaria no resultaría de la síntesis *de novo* de este neurotransmisor a partir de Glut. Teniendo en cuenta el importante aporte testicular de fluídos y células al epidídimo, un origen gonadal del GABA epididimario no puede ser descartado.
 - El aumento detectado en la concentración epididimaria de GABA durante la fase de regresión, no se asoció con una mayor actividad de la enzima GAD que cataliza la biosíntesis del neurotransmisor a partir de Glut.
 - ♦ Los niveles de GABA presentes en vesículas seminales del hámster, podrían resultar de la síntesis endógena del neurotransmisor a partir de Glut y Put, aunque fuentes alternativas deben ser también evaluadas.
 - Las significativas alteraciones en los niveles gabaérgicos vesiculares, durante el desarrollo sexual y la transición regresión-recrudescencia, se correlacionaron con los cambios detectados en el contenido de Glut en este órgano.
 - Las modificaciones en el contenido de GABA en vesículas seminales de hámsteres expuestos a FC, presentaron un perfil similar a las alteraciones detectadas en los niveles vesiculares de Put.
 - ♦ GABA no afecta la esteroidogénesis gonadal del hámster. No obstante, este neurotransmisor podría participar en la regulación de otro/s procesos metabólicos testiculares que también sufren importantes alteraciones durante el desarrollo puberal y la transición fotoperiódica involución-reactivación.
 - En los experimentos de producción de andrógenos *in vitro*, realizados con fragmentos testiculares y células intersticiales provenientes de hámsteres prepúberes y adultos mantenidos en FN, y de animales regresionados; concentraciones de 5-HT entre 10^{-11} M y 10^{-5} M, no produjeron cambios significativos en los niveles de T, DHT y Diol secretados al Medio de incubación.
 - ♦ Por lo contrario, la 5-HT ejerce una significativa acción inhibitoria sobre la producción testicular de andrógenos. Así, los altos niveles gonadales de 5-HT detectados en etapas de la exposición a FC y del desarrollo sexual, caracterizadas por elevadas concentraciones circulantes de LH; nos sugieren que este neurotransmisor regularía la esteroidogénesis amortiguando el efecto estimulador ejercido por las gonadotrofinas hipofisarias sobre este proceso testicular.

- En los experimentos de producción de andrógenos *in vitro*, realizados con fragmentos testiculares y células intersticiales provenientes de hámsteres prepúberes y adultos mantenidos en FN, y de animales regresionados; el agregado de concentraciones fisiológicas de 5-HT en el Medio de incubación, produjo una disminución significativa en el niveles de T, DHT y Diol secretados.
- ♦ La 5-HT ejercería una regulación negativa diferencial sobre la esteroidogénesis, según el estadio funcional testicular.
 - En los experimentos *in vitro* realizados con testículos provenientes de hámsteres prepúberes y adultos mantenidos en FN, este neurotransmisor inhibió la producción de las hormonas sexuales que presentan una mayor concentración *in vivo* (Diol en los animales inmaduros; T y DHT en los hámsteres adultos). En cambio, en los estudios efectuados con animales adultos expuestos a FC, 5-HT inhibió la producción de los tres esteroides analizados. Estos resultados avalan la hipótesis sobre la existencia, en gónadas regresionadas, de un estado fisiológico intermedio entre la actividad metabólica característica de testículos prepúberes y adultos.
- ♦ El control ejercido por la 5-HT sobre la funcionalidad de las células de Leydig, sería influenciado por una regulación paracrina desde el compartimiento tubular u otros tipos celulares presentes en el intersticio.
 - Los experimentos *in vitro* realizados con preparaciones de células intersticiales, requirieron concentraciones de 5-HT mayores que las empleadas en incubaciones de fragmentos testiculares (10^{-8}M vs 10^{-10}M), para detectar el efecto inhibitorio ejercido por este neurotransmisor sobre producción de andrógenos basal y estimulada por hCG.
- ♦ El CRF ejerce una significativa acción inhibitoria sobre la producción testicular de andrógenos.
 - Los experimentos *in vitro* realizados con preparaciones de células intersticiales, permitieron detectar un efecto inhibitorio de CRF sobre la producción de T basal y post-hCG. Dicho efecto modulador negativo, fue bloqueado por el agregado en el Medio de incubación, de un anticuerpo específico anti-CRF.
- ♦ El efecto inhibitorio de 5-HT sobre la producción de andrógenos estimulada por LH en gónadas del hámster, sería mediado por CRF, y actuaría modulando negativamente la actividad de la adenilato ciclasa productora de AMPc, o algún paso metabólico previo en la transducción de la señal hormonal.

- El efecto inhibitorio de 5-HT sobre la esteroidogenesis testicular, fue bloqueado en presencia de un anticuerpo anti-CRF en el medio de incubación de células intersticiales provenientes de hámsteres adultos normales.
- El agregado de dbAMPc a incubaciones de células intersticiales en presencia de 5-HT, revirtió significativamente el efecto inhibitorio ejercido por este neurotransmisor sobre la producción de T estimulada por hCG.

BIBLIOGRAFIA

- Aanesen A, Fried G, Andersson E, Gottlieb C. (1995) Evidence for γ -aminobutyric acid specific binding sites on human spermatozoa *Human Reprod.* 10(7): 1885-1890.
- Aanesen A, Fried G, Andersson E, Gottlieb C. (1996) Carrier-mediated gamma-aminobutyric acid uptake in human spermatozoa indicating the presence of a high-affinity gamma-aminobutyric acid transport protein. *Biol. Reprod.* 54: 841-846.
- Abayasekara DRE, Kurlak L.O, 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.* Cooke BA, Sharpe RM (Eds), Raven Press, New York, Sero Symposium, 50: 143.
- Ackland JF, Schwartz NA, Mayo KE, Dodson RE. (1992) Nonsteroidal signal originating in the gonads. *Physiol Rev* 72: 731-787.
- Advis JP, Ramirez VD. (1977) Plasma levels of LH and FSH in female rats with precocious puberty induced by hypothalamic lesions. *Biol.Reprod.* 17: 313-320.
- Agrawal YP, Vanha-Perttula T. (1988) Gamma-glutamyl transpeptidase, glutathione, and L-Glutamic acid in the rat epididymis during postnatal development. *Biol. Reprod.* 38: 996-1000.
- Aguilar R, Antón F, Bellido C, Aguilar E, Gaytan F. (1995) Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat. *J. Endocrinol.* 146: 15-21.
- Aguilera G, Harwood JP, Wilson JX, Morell J, Brown JH, Catt KJ (1983) Mechanism of action of corticotropin-releasing factor and other regulators of corticotropin release in rat pituitary cells. *J Biol Chem* 258: 8039-8045.
- Alcivar AA, Hake LE, Mali P, Kaipia A, Parvinen M, Hecht NB. (1989) Developmental and differential expression of the ornithine decarboxylase gene in rodent testis. *Biol. Reprod.* 41: 1133-1142.
- Altman J, Bayer SA. (1978) Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 182: 945-949.
- Allan LG, Wilson FJ, Macdonald GJ (1989) Neuropeptide Y containing nerves in rat gonads: sex differences and development. *Biol Reprod* 40: 371-378.
- Amsterdam A, Suh BS. (1991) An inducible functional peripheral benzodiazepine receptor in mitochondria of steroidogenic granulosa cells. *Endocrinology* 129: 503-510.
- Anakwe OO, Moger WH. (1984a) Ontogeny of rodent testicular androgen production in response to isoproterenol and luteinizing hormone *in vitro*. *Biol. Reprod.* 30: 1142-1152.
- Anakwe OO, Moger WH. (1984b) Beta-2-adrenergic stimulation of androgen production by cultured mouse testicular interstitial cells *Life Sci.* 35: 2041-2047.
- Anakwe OO, Moger WH. (1986) Catecholamine stimulation of androgen production by rat Leydig cells. Interaction with luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone. *Biol Reprod* 35: 806-814.
- Anakwe OO, Murphy PR, Moger WH. (1985) Characterization of beta-adrenergic binding sites on rodent Leydig cells *Biol Reprod* 33: 815-826.
- Andersson A., Henningsson S. (1980) In vitro metabolism of putrescine by diamine oxidase in tissues of the pregnant rat. *Agent and Actions* 10: 104-106.
- Andersson A., Henningsson S., Scheele C. (1980) Formation of GABA via oxidative deamination of putrescine in ovaries of immature rats after gonadotropin stimulation. *Agents and Actions* 10: 106-107, 1980.
- Andrade R, Malenka RC, Nicoll RA. (1986) A G protein couples serotonin and GABA_B receptors to the same channels in hippocampus *Science* 234: 1261-1264.
- Anholt RRRH, Pedersen PO, Souza EB, Snyder SH. (1986) The peripheral-type benzodiazepine receptor. *J. Biol. Chem.* 261: 576-583.
- Apud JA, Tappaz ML, Celotti F, Negri-Cesi P, Masotto C, Racgni G. (1984) Biochemical and immunochemical studies on the GABAergic system in the rat fallopian tube and ovary. *J. Neurochem* 43: 120-125.
- Aquilano DR, Tsai-Morris Ch, Hattori M, Dufau ML. (1985) Mitochondrial cholesterol availability during gonadotropin-induced Leydig cell desensibilization. *Endocrinol* 116: 1745-1754.

- Asano T, Ui M, Ogasawara N. (1985) Prevention of the agonist binding to γ -aminobutyric acid B receptors by guanine nucleotides and islet-activating protein pertussis toxin, in bovine cerebral cortex. *The Journal of Biological Chemistry* 260 (23): 12653-12658.
- Audhya T, Hollander CS, Schlesinger DH, Hutchinson B (1989) Structural characterization and localization of corticotropin-releasing factor in the testis. *Biochem Biophys Acta* 995: 10-16.
- Ayata M, Yamane T, Okamoto S, Li W, Terada N, Matsumoto K. (1989) Increase in epithelial cell growth by hyperprolactinemia induces delay of castration-induced involution of mouse seminal vesicle. *J. Steroid Biochem.* 32: 719-724.
- Balerio GN, Otero-Losada ME, Rubio MC. (1994) A possible inhibitory action of baclofen on hippocampus GABAergic neurones. *General Pharmacology* 25: 297-301.
- Bardin CW, Cheng CY, Mustow NA, Gunsalus GL. (1994) The Sertoli Cell. *En: The physiology of reproduction*. Knobil E, Neill JD (Eds), Raven Press, New York, vol. 1, cap. 20, 1291-1334.
- 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. *Annis N.Y. Acad. Sci.* 438: 346-393.
- Barfuss DW, Tait GR, Ellis LC. (1969) Melatonin synthesis in rat pineal glands inhibited by X-irradiation. *Proc Soc Exptl Biol Med* 132: 35-36.
- Barkley MS (1979) Serum prolactin in the male mouse from birth to maturity *J Endocrinol* 83: 31-33.
- Bamea ER, Fares F, Gavish M. (1989) Modulatory action of benzodiazepines on human term placental steroidogenesis *in vitro*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 64: 155-159.
- Barrell GK, Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ (1992) Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. *Biol Reprod* 46: 1130-1135
- Bartke A, Amador AG, Chandrashekar V, Klemcke HG. (1987) Seasonal differences in testicular receptors and steroidogenesis *J. Ster. Biochem.* 27: 581-587.
- Bartke A, Dalterio S (1975) Evidence for episodic secretion of testosterone in laboratory mice *Steroids* 26: 749-756.
- Bartke A, Hogan MP, Cutty GB (1980a) Effects of human chorionic gonadotropin, prolactin, and bromocriptine on photoperiod-induced testicular regression and recrudescence in golden hamsters *Int J Andrology* 1: 115-120.
- Bartke A, Klemcke HG, Amador AG, Goldman BD, Siler-khodr TM. (1983) Relationship of the length of exposure to short photoperiod to the effect of prolactin on pituitary and testicular function in the golden hamster. *J. Reprod. Fert.* 69: 587-595.
- Bartke A, Klemcke HG, Matt K. (1985a) Effects of physiological and abnormally elevated prolactin levels on the pituitary-testicular axis. *Med. Biol.* 63: 264-275.
- Bartke A, Matt KS, Amador AG, Klemcke HG, Brown D, Gonzales D, Hogan MP (1985b) Effects of inhibitory and stimulatory photoperiods and sexual maturation on the ability of hamster testes to respond to hCG *in vitro*. *Int J Androl* 8: 232-242.
- Bartke A, Siler-Hkodr TM, Hogan MP, Roychoudhury P (1981a) Ectopic pituitary transplants stimulate synthesis and release of follicle-stimulating hormone in golden hamsters *Endocrinology* 108: 133-139.
- Bartke A, Sinha Hikim AP, Russell LD (1996) Leydig cell structure and function in seasonal breeders. *En: The Leydig cell*. Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Eds), Cache River Press, Vienna, IL, 431-450.
- Bartke A, Steele RE, Musto N, Caldwell BV (1973) Fluctuations in plasma testosterone levels in adult male rats and mice. *Endocrinology* 92: 1223-1228.
- Bartke A. (1985) Male hamster reproductive endocrinology *En: The Hamster*. Spiegel HI (Ed), Plenum. Publ. Corp., 73-98.
- Bathgate RAD, Semia C. (1994) Characterization and localization of oxytocin receptors in the rat testis. *J Endocrinol* 141: 343-352.
- Baulieu EE, Robel P (1990) Neurosteroids: a new brain function?. *J Steroid Molec Biol* 37: 395-403.

- Baumgarten HG, Falck B, Holstein AF, Owman CH, Owman T (1968) Adrenergic innervation of the human testis, epididymis, ductus deferens and prostate: a fluorescence microscopic and fluorimetric study. *Z Zellforsch Mikroskop Anat* 90: 81-95.
- Baumgarten HG, Holstein AF. (1967) Catechpolaminhaltige Nervenfasern im Hoden des Menschen. *Z Zellforsch Mikroskop Anat* 79: 389-395.
- Bell A., Mc Lean JR. (1973) The autonomic innervation of the rat testicular capsule. *J. Reprod. Fert.* 32: 253-258.
- Bell JBG, Vinson GP, Hopkins DJ, Lacy D. (1968) Pathways for androgen biosynthesis from (7α - ^3H) pregnenolone and (4 - ^{14}C) progesterone by rat testis interstitium *in vitro*. *Biochem Biophys Acta* 164: 412-420.
- Bergh A, Blom H, Damber JE, Henriksson R (1987) The effect of long-term variation in sympathetic activity on testicular morphology in immature rats. *Andrologia* 19: 448-451.
- Bergh A, Cajander S (1990) Immunohistochemical localization of inhibin-alpha in the testes of normal men and in men with testicular disorders. *Int J Androl* 13: 463-469.
- Bergh A, Damber J-E, van Rooijen N (1993) Liposome-mediated macrophage depletion: an experimental approach to study the role of testicular macrophages in the rat. *J Endocrinol* 136: 407-413.
- Berkowitz AS, Heindel JJ. (1984) Testicular recrudescence in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*): A possible model of sexual maturation. *Endocrinology* 114: 855-860.
- Bernasconi R, Maitre L, Martin P, Raschdorf F. (1982) The use of inhibitors of GABA-transaminase for the determination of GABA turnover in mouse brain regions: an evaluation of aminooxyacetic acid and gabaculine. *J. Neurochem* 38: 57-66.
- Berndtson WE, Desjardins C. (1974) Circulating LH and FSH levels and testicular function in hamsters during light deprivation and subsequent photoperiodic stimulation. *Endocrinology* 95: 195-205.
- Bex FJ, Bartke A. (1977) Testicular LH binding in the hamster: Modification by photoperiod and prolactin. *Endocrinology* 100: 1223-1226.
- Bex FJ, Bartke A., Goldman BD, Dalterio S. (1978) Prolactin, growth hormone, luteinizing hormone receptors, and seasonal changes in testicular activity in the golden hamster *Endocrinology* 103: 2069-2080.
- Bey P, Danzin C, Jung M. (1987) Inhibition of basic amino acid decarboxylases involved in polyamine biosynthesis. *En: Inhibition of polyamine metabolism*. McCann PP, Pegg AE, Sjoerdsma A. (Eds.), Academic Press, Inc., 1-31.
- Bhanot R., Wilkinson M. (1983) Opiatergic control of gonadotropin secretion during puberty in the rat. A neurochemical basis for the hypothalamic "gonadostat"? *Endocrinology* 113: 596-602.
- Bicsak T, Vale W, Vaughn J, Tucker E, Cappel S, Hsueh AJW. (1987) Hormonal regulation of inhibin production by cultured Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 49: 211-217.
- Blackmore PF, Im WB, Bleasdale JE (1994) The cell surface progesterone receptor which stimulates calcium influx in human sperm unlike the A ring reduced steroid site on the GABA_A receptor/chloride channel. *Mol Cell Endocrinol* 104: 237-243.
- Blackshear PJ, Manzella JM, Stumpo DJ, Wen L, Huang JK, Oyen O, Young WS. (1989) High level cell specific expression of ornithine decarboxylase transcripts in rat genitourinary tissues. *Mol. Endocrinol.* 3: 68-78.
- Blank MS, Panerai AE, Friesen HG. (1979) Opioid peptides modulate hormone secretion during sexual development. *Science* 203: 1129-1131.
- Bliss EL, Frischat A, Samuels L. (1972) Brain and testicular functions *Life Sci.* 11: 231-236.
- Bocabella AV, Salgado ED, Alger EA. (1962) Testicular function and histology following serotonin administration. *Endocrinology* 71: 827-831.
- Bocabella AV. (1963) Reinitiation and restoration of spermatogenesis with testosterone propionate and other hormones after a long-term post-hypophysectomy regression period *Endocrinology* 72: 787-798.
- Boissin-Agasse L, Alonso G, Roch G, Boissin J. (1988) Peptidergic neurohormonal systems in the basal hypothalamus of the ferret and the mink: immunocytochemical study of variations during the annual reproductive cycle. *Cell Tissue Res.* 251: 153-159.

- Bolkenius FN, Seiler N. (1987) The role of polyamine reutilization in depletion of cellular store of polyamines in nonproliferating tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 923: 125-135.
- Bormann J, Feigenspan A. (1995) GABA_C receptors. *Trends Neurosci* 18: 515-519.
- Bortolussi M, Zanchetta R, Belvedere P, Colombo L. (1990) Sertoli and Leydig cell numbers and gonadotropin receptors in rat testis from birth to puberty. *Cell Tissue Res* 260: 185-191.
- Boujrad N, Ogwuegbu SO, Garnier M, Lee CH, Martin BM, Papadopoulos V. (1995) Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis. *Science* 268: 1609-1612.
- Bowery NG, Hill DR, Hudson AL, Doble A, Middlemiss DN, Shaw J, Turnbull M. (1980) (-) Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature* 283: 92-94.
- Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PTK. (1994) Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: Evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens *Endocrinology* 135: 1227-1234.
- Brooks DE (1981) Metabolic activity in the epididymis and its regulation by androgens. *Physiol Rev* 61: 515-555.
- Brown PS. (1971) Pituitary FSH in immature female rats treated with drugs that inhibit or antagonize the actions of catecholamines or 5-HT. *Neuroendocrinology* 7: 183-192.
- Bruhn TO, Engeland WC, Anthony EL, Gann DS, Jackson IMD. (1987) Corticotropin-releasing factor in the dog adrenal medulla is secreted in response to hemorrhage *Endocrinology* 120: 25-33.
- Buhl EH, Halasy K, Somogyi P (1994) Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 368: 823-828.
- Burnstock G. (1986) Autonomic neuromuscular junctions: current developments and future directions *J. Anat.* 146: 1-30.
- Burt DR, Kamatchi GL. (1991) GABA_A receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J.* 5: 2916-2923.
- Calandra RS, Baraño JLS, Bertini L, Calvo JC, Charreau EH, Chiauszi 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.* De Nicola AF, Blaquier JA, Soto R (Eds.) Alan Liss, Inc., New York, vol 87, 87-116.
- Calandra RS, Rulli SB, Frungieri MB, Suescun MO, Gonzalez-Calvar SI. (1996) Polyamines in the male reproductive system. *Acta Physiol. Pharmacol. et Therapeutica Latinoam.* 46: 209-222.
- Calogero AE, Bagdy G, Burrello N, Poloso P, D'Agata R. (1995) Role for serotonin₃ receptors in the control of adrenocorticotrophic hormone release from rat pituitary cell cultures. *Eur J Endocrinol* 133: 251-254.
- Calogero AE, Bernardini R, Margioris AN, Bagdy G, Gallucci WT, Munson PJ, Tamarkin L, Tomai PP, Brady L, Gold PW, Chrousos GP. (1989) Effects of serotonergic agonist and antagonist on corticotropin-releasing hormone secretion by explanted rat hypothalami. *Peptides* 10: 189-200.
- Calvo DJ, Ritta MN, Calandra RS, Medina JH. (1990) Peripheral type benzodiazepine receptors are highly concentrated in mitochondrial membrane of rat testicular interstitial cells. *Neuroendocrinology* 52:350-353.
- Campbell CS, Finkelstein JS, Turek FW. (1978) The interaction of photoperiod and testosterone on the development of copulatory behavior in castrated male hamsters. *Physiol Behav* 21: 409-415.
- Campenhout E van (1949) Les relation nerveuses de la glande interstitielle des glandes genitales des mammiferes. *Rev Can Biol* 8:374-429.
- Campos MB, Vitale ML, Calandra RS, Chiocchio SR. (1990b) Serotonergic innervation of the rat testis. *J. Reprod. Fert.* 88: 475-479.
- Campos MB, Vitale ML, Ritta MN, Chiocchio SR, Calandra RS. (1990a) Catecholamine distribution in adult rat testis. *Andrologia* 22:247-252.
- Canellakis ZN, Marsh LL, Bondy PK. (1989) Polyamines and their derivatives as modulators in growth and differentiation. *Yale J. Biol. Med.* 62: 481-491.
- Cardinali DP. (1981) Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocrine reviews* 2: 327-346.
- Caron PC, Cote LJ, Kremzner LT (1988) Putrescine, a source of γ -aminobutyric acid in the adrenal gland of the rat. *Biochem J* 251: 559-562.

- Casero Jr RA, Pegg AE. (1993) Spermidine/spermine N¹-acetyltransferase the turning point in polyamine metabolism *FASEB J.* 7: 653-661.
- Casey PJ, Gilman AG. (1988) G protein involvement in receptor-effector coupling. *J. Biol. Chem.* 263: 2577-2580.
- Catt KJ, Harwood JP, Clayton RN, Davies TF, Chan V, Katikineni M, Nozu K, Dufau ML. (1980) Regulation of peptide hormone receptors and gonadal steroidogenesis. *Recent Prog Horm Res* 36: 557-622.
- Cavallaro S, Komeyev A, Guidotti A, Costa E. (1992) Diazepam-binding inhibitor (DBI)-processing products, acting at the mitochondrial DBI receptor, mediate adrenocorticotrophic hormone-induced steroidogenesis in rat adrenal gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10598-10602.
- Celotti F, Apud JA, Rovescalli AC, Melcangi RC, Negri-Cresi P, Racagni G. (1986) The GABAergic extrinsic innervation of the rat fallopian tubes: Biochemical evidence and endocrine modulation. *En: GABA and endocrine function, Advances in Biochemical Psychopharmacology.* Racagni G, Donoso A (Eds), Raven Press, New York, 251-264.
- Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. (1994) The purification, cloning and expression of a novel LH-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse leydig tumor cell: Characterization of the Steroidogenic Acute Regulatory protein (STAR) *J. Biol. Chem.* 269: 28314-28322.
- Clarke IJ, Rao A, Fallest PC, Shupmik MA. (1993) Transcription rate of the follicle stimulating hormone (FSH) β subunit gene is reduced by inhibin in sheep but this does not fully explain the decrease in mRNA. *Mol Cell Endocrinol* 91: 211-216.
- Clegg EJ, Macmillan A. (1965a) The uptake of vital dyes and particulate matter by the Sertoli cells of the rat testis. *J. Anat. London* 99: 219-221.
- Clegg EJ, Macmillan EW (1965b) The phagocytic nature of Schiff-positive interstitial cells in the rat testis. *J Endocrinol* 31: 299-300.
- Clermont L, Le Blond CP, Messier B. (1959) Durée de cycle de l' épithélium séminal du rat. *Arch. Anat. Micro. Morph. Exp.* 48: 37-40.
- Clermont L, Perey B. (1957) Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat* 100: 241-267.
- Clermont Y, Harvey SC. (1967) Effects of hormones on spermatogenesis in the rat. *Ciba Found Colloq Endocrinol* 16: 173-189.
- Clermont Y. (1993) Introduction to the Sertoli cell. *En: The Sertoli Cell.* Russell LD, Griswold MD (Eds) Cache River Press, Clearwater, FL, XI-XXV.
- Cochet C, Chambaz EM. (1983) Polyamine mediated protein phosphorylations: a possible target for intracellular polyamine action. *Mol. Cell. Endocr.* 30: 247-266.
- Cochran RC, Schuetz AW, Ewing LL. (1979) Age-related changes in conversion of 5 α -androstane-17 β -ol-3-one to 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol and 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol by rat testicular cells *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 57: 143-147.
- Coffey DS. (1974) The effects of androgens on DNA and RNA synthesis in sex accessory tissues. *En: Male Accessory Sex Organs.* Brandes D (Ed), Academic Press, New York, 307-315.
- Coggeshall RE. (1964) A study of diencephalic development in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 122: 241-247.
- Cohen P. (1985) The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity *Eur. J. Biochem.* 151: 439-448.
- Cohn DF, Homonnai ZT, Paz GF. (1982) The effect of anticonvulsant drugs on the development of male rats and their fertility. *J. Neurology Neurosurgical Psychiatry* 45: 844-846.
- Colwell CS, Max M, Hudson D, Menaker M. (1991) Excitatory amino acid receptors may mediate the effects of light on the reproductive system of the golden hamster. *Biol Reprod* 44: 604-608.
- Conti M, Toscano MV, Petrelli L, Geremia R, Stefanini M. (1983) Involvement of phosphodiesterase in the refractoriness of the Sertoli cells. *Endocrinology* 113: 1845-1853.
- 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. Endocrinol.* 27: 221-226.

- Corbier P, Kerdelhue B, Picon R, Roffi J. (1978) Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during and after birth in the perinatal rat *Endocrinology* 103: 1985-1991.
- Corona GL. (1953) L'innervazione della vaginale propria del testicolo. *Z. Anat. Entwicklungsgeschichte* 117: 306-308.
- Corpechot C, Baulieu E-E, Robel P. (1981) Testosterone, dihydrotestosterone and androstanediols in plasma, testes and prostates of rats during development. *Acta Endocrinol (Copenh)* 96: 127-135.
- Costa E, Guidotti A. (1991) Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions. *Life Sci.* 49: 325-344.
- Coujard R. (1954) Contribution a l'etude des voies nerveuses sympathiques du testicule. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 43: 321-327.
- Crawford MLA, Young JM. (1988) GABA_B receptor-mediated inhibition of histamine H1-receptor-induced inositol phosphate formation in slices of rat cerebral cortex. *J Neurochem* 51: 1441-1447.
- Crosby EC, Showers MJC. (1969) Comparative anatomy of the preoptic and hypothalamic areas. *En: The Hypothalamus*. Haymaker W, Anderson E, Nauta WJH (Eds). Springfield, IL: C.C. Thomas, 61-87.
- Curtis DR, Gynther BD, Beattie DT, Kerr DIB, Prager RH. (1988) Baclofen antagonism by 2-hydroxy-saclofen in the cat spinal cord. *Neuroscience Letters* 92: 97-101.
- Czyba JC, Cottinet D, Dams R, Curé M. (1971) Effets du sulpiride sur l'appareil genital du Hamster doré en phase d'involution hivernale. *CR Seances Soc Biol Ses Fil* 165: 1624-1626.
- Champney TH (1989) β -adrenergic blockers prevent short photoperiod-induced gonadal regression, but not melatonin-induced regression in male Syrian hamsters. *The J of Experimental Zoology* 249: 221-228, 1989.
- Chan WY, Ng TB. (1994) Effect of photoperiod on testicular histology in golden hamsters and C57 and Balb/c mice. *Archives of Andrology* 32: 101-109.
- Chanderbhan R, Noland BJ, Scallen TJ, Vahouny GV. (1982) Sterol carrier protein₂: Delivery of cholesterol from adrenal lipid droplets to mitochondria for pregnenolone synthesis. *J. Biol. Chem.* 257: 8928-8934.
- Chandrashekar V, Bartke A, Sellers K. (1987) Prolactin modulates the gonadotropin response to the negative feedback effect of testosterone in immature male rats. *Endocrinology* 120: 758-763.
- Chandrashekar V, Bartke A. (1989) The influence of short photoperiod on testicular and circulating levels of Testosterone precursors in the adult Golden hamster. *Biol Reprod* 40: 300-306.
- Charreau EH, Attramadal A, Torjensen PA, Purvis K, Calandra RS, Hansson V. (1977) Prolactin binding in rat testis: specific receptors in interstitial cells. *Mol. Cell. Endocr.* 6:303-307.
- Chen HJ, Reiter RJ. (1980) The combination of twice daily luteinizing hormone-releasing factor administration and renal pituitary homografts restores reproductive organ size in male hamsters with pineal-mediated gonadal atrophy. *Endocrinology* 106: 1382-1385.
- Chen YI, Kraemer FB, Reaven GM. (1980) Identification of specific HDL-binding sites in rat testis. *J. Biol. Chem.* 255: 9162-9165.
- Chik CL, Ho AK, Brown GM. (1986) Effect of Food Restriction on the circadian rhythms of circulating tryptophan and serotonin in rats. *J Neural Transm* 66: 261-269.
- Chiwakata C, Brackmann B, Hunt N, Davidoff M, Schulze W, Ivell R. (1991) Tachykinin (substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis *Endocrinology* 128: 2441-2448.
- Christ JF. (1969) Derivation and boundaries of the hypothalamus with atlas of hypothalamic grisea. *En: The Hypothalamus*. Haymaker W, Anderson E, Nauta WJH (Eds.) Springfield, IL: C.C. Thomas, 13-22.
- Christensen AK. (1975) Leydig cells *En: Handbook of Physiology*. Greep RP, Astwood EB (Eds), Washington DC: American Physiology Society (vol 5; Sec 7) Endocrinology, 57-94.
- Chubb C, Ewing LL. (1981) Steroid secretion by sexually immature rat and rabbit testes perfused *in vitro*. *Endocrinology* 109: 1999-2003.

- Damber JE, Janson PO. (1978) The effect of LH, adrenaline and noradrenaline on testicular blood flow and plasma testosterone concentrations in anesthetized rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 88: 390-396.
- 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: 1906-1911.
- 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: 209-213.
- Daniel WW (1978) Applied nonparametric statistics. Boston: Houghton Mifflin Co., 211-214.
- Darrow JM, Davis FC, Elliot JA., Stetson MH, Turek FW, Menaker M. (1980) Influence of photoperiod on reproductive development in the Golden hamster. *Biol. Reprod.* 22: 443-450.
- Dave JR, Rubinstein N, Eskay RL. (1985) Evidence that β endorphin binds to specific receptors in rat peripheral tissues and stimulates the adenylate-cyclase-adenosine 3',5'-monophosphate system. *Endocrinology* 117: 1389-1392.
- Dayan AD. (1970) Variation between species in the innervation of intra-testicular blood vessels. *Experientia* 26: 1360-1366.
- de Krester DM, Catt KJ, Burger HG, Smith GC. (1969) Radioautographic studies on the localization of ^{125}I -labeled human luteinizing and growth hormone in immature male rats. *J Endocrinol* 43: 105-111.
- de Krester DM, Kerr JB. (1994) The cytology of the testis. *En: The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (Eds), Raven Press, New York, vol 1: cap. 19, 1177-1290.
- de las Heras MA, Calandra RS. (1986) Circadian rhythm decarboxylase activity in rat testis. *Horm. and Metab. Res.* 18: 792-793.
- de las Heras MA, Calandra RS. (1987) Androgen dependence of ornithine decarboxylase in rat epididymis. *J.Reprod.Fert.* 79: 9-14.
- de las Heras MA, Calandra RS. (1991) S-adenosyl-L-methionine decarboxylase activity in the rat epididymis: ontogeny and androgenic control. *J. Androl.* 12: 209-213.
- de las Heras MA, Calandra RS. (1992) Acute effect of prolactin on ornithine decarboxylase activity in the rat testis. *Archives of Andrology* 29: 271-279.
- de las Heras MA, Gonzalez SI, Calandra RS. (1992) Androgenic control of polyamines concentrations in rat epididymis. *J.Reprod.Fert.* 96: 323-330.
- de Winter JP, Themmen APN, Hoogerbrugge JW, Klaij IA, Grootegoed JA, de Jong FH. (1992a) Activin receptor mRNA expression in rat testicular cell types. *Mol Cell Endocrinol* 83:R1-R8.
- de Winter JP, Timmerman MA, Vanderstichele HMJ, Klaij IA, Grootenhuys AJ, Rommerts FFG, de Jong FH. (1992b) Testicular Leydig cells *in vitro* secrete only inhibin α -subunits, whereas Leydig cell tumors can secrete bioactive inhibin. *Mol Cell Endocrinol* 83: 105-115.
- Del Rio RM. (1981) γ -aminobutyric acid system in rat oviduct. *J. Biol. Chem.* 256: 9816-9819.
- Desjardins C, Ewing LL, Johnson BH. (1971) Effects of light deprivation upon the spermatogenic and steroidogenic elements of hamster testes. *Endocrinology* 89: 791-800.
- Deslypere JP, Sayed A, Punjabi U, Verdonck L, Vermeulen A. (1982) Plasma 5α -androstane- 3α , 17β -diol and urinary 5α -androstane- 3α - 17β -diol glucuronide, parameters of peripheral androgen action: a comparative study. *J Clin Endocrinol Metab* 54: 386-391.
- Deutsch PJ, Hoeffler JP, Jameson JL, Lin L.C., Habener JF. (1988) Structural determinants for transcriptional activation by cAMP-responsive DNA elements. *J. Biol. Chem.* 263: 18466-18472.
- Dias JA, Treble DH, Reichert Jr. LE. (1983) Effect of bacitracin and polyamines on follicle-stimulating hormone binding to membrane-bound and detergent-solubilized bovine calf testis receptor. *Endocrinology* 113: 2029-2034.
- Dinan TG. (1996) Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Life Sciences* 58 (20) 1683-1694.
- Döhler KD, Wuttke W (1975) Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology* 97: 898-907.

- Dombrowicz D, Hooghe Peters EL, Gothot A, Sente B, Vanhaelst L, Closset J, Hennen G. (1992) Cellular localization of IGF-I and IGF-II mRNAs in immature hypophysectomized rat testis and epididymis after *in vivo* hormonal treatment. *Arch Internat Physiol Biochim Biophys* 100: 303-308.
- Dong C-J, Picaud SA, Werblin FS. (1994) GABA transporters and GABA_C-like receptors on catfish cone- but not rod-driven horizontal cells. *J Neurosci* 14: 2648-2658.
- Donovan BT, van der Werff ten Bosch JJ. (1965) Physiology of puberty. *En: Monographs of the physiological society*. Barcroft H, Davson H, Paton WDM (Eds), Williams & Wilkins, Baltimore, No 15, pág. 1-204.
- Dom A, Müller M, Berstein HG, Pajunen A, Jarvinen M. (1985) Rat prostate gland: a good model for demonstration of ornithine decarboxylase by immunohistochemistry. *Histochem.J.* 17: 731-733.
- Duffau ML, Tinajero JC, Fabbri A. (1993) Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB J.* 7: 299-307.
- Duffau ML, Watanabe K, Katt KJ. (1973) Stimulation of cyclic AMP production by the rat testis during incubation with hCG *in vitro*. *Endocrinology* 92: 6-11.
- Dutar P, Nicoll RA. (1988) A physiological role for GABA_B receptors in the central nervous system. *Nature* 332: 156-158.
- Dym M, Fawcett DW. (1970) The blood testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* 3: 308-326.
- Ebaldi M. (1987) Indolic, aminergic and peptidergic receptors and their modulation of pineal function. *En: Fundamentals and Clinics in Pineal Research*. Trentini GP, DeGaetani C, Pevet P (Eds), Raven Press, New York, 91-110.
- Ebling FJP, Alexander IHM, Urbanski HF, Hastings MH. (1995) Effects of N-Methyl-D-aspartate (NMDA) on seasonal cycles of reproduction, body weight and pelage colour in the male siberian hamster. *J of Endocrinology* 7: 555-566.
- Ebling FJP, Wood RI, Suttie JM, Adel TE, Foster DL (1989) Prenatal photoperiod influences neonatal prolactin secretion in the sheep. *Endocrinology* 125: 384-391.
- Eik-Nes KB. (1969) An effect of isoproterenol on rates of synthesis and secretion of testosterone. *Am.J.Physiol.* 271: 1764-1770.
- Elliott JA. (1976) Circadian rhythms and photoperiodic time measurements in mammals. *Fed Proc* 25: 2339-2346.
- Ellis GB, Desjardins C. (1982) Male rats secrete luteinizing hormone and testosterone episodically. *Endocrinology* 110: 1618-1627.
- Ellis GB, Turek FW. (1979) Time course of the photoperiod-induced changes in sensitivity of the hypothalamic-pituitary axis to testosterone feedback in castrated male hamsters. *Endocrinology* 104: 625-630.
- 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: 1610-1616.
- Ellis LC. (1972) Inhibition of rat testicular androgen synthesis *in vitro* by melatonin and serotonin. *Endocrinology* 90: 17-28.
- Enz R, Brandstätter JH, Hartveit E, Wässle H, Bormann J. (1995) Expression of GABA receptor rho1 and rho2 subunits in the retina and brain of the rat. *Eur J Neurosci* 7: 1495-1501.
- Epstein LF, Orme-Johnson NR. (1991) Acute action of luteinizing hormone on mouse Leydig cells: Accumulation of mitochondrial phosphoproteins and stimulation of testosterone biosynthesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 81: 113-126.
- Erdő SL, Amenta F. (1986) Characterization and localization of high-affinity GABA uptake in rabbit oviduct. *Eur J Pharmacol* 130: 287-294.
- Erdő SL, Joó F, Wolff JR. (1989) Immunohistochemical localization of glutamate decarboxylase in the rat oviduct and ovary: further evidence for non-neural GABA systems. *Cell Tissue Res* 255: 431-434.
- Erdő SL, Kiss B, Szporny L. (1984) Comparative characterization of glutamate decarboxylase in crude homogenates of oviduct, ovary, and hypothalamus. *J. Neurochem* 43: 1532-1537.

- Erdő SL, Kiss B. (1986) Presence of GABA, glutamate decarboxylase, and GABA transaminase in peripheral tissues: a collection of quantitative data. *En: GABAergic Mechanisms in the mammalian periphery*. Erdő SL, Boverly NG (Eds), Raven Press, New York 5-17.
- Erdő SL, Rosdy B, Szpomy L (1982) Higher GABA concentrations in fallopian tube than in brain of the rat *J. Neurochem* 38: 1174-1176.
- Erdő SL, Somogyi J, Hamori J, Amenta F. (1986) Light and electron microscopic visualization of gamma-aminobutyric acid and GABA transaminase in the oviduct of rat. Predominant occurrence in epithelium *Cell Tissue Res* 244: 621-624
- Erdő SL, Wekerle L. (1990) GABA_A type binding sites on membranes of spermatozoa *Life Sci* 47: 1147-1151
- Erdő SL, Wolff JR (1990) γ -aminobutyric acid outside the mammalian brain *J Neurochem* 54: 363-372.
- Erdő SL. (1984) Alteration of GABA levels in ovary and fallopian tube of the pregnant rat. *Life Sci* 34: 1879-1884.
- Erdő SL. (1985) Peripheral GABAergic mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences* 6: 205-208.
- Ewing LL, Zirkin BR. (1983) Leydig cell structure and steroidogenic function. *Rec.Prog.Horm.Res.* 39: 599-635.
- Ewing LL, Zirkin BR, Cochran RC, Kromann N, Peters C, Ruiz-Bravo N. (1979) Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused *in vitro*: Correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology* 105: 1135-1142.
- Fabbri A, Tinajero JC, Arizzi M, Spera G, Dufau ML, Isidori A. (1990a) Corticotropin releasing factor in the testis: localization, production and local role. *En: Hormonal communicating events in the testis*. Isidori A, Fabbri A, Dufau ML (Eds), Serono Symposia, vol 70, Raven Press, NY, 95-103.
- Fabbri A, Tinajero JC, Dufau ML. (1990b) Corticotropin-releasing factor is produced by rat Leydig cells and has a major local antireproductive role. *Endocrinology* 127: 1541-1543.
- Fair WR, Clark RB, Wehner N. (1972) A correlation of seminal polyamine levels and semen analysis in the human. *Fertil.Steril.* 23: 38-43.
- Fantoni G, Morris PL, Forti G, Vanelli GB, Orlando C, Barni T, Sestini R, Danza G, Maggi M. (1993) Endothelin-1: A new autocrine/paracrine factor in rat testis *Am J Physiol* 265: E267-274.
- Fawcett DW. (1991a) Glándulas y secreción *En: Tratado de Histología*, Interamericana, McGraw-Hill, Inc, cap 3, 83-108.
- Fawcett DW. (1991b) Glándula pineal *En: Tratado de Histología*, Interamericana, McGraw-Hill, Inc, cap 21, 541-544.
- Fawcett DW. (1991c) Sistema reproductor masculino *En: Tratado de Histología*, Interamericana, McGraw-Hill, Inc, cap 31, 802-857.
- Feng Z-M, Madigan MB, Chen C-L C. (1993) Expression of type II activin receptor genes in the male and female reproductive tissues of the rat. *Endocrinology* 132: 2593-2600.
- Fernandez I, Martín del Río R, Oresanz L M. (1985) Surgical ablation of oviductal extrinsic innervation changes GABA levels in the rat Fallopian tube. *Life Sci* 36: 1733-1737.
- Fernandez-Pardal J, Gimeno MF, Gimeno AL. (1984) The presence of GABA in ovarian, tubal and uterine rat tissue and the influence of estrogens. *IRCS Med Sci (Biochem)* 12: 706-707.
- Festing MFW. (1972) Hamsters *En: The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*, Universities Federation for Animal Welfare (Ed.), 4th Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 242-256.
- Figala J, Hoffmann K, Goldau G. (1973). Zur Jahresperiodik beim Dsungarischen Zwerghamster *Phodopus sungorus pallas*. *Oecologia (Berl)* 12: 89-118.
- Fjösne HE, Ostensen MA, Haarstad H, Sunde A. (1990) Androgen regulation of polyamine synthesis in seminal vesicle and in different lobes of the rat prostate. *The Prostate* 17: 1-11.
- Fjösne HE, Strand H, Ostensen MA, Sunde A. (1988) Ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase activity in the accessory sex organs of intact, castrated and androgen-stimulated castrated rats. *The Prostate* 12: 309-320.
- Folk JE, Park MH, Chung SI, Schrode J, Lester EP, Cooper HL. (1980) Polyamines as physiological substrates for transglutaminases. *J.Biol.Chem.* 255: 3695-3700.

- Foo N-C, Carter D, Murphy D, Ivell R. (1991) Vasopressin and oxytocin gene expression in rat testes. *Endocrinology* 128: 2118-2128.
- Fortherby K, James F. (1972) Metabolism of synthetic steroids. *En: Advances in Steroid Biochemistry and Pharmacology*, Briggs MH, Christie GA (Eds), New York Academic Press, vol 3, 67-165.
- Francis GL, Triche TJ, Brown HC, Bercu BB. (1981) *In vitro* gonadotrophin stimulation of bovine Sertoli cells ornithine decarboxylase activity. *J. Androl.* 2: 312-320.
- Frankel AL, Ryan EL. (1981) Testicular innervation is necessary for the response of plasma testosterone levels to acute stress. *Biol. Reprod.* 24: 491-495.
- Frankel AL, Mock EJ, Chapman JC. (1984) Hypophysectomy and hemivasectomy can inhibit the testicular hemicastration response of the mature rat. *Biol. Reprod.* 30: 804-809.
- Frayne J, Nicholson HE. (1995) Effect of oxytocin on testosterone production by isolated rat Leydig cells is mediated via a specific oxytocin receptor. *Biol Reprod* 52: 1268-1273.
- Free MJ, Jaffe RA. (1972) Dynamics of circulation in the testis of the conscious rat. *Am. J. Physiol.* 223: 241-249.
- Freedman DA, Ascoli M. (1983) The LDL pathway of cultured Leydig tumor cells. *Biochem. Biophys. Acta* 754: 72-77.
- Frustaci J, Mertz LM, Pedersen RC. (1989) Steroidogenesis activator polypeptide (SAP) in the guinea pig adrenal cortex. *Mol. Cell. Endocrinol.* 64: 137-143.
- Fuller RW. (1981) Serotonergic stimulation of pituitary-adrenocortical function in rats. *Neuroendocrinology* 32: 118-127.
- Furness JB, Costa M. (1978) Distribution of intrinsic nerve cell bodies and axons which take up aromatic amines and their precursors in the small intestine of the guinea pig. *Cell Tissue Research* 188: 527.
- Garde SV, Moodbidri SB, Phadke AM, Sheth AR. (1988) Localization of inhibin in human testes by immunoperoxidase technique. *Anat Rec* 222: 357-361.
- Gamier M, Boujrad N, Oke BO, Brown AS, Riond J, Ferrara P, Shoyab M, Suarez-Quian CA, Papadopoulos V. (1993) Diazepam binding inhibitor is a paracrine/autocrine regulator of Leydig cell proliferation and steroidogenesis: action via peripheral-type benzodiazepin
- Gaston S, Menaker M. (1967) Photoperiodic control of hamster testis. *Science* 158: 925-928.
- Gaytan F, Aceitero J, Lucena C, Aguilar E, Pinilla L, Gamelo P. (1992) Simultaneous proliferation and differentiation of mast cells and Leydig cells in the rat testis Are common regulatory factors involved? *J of Andrology* 13: 387-397.
- Gaytan F, Bellido C, Carrera G, Aguilar E. (1990) Differentiation of mast cells during postnatal development of neonatally estrogen-treated rats. *Cell Tissue Res* 259: 25-31.
- Gaytan F, Carrera G, Pinilla L, Aguilar R, Bellido C. (1989) Mast cells in the testis, epididymis and accessory glands of the rat: effects of neonatal steroid treatment. *J. Androl.* 10: 351-358.
- Ge R-S, Shan L-X, Hardy MP. (1996) Pubertal development of Leydig cells *En: The Leydig cell*, Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Eds), Cache River Press, Vienna IL, 159-174.
- Gellert RJ, Ganong WF. (1960) Precocious puberty in rats with hypothalamic lesions. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 33: 569-576.
- Geneser F. (1988a) Glándulas endócrinas *En: Histologi, Médica Panamericana* (Ed), cap. 21, 505-537.
- Geneser F. (1988b) Aparato genital *En: Histologi, Médica Panamericana* (Ed), cap. 21, 538-592.
- 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. USA* 74: 3086-3089.
- Gharib SD, Leung PCK, Carroll RS, Chin KK. (1990) Androgens positively regulate follicle-stimulating hormone β -subunit mRNA levels in rat pituitary cells. *Mol Endocrinol* 4: 1620-1626.
- Ghosh S, Bartke A, Grasso P, Reichert LE, Russell LD. (1992) Structural response of the hamster Sertoli cell to hypophysectomy: A correlative morphometric and endocrine study. *The Anatomical Record* 234: 513-529.

- Gimeno MF, Fernandez-Pardal J, Viggiano M, Pezzot MC, Gimeno AL. (1986) On the presence of GABA in ovarian, tubal and uterine tissues. Modification at different stages of the estrous cycle and during pregnancy. *En: GABA and endocrine function, Advances in Biochemical Psychopharmacology*. Racagni G, Donoso A (Eds) , Raven Press, New York, 275-282.
- Giusti M, Valenti S, De Rose AF, Foppiani L, Carmignani G, Giordano G. (1997) Melatonin exerts a modulatory role on androgen secretion by Leydig cells: preliminary data on *in vitro* cultured Leydig cells of human testis. *International Journal of Andrology*, VIth International Congress of Andrology, Salzburgo, Austria, vol. 20, suppl 1, abstr 28, pag 7.
- Godfrey PP, Grahame-Smith DG, Gray JA. (1988) GABA_B receptor activation inhibits 5-hydroxytryptamine-stimulated inositol phospholipid turnover in mouse cerebral cortex. *Eur J Pharmacol* 152: 185-188.
- Goetz F, Stahl F, Rohde W, Doerner G. (1983) The influence of adrenaline on plasma testosterone in adult and newborn male rats. *Exp Clin Endocrinol* 81:239-244.
- Goldman B, Hall V, Hollister C, Roychoudhury P, Tamarkin L, Westrom W. (1979) Effects of melatonin on the reproductive system in intact and pinealectomized male hamsters maintained under various photoperiods. *Endocrinology* 104: 82.
- Gondos B, Berndston WE. (1993) Postnatal and pubertal development. *En: The Sertoli Cell* Russell LD, Griswold MD (eds), Cache River Press, Clearwater, Florida, 116-154.
- Gonzales GF, Garcia-Hjarles M, Velazquez G. (1992) Hyperprolactinaemia and hyperserotoninaemia: their relationship to seminal quality. *Andrologia* 24: 95-100.
- Gonzalez SI, Chandrashekar V, Shire JCM, Luthy IA., Bartke A, Calandra RS. (1991) Effects of hyperprolactinemia on ornithine decarboxylase activity and polyamine levels in seminal vesicles of genetically prolactin-deficient adult dwarf mice. *Biol. Reprod.* 44: 321-326.
- Gonzalez SI, Suescun MO, Rulli SB, Estivariz F, Calandra R.S. (1994) Modulation of ornithine decarboxylase activity by prolactin in seminal vesicle of the rat. *Int.J.Androl.* 17: 143-148.
- Goyns MH (1982) The role of polyamines in animal cell physiology. *J.Theor.Biol.* 97: 577-589.
- Gravis CJ, Weaker FJ. (1977) Testicular involution following optic enucleation: An ultrastructural and cytochemical study. *Cell Tiss. Res.* 184: 67-77.
- Griswold MD. (1988) Protein secretions of Sertoli cells. *Int Rev Cytol* 110: 133-156.
- Groome N, O' Brien M. (1993) Immunoassays for inhibin and its subunits. *Journal of immunological methods* 165: 167-176.
- Guldenaar SEF, Pickering BT. (1985) Immunocytochemical evidence for the presence of oxytocin in rat testis. *Cell. Tiss. Res.* 240: 485-491.
- Hadjiconstantinou M, Potter PE, Neff NH. (1982) Trans-synaptic modulation via muscarinic receptors of serotonin-containing small intensely fluorescent cell of superior cervical ganglion. *J Neurosci* 2: 1836-1839.
- Hakovirta H, Keiski A, Toppari J, Halmekyto M, Alhonen L, Jänne J, Parvinen M. (1993) Polyamines and regulation of spermatogenesis: selective stimulation of late spermatogonia in transgenic mice overexpressing the human ornithine decarboxylase gene. *Mol. Endocrinol* 7:1430-1436.
- Hales DB. (1996) Leydig cell-macrophage interactions: An overview. *En: The Leydig cell*, Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Eds), Cache River Press, Vienna IL, 451-466.
- 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: 1361-1366.
- Hall PF, Sozer CC, Eik Nes K.B. (1964) Formation of dehydroepiandrosterone during *in vivo* and *in vitro* biosynthesis of testosterone by testicular tissue. *Endocrinology* 74: 35-40.
- Hall PF. (1963) The effect of interstitial cell-stimulating hormone on the biosynthesis of testicular cholesterol from acetate-1-C¹⁴. *Biochemistry* 2: 1232-1235.
- Hall PF. (1994) Testicular steroid synthesis: Organization and regulation *En: The Physiology of reproduction*, Knobil E, Neill JD (Eds.), Raven Press, New York, vol 1, cap 21, 1335-1362.
- 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 Physiol. (Paris)* 77: 269-273.
- Hansson V, Calandra RS, Purvis K, Ritzen M, French FS. (1976) Hormonal regulation of spermatogenesis. *Vit Horm* 34: 187-214.

- Hardy MP, Nonneman D, Ganjam VK, Zirkin BR. (1993) Hormonal control of Leydig cell differentiation and mature function. *En: Understanding male infertility: Basic and clinical approaches*. Whitcomb R, Zirkin BR (Eds), New York: Raven Press, 125-142.
- Hartig PR. (1989) Molecular biology of 5-HT receptors. *Trends Pharmacol Sci* 10: 64-69.
- Häusler A, Monnet G, Peter O. (1993) Involvement of GABA_B receptors in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical (HPA) axis in rats. *J Steroid Molec Biol* 46 (6): 767-771.
- Heby O. (1981) Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 14: 1-20.
- Heindel J.J. (1988) Age-related and testicular regression-induced changes in adenosine 3',5'-monophosphate responses in cultured hamster Sertoli cells. *Endocrinology* 122: 475-484.
- Heindel JJ, Steinberger A, Strada SJ. (1981) Identification and characterization of a β 1-adrenergic receptor in the rat Sertoli cell. *Mol. Cell. Endocrinol.* 22: 349-353.
- Heller JS, Fong WF, Canellakis ES. (1976) Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1858-1862.
- Herbert J, Klinowska MK. (1978) The role of the pineal body. *En: The environmental photoperiod and annual reproductive cycle in the ferret (Mustela furo)*. Assenmacher I, Famer DS (Eds), Environmental Endocrinology, Springer, Berlin, 87-104.
- Hickman CP, Roberts LS, Hickman FM. (1986a) Grados de organización en la complejidad de los animales. Tamaño y complejidad *En: Integrated principles of zoology*, Interamericana (Ed) cap 2, 24-26.
- Hickman CP, Roberts LS, Hickman FM. (1986b) El proceso reproductor. Estructura de los sistemas reproductores. *En: Integrated principles of zoology*, Interamericana (Ed) cap 2, 24-26.
- Hodson N. (1970) The nerves of the testis, epididymis and scrotum. *En: The testis*. Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL (Eds), vol 1, 47-77.
- Hoffmann K. (1978a) Photoperiodic mechanism in hamsters: The participation of the pineal gland *En: Environmental Endocrinology*. Assenmacher I, Famer DS (Eds), Springer-Verlag, New York, 94-102.
- Hoffmann K. (1978b) Effect of castration on photoperiodically induced weight gain in the Djungarian hamster. *Naturwissenschaften* 65.S: 494.
- Hoffmann K. (1978c) Effect of short photoperiod on puberty, growth and moult in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J. Reprod. Fert.* 54: 29-35.
- Hoffmann K. (1979) Photoperiod, pineal and reproduction in hamsters. *Prog Brain Res* 52: 397-415.
- Hoffmann K. (1981) Photoperiod in vertebrates. *En: Handbook of behavioral physiology*. Aschoff J. (Ed), Raven Press, New York, vol. IV, 449-473.
- 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: 3587-3593.
- Holmes MC, Di Rienzo G, Beckford U, Gillham B, Jones MT. (1982) Role of serotonin in the control of secretion of corticotropin releasing factor. *J Endocrinol* 93, 151-160.
- Holmes SD, Spotts G, Smith RG. (1986) Rat Sertoli cells secrete a growth factor that blocks epidermal growth factor (EGF) binding to its receptor. *J Biol Chem* 261: 4076-4080.
- Hölttä E, Pohjanpelto P. (1986) Control of ornithine decarboxylase in Chinese hamster ovary cells by polyamines. *J. Biol. Chem.* 261: 9502-9508.
- Hölttä E, Pulkkinen P, Elfving K, Jänne J. (1975) Oxidation of polyamines by diamine oxidase from human seminal plasma. *Biochem. J.* 145: 373-378.
- Holz GG, Rane SG, Dunlap K.. (1986) GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature (London)* 319: 670-672.
- Holloway CD, Kenyon CJ, Dowie LJ, Comie JET, Gray CE, Fraser R. (1989) Effect of the benzodiazepines diazepam, des-*n*-methyldiazepam and midazolam on corticosteroid biosynthesis in bovine adrenocortical cells *in vitro*; location of site of action. *J. Steroid Biochem.* 33: 219-225.
- Hotten GH, Neidhardt C, Schneider C, Pohl J. (1995) Cloning of a new member of the TGF- β family: a putative new activin β _C chain. *Biochem Biophys Res Commun* 206: (2) 608-613.

- Hsueh AJW, Dahl KD, Vaughan J, Tucker E, Rivier J, Bardin CW, Vale WW. (1987) Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proc.Natl.Acd.Sci USA* 84: 5082-5086.
- Humphrey PPA. (1984) Peripheral 5-hydroxytryptamine receptors and their classification. *Neuropharmacology* 23: 1503-1506.
- Hutaniemi I, Nikula H, Lehtonen E, Hovatta O. (1986) Testicular morphology an endocrine function after silica-induced damage of interstitial macrophages. *En: Molecular and Cellular Endocrinology of the testis*. Stefanini M, Conti M, Geremia R, Ziparo E (Eds), Elsevier: Amsterdam pp 57-62.
- Inano H, Hori Y, Tamaoki B. (1967) Effect of age on testicular enzymes related to steroid bioconversion. *En: Endocrinology of the Testis*, Wolstenholme GEW, O'Connor M (Eds), Boston:Little, Brown, 105-119.
- Ireland ME, Rosenblum BB, Welsh MJ. (1986) Two-dimensional gel analysis of Sertoli cell protein phosphorylation: effect of short term exposure to follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 118: 526-532.
- Jänne J, Schenone A, Williams-Ashman HG. (1971) Separation of two proteins required to synthesis of spermidine from S-adenosyl-L-methionine and putrescine in rat prostate. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 42: 758-764.
- Jänne J, Williams-Ashman HG. (1971) On the purification and properties of L-ornithine decarboxylase from rat prostate and effects of thiol compounds on the enzyme. *J.Biol.Chem.* 246: 1725-1732.
- Johnson L, Bartke A. (1991) Effect of photoperiod on the rate of ³H-thymidine incorporation of epididymal principal cells in adult Syrian hamsters. *The Journal of experimental zoology* 258:89-94.
- Johnson L, Matt KS, Bartke A, Nguyen HB, Le HT. (1987) Effect of photoperiod on the size of the Leydig cells in adult Syrian hamsters. *Biol. Reprod.* 37: 727-738.
- Judd HL. (1979) Biorhythms of gonadotropins and testicular hormone secretion *En: Endocrine Rhythms*, Krieger DT (Ed), Raven Press, New York, 299-321.
- Juniewicz PE, Johnson BH. (1981) Influence of adrenal steroid upon testosterone secretion by the boar testis. *Biol.Reprod.* 25: 725-729.
- Juniewicz PE, Johnson BH. (1983) Phenotypic variation in testosterone and luteinizing hormone production among boars: differential response to gonadotropin releasing hormone and adrenocorticotrophic hormone. *Biol. Reprod.* 29: 464-469.
- Kaipia A, Parvinen M, Toppari J. (1993) Localization of activin receptor (ActR-IIB₂) mRNA in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 132: 477-479.
- Kaipia A, Penttilä T-L, Shimasaki S, Ling N, Parvinen M, Toppari J. (1992) Expression of inhibin β_A and β_B , follistatin and activin-A receptor messenger ribonucleic acids in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 131: 2703-2710.
- Kaipia A, Toppari J, Huhtaniemi I, Paranko J. (1994) Sex difference in the action of activin-A on cell proliferation of differentiating rat gonad. *Endocrinology* 134: 2165-2170.
- Kaipia A., Toppari J, Kangasniemi M, Accivara AA, Hecht NB, Parvinen M. (1990) Stage- and cell-specific expression of the ornithine decarboxylase gene during rat and mouse spermatogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol* 73: 45-52.
- Kalla NR.(1979) Demonstration of direct effect of serotonin on rat Leydig cells. *Andrologia* 11: 259-263.
- Kammer IA, Mical RS, Porter JC. (1971) Effects of melatonin and serotonin on the release of FSH and prolactin. *Endocrinology* 88: 1288-1294.
- Kameji T, Hayashi S, Hoshino K, Kakinuma Y, Igarashi K. (1993) Multiple regulation of ornithine decarboxylase in enzyme-overproducing cells. *Biochem J.* 289: 581-586.
- Kasson BG, Hsueh AWJ. (1985) Nicotinic cholinergic agonists inhibit androgen biosynthesis by cultured rat testicular cells. *Endocrinology* 117: 1874-1880.
- Kasson BG, Lim P, Hsueh AWJ. (1986) Vasoactive intestinal peptide stimulates androgen biosynthesis by cultured neonatal testicular cells. *Mol Cell Endocrinol* 48: 21-29.

- Kerr DIB, Ong J, Johnston GAR, Abbenante J, Prager RH. (1988) 2-hydroxy-saclofen: an improved antagonist at central and peripheral GABA_B receptors. *Neuroscience Letters* 92: 92-96.
- Kerr, DIB, Ong J, Prager RH, Gynther BD, Curtis DR. (1987) Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. *Brain Research* 405: 150-153.
- Khan SA, Hallin P, Bartlett J, DeGeyter Ch, Nieschlag E. (1988) Characterization of a factor from human ovarian follicular fluid which stimulates Leydig cell testosterone production. *Acta Endocrinol.* 118: 283-293.
- Khan SA, Keck C, Nieschlag E. (1991) Stimulation of Leydig cell steroidogenesis by a factor from human ovarian follicular fluid. *En: Scientific basis of fertility regulation: growth factors in fertility regulation.* Haseltine FP, Findlay JK. (Eds), New York: Cambridge Univ. Press, 185-193.
- Khan SA, Khan SJ, Dorrington JH. (1992a) Interleukin-1 stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in immature rat Leydig cells *in vitro*. *Endocrinology* 131: 1853-1857
- Khan SA, Teerds K, Dorrington JH. (1992b) Growth factor requirements for DNA synthesis by Leydig cells from the immature rat. *Biol Reprod* 46: 335-341
- Kierzenbaum AL, Spruill WA, White MG, Tres LL, Perkins JP. (1985) Rat Sertoli cell acquire a β -adrenergic response during primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2049-2054.
- King AB, Langworthy OR. (1940) Effects of denervation on testicular morphology in cats. *J. Urol.* 44: 74-80.
- Kirby JD, Jetton AE, Ackland JF, Turek FW, Schwartz NB. (1993) Changes in serum immunoreactive inhibin α during photoperiod-induced testicular regression and recrudescence in the golden hamster. *Biol Reprod* 49: 483-488.
- Kitamura Y, Yokoyama M, Matsuda H, Ohno T, Mori KJ. (1981) Spleen colony-forming cells as common precursor for tissue mast cells and granulocytes. *Nature* 291: 159-160.
- Kitamura Y. (1989) Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulation. *Ann Rev Immunol* 7: 59-76.
- Klemcke HG, Bartke A, Borer KT, Hogan MP. (1984) Regulation of testicular prolactin and luteinizing hormone receptors in golden hamster. *Endocrinology* 114: 594-603.
- Klemcke HG, Bartke A, Goldman BD. (1981) Plasma prolactin concentrations and testicular human gonadotropin binding sites during short photoperiod-induced testicular regression and recrudescence in the golden hamster. *Biol. Reprod.* 25: 536-548.
- Klemcke HG, Vansickle M, Bartke A, Amador AG, Chandrashekar V. (1987) Effects of photoperiod, hypophysectomy, and follicle-stimulating hormone on testicular follicle-stimulating hormone binding sites in golden hamsters. *Biol. Reprod.* 37: 356-370.
- Kliesch S, Schweifer B, Niklowitz P, Nieschlag E, Bergmann M. (1991) The influence of LH and/or FSH on Leydig and Sertoli cell morphology after testicular involution in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) induced by hypophysectomy or short photoperiods. *Andrologia* 23: 99-107.
- Knigge KM, Silverman A-J. (1974) Anatomy of the endocrine hypothalamus. *En: Handbook of physiology. The pituitary gland and its neuroendocrine control.* Greep RO, Astwood ED (Eds.). Washington DC: American Physiology Society, section 7, vol IV, 1-47.
- Knotts LK, Glass JD. (1988) Effects of photoperiod, betaendorphin, and naloxone on *in vitro* secretion of testosterone in white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) testes. *Biol Reprod* 39: 205-212.
- 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: 79-84.
- Kops SK, Theoharides TC, Cronin CT, Kashgarian MG, Askenase PW. (1990) Ultrastructural characteristics of rat peritoneal mast cells undergoing differential release of serotonin without histamine and without degranulation. *Cell and Tissue Research* 262: 415-424.
- Kormano M, Penttillä A. (1968) Distribution of endogenous and administered 5-hydroxytryptamine in the rat testis and epididymis. *Ann. Med. Exp. Fenn.* 46: 468-472.
- Kormano M. (1967) An angiographic study of the testicular vasculature in the postnatal rat. *Z. Anat. Entwickl. Gesch.* 126: 138-153

- Kramer DL, Khomutov RM, Bukin YV, Khomutov AR, Porter CW. (1989) Cellular characterization of a new irreversible inhibitor of S-adenosyl-methionine decarboxylase and its use in determining the relative abilities of individual polyamines to sustain growth and viability of L1210 cells. *Biochem J.* 259: 325-331.
- Kramer DL, Miller JT, Bergeron RJ, Khomutov A, Porter CW. (1993) Regulation of polyamine transport by polyamine and polyamine analogs. *J. Cell. Physiol.* 155: 399-407.
- Krogsgaard-Larsen P. (1981) γ -aminobutyric acid agonists, antagonists, and uptake inhibitors. Design and therapeutic aspects. *J. Medicinal Chemistry* 24 (12): 1377-1383.
- Krueger KE, Papadopoulos V. (1992) Mitochondrial benzodiazepine receptors and the regulation of steroid biosynthesis. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 211-237.
- Krulich L, McCann SM, Mayfield MA (1981) On the mode of the prolactin release-inhibiting action of the serotonin receptor blockers metergoline, methysergide, and cyproheptadine. *Endocrinology* 108 (4): 1115-1124.
- Krummen LA, Moore A, Woodruff TK, Covello R, Taylor R, Working P, Mather JP. (1994) Localization of inhibin and activin binding sites in the testis during development by *in situ* ligand binding. *Biol Reprod* 50: 734-744
- Kruseman ACN, Linton EA, Lowry PJ, Rees LH, Besser GM. (1982) Corticotropin-releasing factor immunoreactivity in human gastrointestinal tract. *Lancet* 2: 1245-1246.
- Kumar N, Didolkar AK, Monder C, Bardin CW, Sundaram K. (1992) The biological activity of 7 α -methyl-19-nortestosterone is not amplified in male reproductive tract as is that of testosterone. *Endocrinology* 130: 3677-3683.
- Kuntz A. (1919) Experimental degeneration in the testis of the dog. *Anat. Rec.* 17: 221-225.
- Kus L, Handa RJ, McNulty JA. (1993) Characterization of a [3 H] glutamate binding site in rat pineal gland: Enhanced affinity following superior cervical ganglionectomy. *J Pineal Res* 14: 39-44.
- Kvidera MD, Carey GB. (1994) Glutamine synthetase activity in rat epididymis. *Proceeding Society for Experimental Biology and Medicine* 206: 360-364.
- Kwan TK, Pertiwi AKD, Taylor NF, Gower DB. (1988) Steroid profiling in the study of rat testicular steroidogenesis. *Biochim Biophys Acta* 962: 214-219.
- Labarca C, Paigen K. (1980) A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Analyt. Biochem.* 102: 344-352.
- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J. (1992) AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9: 247-258.
- Lau YF, Li CH. (1987) Localization of alpha-inhibin-31 in rodent testis and brain by immunocytochemical procedure and Western blot analysis. *Biochem Biophys Res Comm* 145: 818-819.
- Le Blond CP, Clermont Y. (1952) Definition of stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat. *Ann NY Acad Sci* 55: 548-550.
- Le Magueresse-Battistoni B, Morera A-M, Goddard I, Benahmed M. (1995) Expression of mRNAs for transforming growth factor- β receptors in the rat testis. *Endocrinology* 136: 2788-2791.
- Le Magueresse-Battistoni B, Wolff J, Morera A-M, Benahmed M. (1994) Fibroblast growth factor receptor type 1 expression during rat testicular development and its regulation in cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 135: 2404-2411.
- Leader A, Minuk G, Mortimer D. (1992) Seminal plasma gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in normospermic men. *Clin Invest Med* 15: 346-348.
- Lee W, Schawall R, Mason AJ, Mather JP. (1988) Interstitial cell cultures secrete an activity with characteristics of the inhibin β - β homodimer, activin. *En: The molecular and cellular endocrinology of the testis.* Cooke BA, Sharpe RM (Eds), Serono Symposium, Raven Press, New York, vol 50, 21-25.
- Lefebvre H, Contesse V, Delarue C. (1992) Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin 4 receptor subtype. *Neurosci* 47: 999-1007.

- Legan SJ, Karsh FJ, Foster DL (1977) The endocrine control of seasonal reproductive function in the ewe: a marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 101: 818-824.
- Lerchl A, Nieschlag E. (1992) Interruption of nocturnal pineal melatonin synthesis in spontaneous recrudescant Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J. Pineal Res* 13: 36-41.
- Lerchl A, Nieschlag E. (1995) Diurnal variations of serum and testicular testosterone and dihydrotestosterone (DHT) in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*): testes are the main source for circulating DHT. *General and Comparative Endocrinology* 98:129-136.
- Levey HA, Szego CM. (1955) Metabolic characteristics of the guinea pig seminal vesicle. *Am.J.Physiol.* 182: 507-512.
- Levin J, Lloyd CW, Lobotsky J, Friedrich EH. (1967) The effect of epinefrine on testosterone production. *Acta Endocr (Copenh)* 55: 184-192.
- 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, 189-236.
- Lincoln GA, McNeilly AS (1989) Inhibin concentrations in the peripheral blood of rams during a cycle in testicular activity induced by changes in photoperiod or treatment with melatonin. *J Endocrinol* 120: R9-R13.
- Lincoln GA. (1981) Seasonal aspects of testicular function. *En: The Testis.* Burger H, de Krester D (Eds), Raven Press, New York, 255-302.
- Ling N, Yng S-Y, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R. (1986) Pituitary FSH is released by the heterodimer of the β -subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321: 779-782.
- Liptrap RM, Raeside JI. (1975) Increase in plasma testosterone concentration after injection of adrenocorticotropin into the boar. *J.Endocr* 66: 123-128.
- Liu Ch, Kinson GA. (1973) Testicular gametogenic and endocrine responses to melatonin and serotonin peripherally administered to mature rats. *Contraception* 7: 153-159.
- Liu Q-R, Lopez-Corcuera B, Mandiyan S, Nelson H., Nelson N. (1993) Molecular characterization of four pharmacologically distinct γ -aminobutyric acid transporters in mouse brain. *J. Biochem.* 268: 2106-2112.
- Loewy AD. (1990) Anatomy of the autonomic nervous system: An overview. *En: Central regulation of autonomic functions.* Loewy A.D, Spyer KM (Eds), Oxford University Press, New York, 3-25.
- Lombard-des Gouttes MN, Falck B, Owman Ch, Rosengren E, Sjoberg NO, Walles B. (1974) On the content and distribution of amines in the testis during development. *Endocrinology* 95: 1746-1749.
- Loosfelt H, Misrahi M, Atger M, Salesse R, Thi MTVH-L, Jolivet A, Guiochon-Mantel A, Sar S, Jallal B, Gamier J, Milgrom E. (1989) Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor DNA: variants lacking transmembrane domain. *Science* 245: 525-528.
- Lorand L, Conrad SM. (1984) Transglutaminases. *Mol. Cell. Biochem.* 58: 9-35.
- Louzan P, Gallardo MGP, Tramezzani JH. (1986) Change of GABA content in the female rat genital tract. *En: GABA and Endocrine Function.* Racagni G, Donoso AO (Eds), Raven Press, New York, 283-290.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lubicz-Nawrocki CM. (1974) The inhibition of fertilizing ability of epididymal spermatozoa by the administration of oestradiol benzoate to testosterone-maintained hypophysectomized or castrated hamsters. *J Endocrinol* 61: 133-138.
- Lukasiewicz PD, Maple BR, Werblin FS (1994) A novel GABA receptor on bipolar cell terminals in the tiger salamander retina. *J Neurosci* 14: 1202-1212.
- Luke MC, Coffey DS. (1994) The male sex accessory tissues: structure, androgen action, and physiology. *En: The Physiology of Reproduction.* Knobil E, Neill JD (Eds) Raven Press, New York, vol 1, cap 18,1435-1488.
- Lundmo PI, Sunde A, Tueter KJ. (1985) Metabolism of androgens in the seminal vesicles and the different lobes of the prostate in young mature rats. *J.Steroid Biochem.* 22: 513-519.

- Luu-The V, Labrie C, Simard J, Lachance Y, Zhao HF, Couet J, Leblanc G, Labrie F. (1990) Structure of two in tandem human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase genes. *Mol Endocrinol* 4: 268-275.
- Macdonald R.L., Olsen R. W. (1994) GABA_A receptor channels *Annu.Rev.Neurosci.* 17: 569-602.
- MacKinnon PCB, Mattock JM, Ter Haar MB. (1976) Serum gonadotropin levels during development in male, female and androgenized female rats and the effect of general disturbance on high luteinizing hormone levels. *J Endocrinol* 70: 361-371.
- Maddocks S, Sharpe RM. (1989) Assessment of the contribution of Leydig cells to the secretion on inhibin by the rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 67: 113-118.
- Madhubala R, Reddy PRK . (1981) Effect of catecholamines on ornithine decarboxylase activity in the testis of immature rats. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 102: 1096-1103.
- Madhubala R, Reddy PRK. (1980) Stimulation of ornithine decarboxylase activity by prostaglandins in the isolated cells of immature rat testis. *FEBS.Lett.* 122: 197-198.
- Madhubala R, Reddy PRK. (1983) Inhibition of epinephrine and gonadotropic hormone induced ornithine decarboxylase activity by phenoxybenzamine in the testis of immature rats. *FEBS Lett.* 152: 199-201.
- Madhubala R, Shubdhada S, Steinberger A, Tsai YH. (1987) Inhibition of ornithine decarboxylase activity by follicle stimulating hormone in primary culture of rat Sertoli. *J. Androl.* 8: 383-387.
- Mann T. (1964) The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. *Methuen. London* 194-200.
- Mann T. (1974) Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *J.Reprod.Fert.* 37: 179-188.
- Marconi P. (1923) Atropie testiculaire par lesions nerveuses. *C.R. Soc. Biol.* 88: 356-358.
- Marcote MJ, Gonzales-Bossch C, Miralles VJ, Hernandez-Yago J, Grisolia S. (1989) Polyamines are sufficient to drive the transport of the precursor of ornithine carbamoyltransferase into rat liver mitochondria: Possible effect on mitochondrial membranes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 158: 287-293.
- Mariotti A, Mawhinney M. (1982) The hormonal maintenance and restoration of guinea pig seminal vesicle fibromuscular stroma. *J.Urol.* 128: 852-857.
- 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, 73-88.
- Martini L. (1982) The 5 α -reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. Biochemical and physiological implications. *Endocrine Reviews* 3: 1-25.
- Marton LJ, Morris DR. (1987) Molecular and cellular functions of the polyamines. *En: Inhibition of Polyamine Metabolism.* Mc Cann PP, Pegg AE, Sjoerdsma A (Eds). Academic Press, 79-105.
- Mason AJ, Hayflick JS, Ling N, Esch F, Ueno N, Ying S-Y, Guillemin R, Niall H, Seeburg PH. (1985) Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor-b. *Nature* 318: 659-663.
- Mastorakos G, Kokia E, Patchev V, Webster EL, Redwine J, Adashi EY, Chrousos GP. (1992) Presence of immunoreactive CRH and CRH binding sites, and evidence for auto/paracrine action of this neuropeptide in the rat ovary. *Endocrinology* 130: 6A, 778.
- Mather JP, Attie KM, Woodruff T, Rice GC, Phillips DM. (1990) Activin stimulates spermatogonial proliferation in Germ-Sertoli cell co-cultures from immature rat. *Endocrinology* 127: 3206-3214.
- Mather JP, Krummen LA. (1992) Inhibin, activin and growth factors: paracrine regulators of testicular function. *En: Spermatogenesis-Fertilization-Contraception: Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction.* Nieschlag E, Habenicht U-F, Nieschlag S (Eds). Springer-Verlag: Berlin, 169-200.
- Matt KS, Stetson MH. (1979) Hypothalamic-pituitary-gonadal interactions during spontaneous testicular recrudescence in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Biol. Reprod.* 20: 739-746.

- Maudit C, Chauvin A, de Peretti E, Morera AM, Benahmed M. (1991) Effect of activin A on dehydroepiandrosterone and testosterone secretion by primary immature porcine Leydig cells. *Biol Reprod* 45: 101-109.
- Mayerhofer A, Bartke A, Amador AG, Began T. (1989b) Histamine affects testicular steroid production in the golden hamster. *Endocrinology* 125: 2212-2214.
- Mayerhofer A, Bartke A, Began T. (1993) Catecholamines stimulate testicular steroidogenesis *in vitro* in the Siberian hamster, *Phodopus sungorus*. *Biol. Reprod.* 48: 883-888.
- Mayerhofer A, Bartke A, Steger RW. (1989c) Catecholamine effects on testicular testosterone production in the gonadally active and the gonadally regressed adult golden hamster. *Biol. Reprod.* 40: 752-761.
- Mayerhofer A, Calandra RS, Bartke A. (1991) Cyclic adenosine monophosphate (c-AMP) does not mediate the stimulatory action of norepinephrine on testosterone production in the testis of the golden hamster. *Life Sciences* 48: 1109-1114.
- Mayerhofer A, Sinha Hikim AP, Bartke A, Russell LD. (1989a) Changes in the testicular microvasculature during photoperiod-related seasonal transition from reproductive quiescence to reproductive activity in the adult golden hamster. *The Anatomical Record* 224: 495-507.
- Mayerhofer A. (1996) Leydig cell regulation by catecholamines and neuroendocrine messengers. *En: The Leydig cell*. Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Eds), Cache River Press, Vienna, IL, 407-417.
- Mayerhofer A., Bartke A, Steger RS, Gow G. (1992) Catecholamines stimulate testicular testosterone release in the immature golden hamster via interaction with testicular alpha- and beta-adrenergic receptors. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 127: 526-530.
- McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Rosembly N, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH. (1989) Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 245: 494-499.
- McKernan RM, Whiting PJ. (1996) Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain?. *Trends Neurosci* 19 (4): 139-143.
- Means AR, Dedman JR, Tash JS, Tindall DJ, van Sickle M, Welsh MJ. (1980) Regulation of the testis Sertoli cell by follicle-stimulating hormone. *Annu Rev Physiol* 42: 59-70.
- Mendez JD. (1989) Polyamines and human reproduction. *En: The physiology polyamines*. Bachrach U, Heimer YM (Eds), CRC Press, Inc. Boca Raton, FL. USA, cap II, vol 1, 24-38.
- Mertz LM, Pedersen RC. (1989) Steroidogenesis activator polypeptide may be a product of glucose regulated protein 78 (GRP78). *Endocrine Res.* 15: 101-115.
- Milette JJ, Schwartz NB, Turek FW. (1988) The importance of follicle-stimulating hormone in the initiation of testicular growth in photoestimatized Djungarian hamsters. *Endocrinology* 122: 1060-1066.
- Minuk GY, Maccannell KL. (1988) Is the hypotension of cirrhosis a GABA-mediated process?. *Hepatology* 8: 73-77.
- Mitchell JLA, Mahan DW, McCann PP, Qasba P. (1985) Dicyclohexylamine effects on HTC cells polyamine content and ornithine decarboxylase activity. *Biochem. Biophys. Acta* 840: 309-316.
- Miyake K, 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: 79-87.
- Moger WH, Anakwe OO. (1986) Propanolol inhibits the compensatory increase in androgen secretion after unilateral orchidectomy on rats. *J. Reprod. Fertil.* 76: 251-255.
- Moger WH, Murphy PR, Casper RF. (1982) Catecholamine stimulation of androgen production by mouse interstitial cells in primary cultures. *J. Androl.* 3: 227-231.
- Moger WH, Murphy PR. (1983) β -adrenergic agonist induced androgen production during primary culture of mouse Leydig cells. *Arch. Androl.* 10: 135-138.
- Mogler R. (1958) Das endokrine System des Syrischen Goldhamsters unter Berücksichtigung des natürlichen Winterschlafs. *Z Morph Oekol Tiere* 47: 267-308.
- Moguilevsky JA, Faigon MR, Scacchi P, Szwarcfarb B. (1985) Effect of the serotonergic system on luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats *Neuroendocrinology* 40: 135-138.

- Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. (1987) Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 8: 1-27.
- Morera AM, Cochet C, Keramidas M, Chauvin MA, De Perette E, Benahmed M. (1988) Direct regulating effects of transforming growth factor- β on Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *J. Steroid Biochem* 30: 443-447.
- Morgan DML. (1981) Polymine oxidases and oxidized polyamines. *En: The physiology of polyamines*. Bachrach U, Heimer YM (Eds), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, vol. 1, 203-229.
- Morgan DML. (1985) Polyamine oxidases. *Biochem. Soc. Trans.* 13: 322-326.
- Morin LP, Fitzgerald KM, Rusak B, Zucker I. (1977) Circadian organization and neural mediation of hamster reproductive rhythms. *Psychoneuroendocrinology* 2: 73-98.
- Morris PL, Cheng CY, Bardin CW. (1987) Identification of prolactin-responsiveness proteins in Leydig cell-enriched media. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 513: 390-392.
- Müller EE, Cocchi D, Villa A, Zanbotti F, Fraschini F. (1972) Involvement of brain catecholamines in the gonadotropin-releasing mechanism(s) before puberty. *Endocrinology* 90: 1267-1276.
- Murakami Y, Fujita K, Kameji T, Hayashi S. (1985) Accumulation of ornithine decarboxylase antizyme complex in HMO cells. *Biochem. J.* 225: 689-697.
- Murakami Y, Hayashi S. (1985) Role of antyzyme in degradation of ornithine decarboxylase in HTC cells. *Biochem. J.* 226: 893-896.
- Murashima YL, Kato T. (1986) Distribution of γ -aminobutyric acid and glutamate decarboxylase in the layers of rat oviduct. *J Neurochem* 46: 166-172.
- Muroso EP, Washburn AL. (1989) 5α -reductase activity regulates testosterone accumulation in two bands of immature cultured cells isolated on Percoll density gradients. *Acta Endocrinol.* 121: 538-544.
- Murphy MR. (1985) History of the capture and domestication of the Syrian Golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse). *En: The Hamster*. Spiegel HI (Ed), Plenum. Publ. Corp., 3-20.
- 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: 592-599.
- Naghshineh S, Treadwell CR, Gallo LH, Vahourmy GV. (1978) Protein kinase mediated phosphorylation of purified ester hydrolase from bovine adrenal cortex. *J. Lipid Res.* 19: 561-567.
- Nakayasu H, Nishikawa M, Mizutani H, Kimura H, Kuriyama K. (1993) Immunoaffinity purification and characterization of γ -aminobutyric acid (GABA_B) receptor from bovine cerebral cortex. *J Biol Chem* 268:8658-8664.
- Nakhla AM, Tam JP. (1985) Transforming growth factor is a potent stimulator of testicular ornithine decarboxylase in immature mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132: 1180-1186.
- Naumenko EV. (1985) Role of catecholamines and serotonin in the control of the hypothalamic-pituitary-testicular complex-A review. *Biogenic Amines* 2 (3): 173-190.
- Nazian SJ, Mahesh VB. (1979) Sexual maturation of the male rat. Influence of androgens on the pituitary response to single or multiple injections of LHRH. *Neuroendocrinology* 29: 313-322.
- Negro-Vilar A, Krulich L, McCann SM. (1973a) Changes in serum prolactin and gonadotropins during sexual development of the male rat. *Endocrinology* 93: 660-664.
- Negro-Vilar A, Ojeda SR, Mc Cann SM. (1973b) Evidences for changes in sensitivity to testosterone negative feedback on gonadotropin release during sexual development in the male rat. *Endocrinology* 93: 729-735.
- Newberry NR, Nicoll RA. (1984) Direct hyperpolarizing action of baclofen on hippocampal pyramidal cells. *Nature* 308: 450-452.
- Nicchitta CV, Williamson JR. (1984) Spermine. A regulator of mitochondrial calcium cycling. *J. Biol. Chem.* 259: 12978-12983.
- Nicoll KM, McLean M, Wallace HM. (1994) Uptake of putrescine by human breast cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 395s-397s.
- Nicholson HD, Guldenaar SEF, Boer GJ, Pickering BT. (1991) Testicular oxytocin: effects of intratesticular oxytocin in the rat. *J Endocrinol* 130: 231-238.
- Nicholson HD, Hardy MD. (1992) Luteinizing hormone differentially regulates the secretion of testicular oxytocin and testosterone by purified rat Leydig cells *in vitro*. *Endocrinology* 130: 671-677.

- Niemi M, Sharpe RM, Brown WRA. (1986) Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell. Tiss. Res.* 243: 337-340.
- Niklowitz P, De Geyter M, Schlatt S, Hoffmann K, Nieschlag E. (1992) Pattern of pineal melatonin concentrations during prolonged exposure to short photoperiods in photosensitive and photoinensitive Djungarian hamsters. *J Pineal Res* 12: 64-70.
- Niklowitz P, Hoffmann K. (1988) Pineal and pituitary involvement in the photoperiodic regulation of body weight, coat color and testicular size of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Biology of Reproduction* 39: 489-498.
- Nishikawa M, Kuriyama K. (1989) Functional coupling of cerebral γ -aminobutyric acid (GABA_B) receptor with adenylate cyclase: Effect of phaclofen. *Neurochem Int* 14:85-90.
- Nistal M, Paniagua R, Asunción-Abaurrea M. (1982) Varicose axons bearing "synaptic" vesicles on the basal lamina of the human seminiferous tubules *Cell. Tiss. Res.* 226: 75-82.
- Nistal M, Santamaria L, Paniagua R. (1984) Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood. *Acta Anat* 119: 155-160.
- 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: 278-282.
- Norberg KA, Risley PL, Ungerstedt U. (1967b) Adrenergic innervation of the male reproductive ducts in some mammals. Effects of vasectomy and castration. *Experientia* 23: 392-396.
- Norvitch ME, Harvey S, Smith S, Hagstrom JE, Wieben ED. (1989) Androgens affect the processing of secretory protein precursors in the guinea-pig seminal vesicle. I. Evidence for androgen-regulated proteolytic processing. *Molecular Endocrinology* 3: 1788-1796.
- Oda S, Nishimatsu S-I, Murakami K, Ueno N. (1995) Molecular cloning and functional analysis of a new activin β subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in *Xenopus*. *Biochem Biophys Res Commun* 210: 581-588.
- Ogawa K, Kurohmaru K, Shiota K, Takahashi M, Nishida T, Hayashi Y. (1991) Histochemical localization of inhibin and activin α , β_A and β_B sub-units in rat gonads. *J Vet. Med Sci* 53: 207-212.
- Ohata M. (1979) Electron microscopic study on the testicular interstitial cells of the mouse. *Arch Histol Japan* 42: 51-79.
- Ohmori Y, Hirouchi M, Taguchi J, Kuriyama K. (1990) Functional coupling of the γ -aminobutyric acid_B receptor with calcium ion channel and GTP-binding protein and its alteration following solubilization of the γ -aminobutyric acid_B receptor. *J Neurochem* 54: 80-85.
- Ojeda S.R., Urbanski H.F. (1994) Puberty in the rat *En: The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (Eds). Raven Press, New York, vol 2, cap 40, 363-410.
- Oka T, Perry JW, Takemoto T, Sakai T, Terada N, Inoue H. (1981) The multiple regulatory roles of polyamines in the hormonal induction of mammary gland development. *En: Advances polyamine research*. Caldarera CM, Zappia V, Bachrach U (Eds), Raven Press, New York, vol 3, 309-320.
- Okkels H, Sand K. (1940) Morphological relationship between testicular nerves and Leydig cells in man. *J Endocrinol* 2: 38-46.
- Okuda Y, Sun XR, Morris PL. (1994) Interleukin-6 (IL-6) mRNAs expressed in Leydig and Sertoli cells are regulated by citokines, gonadotropins and neuropeptides. *Endocrine* 2:617-624.
- Ondo JG, Pass KA, Baldwin R. (1976) The effects of neurally active amino acids on pituitary gonadotropin secretion. *Neuroendocrinology* 21: 79-87.
- Ong J, Hamison NL, Hall RG, Barker JL, Johnston GAR, Kerr DIB. (1990) 3-amino propanephosphinic acid is a potent agonist at peripheral and central presynaptic GABA_B receptors. *Brain Res* 526: 138-142.
- Orava M. (1989) Comparison of the inhibitory effects of Interferons- α and - γ on testosterone production in porcine Leydig cell culture. *J Interferon Res* 9: 135-141.
- Orgebin-Crist MC, Olson GE, Danzo BJ. (1981) Factors influencing maturation of spermatozoa in the epididymis. *En: Intra-gonadal regulation of reproduction* Franchimont P, Channing CP (Eds), Academic Press, New York, 393-417.
- Orth JM. (1982) Proliferation in Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec* 203: 485-492.

- Oshima H., Ochi AL. (1973) On testicular 17 β -hydroxysteroid oxidoreductase: product activation. *Biochim.Biophys.Acta*, 306: 227-231.
- Osterman J, Muromo EP, Lin T, Nankin HR. (1983) Regulation of testicular ornithine decarboxylase *in vitro*. *J.Androl.* 4: 175-182.
- Ostrowski MC, Kistler MK, Kistler WS (1982) Effect of castration on the synthesis of seminal vesicle secretory protein IV in the rat. *Biochemistry* 21: 3525-3529.
- Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE, Costa E, Guidotti A. (1991a) Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. *Endocrinology* 129: 1481-1488.
- Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE. (1991b) The role of diazepam binding inhibitor and its processing products at mitochondrial benzodiazepine receptors: regulation of steroid biosynthesis. *Neuropharmacol.* 30: 1417-1423.
- Papadopoulos V. (1993) Peripheral-type benzo-diazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr. Rev.* 14: 222-240.
- Papadopoulos V., Boujrad N., Ikonovic M.D., Ferrara F., Vidic B. (1994) Topography of the Leydig cell mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 104: R5-R9.
- Parmetier M, Inagami T, Pochet R, Desclin JC. (1983) Pituitary-dependent renin-like immunoreactivity in the rat testis. *Endocrinology* 112: 1318-1322.
- Parvinen M, Vihko KK, Toppari J. (1986) Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. *Int Rev Cytol* 104: 115-151.
- Pedersen RC, Brownie AC. (1983) Cholesterol side-chain cleavage in the rat adrenal cortex: Isolation of a cycloheximide-sensitive activator peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1882-1886.
- Pedersen RC. (1984) Polypeptide activators of cholesterol side-chain cleavage. *Endocrine Res.* 10: 533-561.
- Pedersen RC. (1987) Steroidogenesis activator polypeptide (SAP) in the rat ovary and testis. *J. Steroid Biochem.* 27: 731-735.
- Pegg AE, Lockwood DH, Williams-Ashman HG. (1970) Concentrations of putrescine and polyamines and their enzymic synthesis during androgen-induced prostatic growth. *Biochem J.* 117: 17-31.
- Pegg AE, Mc Cann PP. (1982) Polyamine metabolism and function. *Am.J.Physiol* 243: c212-c221.
- Pegg AE, Williams-Ashman HG. (1968) Stimulation of the decarboxylation of S-adenosylmethionine by putrescine in mammalian tissues. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 30: 76-82.
- Pegg AE. (1974) Purification of rat liver S-adenosyl-L-methionine decarboxylase. *Biochem.J.* 141: 581-583.
- Pegg AE. (1986) Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 234: 249-262.
- Pegg AE. (1988) Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res.* 48: 759-774.
- Peltoketo H, Isomaa V, Vihko R. (1992) Genomic organisation and DNA sequences of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase genes and flanking regions. Localization of multiple Alu sequences and putative cis-acting elements. *Europ J Biochem* 209: 459-466.
- Peng WW, Wisner JR Jr, Warren DW. (1979) Testicular 3 α -hydroxy-steroid oxidoreductase in the developing male rat. *Steroids* 34: 101-110.
- Peroutka SJ, Snyder SH. (1979) Multiple serotonin receptors: differential binding of [3 H] 5-hydroxytryptamine, [3 H] lysergic acid diethylamide and [3 H]spiroperidol. *Molec. Pharmacol.* 16: 687-699.
- Perry TL, Hansen S (1973) Sustained drunk-induced elevation of brain GABA in the rat. *J. Neurochem* 21: 1167-1175.
- Persson H, Peltö-Huikko M, Metsis M, Söder O, Brené S, Skog S, Hökfelt T, Ritzén EM. (1990) Expression of the neurotransmitter-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase in male germ cells. *Mol and Cell Biol* 10: 4701-4711.
- Petraglia F, Sawchenko PE, Rivier J, Vale W. (1987) Evidence for local stimulation of ACTH secretion by corticotropin-releasing factor in human placenta. *Nature (London)* 328: 717-719

- Petrusz P, Merchenthaler I. (1992) The corticotropin-releasing factor system. *En: Neuroendocrinology*. Nemeroff CB (Ed), CRC Press, Boca Ratón, Florida, 129-183.
- Pfeifer SM, Furth EE, Ohba T, Chang YJ, Rennert H, Sakuragi N, Billheimer JT, Strauss III JF. (1993) Sterol carrier protein 2: a role in steroid hormone synthesis? *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 47: 167-172.
- Pickard GE, Silverman AJ. (1979) Effects of photoperiod on hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone in the male hamster. *J Endocrinol* 83: 421-428.
- Piik K, Rajamaki P, Guha SK, Jänne J. (1977) Regulation of L-ornithine decarboxylase in rat ventral prostate and seminal vesicle. *Biochem.J.* 168: 379-385.
- Pilz RB, Steglich C, Scheffler IE. (1990) Molecular and genetic characterization of an ornithine decarboxylase-deficient Chinese hamster cell line. *J. Biol Chem.* 265: 8880-8886.
- Pinho MS, Mata LR. (1992) Castration-resistant secretion in the hamster seminal vesicle does not depend on androgens. *International Journal of Andrology* 15: 435-447.
- Podestá 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: 109-114.
- Pollanen P, von Euler M, Söder O. (1990) Testicular immunoregulatory factors. *J.Reprod Immunol* 18: 51-76.
- Pon LA, Epstein LF, Orme-Johnson NR. (1986) Acute cAMP stimulation in Leydig cells: rapid accumulation of a protein similar to that detected in adrenal cortex and corpus luteum. *Endocrine Res.* 12: 429-446.
- Posalaky Z, Meyer R, McGinley D (1981) The effects of follicle-stimulating hormone (FSH) on Sertoli cell junctions *in vitro*: a freeze-fracture study. *J Ultrastruct Res* 74: 241-254.
- Poyet P, Labrie F. (1983) Characterization of β -adrenergic receptors in dispersed rat Leydig cells. *Biol. Reprod.* 28 (suppl 1): 59 (abstract).
- Poyet P, Labrie F. (1987) Characterization of beta-adrenergic receptors in dispersed rat testicular interstitial cells. *J Androl* 8:7-13.
- Price D. (1963) Biology of the prostate and related tissues. *Natl.Cancer Inst.Monogr.* 12: 1-28.
- Price MT, Olney JW, Anglin M, Buchsbaum S. (1979) Reversible action of N-methyl aspartate on gonadotropin neuroregulation. *Brain Res* 176: 165-168.
- Price MT, Olney JW, Cicero TJ. (1978) Acute elevations of serum luteinizing hormone induced by kainic acid, N-methyl aspartic acid or homocysteic acid. *Neuroendocrinology* 26: 352-358.
- Prince FP. (1992) Ultrastructural evidence of indirect and direct autonomic innervation of human Leydig cells: comparison of neonatal, childhood and pubertal ages. *Cell Tissue Res* 269: 383-390.
- Prins G. (1989) Differential regulation of androgen receptors in the separate rat prostate lobes: androgen independent expression in the lateral lobe. *J.St.Biochem.* 33: 319-326.
- Pulkkinen P, Kanerva S, Elfving K, Jänne J. (1975) Association of spermine and diamine oxidase activity with human spermatozoa. *J.Reprod.Fert.* 43: 49-55.
- Python CP, Rossier MF, Vallotton MB, Capponi A.M. (1993) Peripheral-type benzodiazepines inhibit calcium channels and aldosterone production in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 132: 1489-1495.
- Qian H, Dowling JE. (1993) Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nature* 361: 162-164.
- Quirk SM, Reichert LE Jr. (1988) Regulation of the phosphoinositide pathway in culture Sertoli cells from immature rats: effects of FSH and fluoride. *Endocrinology* 123: 230-237.
- Raina A., Jänne J. (1975) Physiology of the natural polyamines putrescine, spermidine and spermine. *Med.Biol.* 53: 121-147.
- Rajfer J, Sikka SC, Swerdloff RS. (1987) Lack of a direct effect of Gn-RH agonist on human testicular steroidogenesis. *J Clin Endo Metab* 64: 62-67.
- Ramirez VD, Mc Cann SM. (1965) Inhibitory effect of testosterone on luteinizing hormone secretion in immature and adult rats. *Endocrinology* 76: 412-417.
- Rauchenwald M, Steers WD, Desjardins C. (1995) Efferent innervation of the rat testis. *Biol Reprod* 52: 1136-1143.

- Reddy BV, Madhubala R, Reddy PRK. (1986) Stimulation of ornithine decarboxylase activity by arginine vasopressin. *Biochem.Int.* 13: 109-114.
- Reddy PRK, Vilee CA. (1975) Stimulation of ornithine decarboxylase activity by gonadotropic hormones and cyclic AMP in testis of immature rats. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 65: 1350-1354.
- Reinhard JF Jr, Roth RH. (1982) Adrenergic modulation of serotonin synthesis and metabolism.I. Inhibition by clonidine *in vivo*. *Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics* 221: 541-546.
- Reiter RJ, Blask DE, Johnson LY, Rudeen PK, Vaughan MK, Waring PJ. (1976) Melatonin inhibition of reproduction in the male hamster: its dependency on time of day of administration and on an intact and sympathetically innervated pineal gland. *Neuroendocrinology* 22: 107-110.
- Reiter RJ, Fraschini F. (1969) Endocrine aspects of the mammalian pineal gland: a review. *Neuroendocrinology* 5: 219-223.
- Reiter RJ, Sorrentino S Jr, Hoffman RA. (1970) Early photoperiodic conditions and pineal. Antigonadal function in male hamsters. *Int J Fertil* 15: 163-170.
- Reiter RJ, Vaughan MK, Blask DE, Johnson LY. (1975) Pineal methoxyindoles: New evidence concerning their function in the control of pineal-mediated changes in the reproductive physiology of male golden hamsters. *Endocrinology* 96: 206-213.
- Reiter RJ. (1974) Influence of pinealectomy on the breeding capability of hamsters maintained under natural photoperiod and temperature conditions. *Neuroendocrinology* 13: 366-370.
- Reiter RJ. (1980) The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals *Endocrin. Rev.* 1: 109-131.
- Renier GJ, Gaulin J, Gibb W, Collu R, Ducharme JR. (1987) Effects of catecholamines on porcine Sertoli and Leydig cells in primary culture. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 2053-2058.
- Rennert H, Amsterdam A, Billheimer JT, Strauss III JF. (1991) Regulated expression of sterol carrier protein 2 in the ovary: a key role for cyclic AMP. *Biochemistry* 47: 11280-11285.
- Rey R, Campo S, Ayuso S, Nagle C, Chemes H. (1995) Testicular steroidogenesis in the cebus monkey throughout postnatal development. *Biol Reprod* 52: 997-1002.
- Risbridger GP, Clements J, Robertson DM, Drummond AE, Muir J, Burger HG, de Kretser DM. (1989) Immuno-and bioactive inhibin and inhibin α -subunit expression in rat Leydig cell cultures. *Mol Cell Endocrinol* 66: 119-122.
- Risbridger GP. (1996) Regulation of Leydig cells by inhibins and activins. *En: The Leydig cell.* Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Eds), Cache River Press, Vienna IL, 493-506.
- Risley PL, Skreptos CN. (1964) Histochemical distribution of cholinesterases in the testis, epididymis and vas deferens of the rat. *Anat. Record* 148: 231-235.
- Riss W, Burstein SD, Johnson RW. (1963) Hippocampal or pyriform lobe damage in infancy and endocrine development of rats. *Am.J.Physiol.* 204: 861-866.
- Ritchie AWS, Hargreave TB, James K, Chisholm GD. (1984) Intraepithelial lymphocytes in the normal epididymis. A mechanism for tolerance to sperm auto-antigens. *Br.J.Urol.* 56: 79-84.
- Ritta MN, Calandra RS. (1986) Occurrence of GABA in rat testis and its effect on androgen production. *En: GABA and endocrine function.* Racagni G, Donoso AO (Eds), Raven Press, N.Y. vol 42, 291-296.
- Ritta MN, Campos MB, Calandra RS. (1987) Effects of GABA and benzodiazepines on testicular androgen production. *Life Sciences* 40: 791-798.
- Ritta MN, Campos MB, Calandra RS. (1991) Coexistence of γ -aminobutyric acid type A and type B receptors in testicular interstitial cells. *J. Neurochem* 56: 1236-1240.
- Rittmaster RS, Leopold CA, Thompson DL. (1988) Preferential metabolism of dihydrotestosterone to androstenediol 17-glucuronide in rat prostate. *Endocrinology* 123: 2788-2792.
- Rivarola MA, Podestá EJ, Chemes HE. (1972) *In vitro* testosterone- ^{14}C metabolism by rat seminiferous tubules at different stages of development: Formation of 5α -androstenediol at meiosis. *Endocrinology* 91: 537-542.
- Rivarola MA, Podestá EJ. (1972) Metabolism of testosterone- ^{14}C by seminiferous tubules of mature rats: Formation of 5α -androstane- 3α , 17β -diol- ^{14}C . *Endocrinology* 90: 618-623.

- Robaire B, Hermon L. (1988) Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. *En: The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (Eds) Raven Press, New York, vol. 1, cap 23, 999-1080.
- Roberts V, Meunier H, Sawchenko PE, Vale W. (1989) Differential production and regulation of inhibin subunits in rat testicular cell types. *Endocrinology* 125: 2350-2359.
- Robertson DM, Foulds LM, Leversha L, Morgan FJ, Hearn MTW, Berger HG, Wettenhall REH, de Kretser DM. (1985) Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 220-226.
- Robertson DM, Giacometti M, Foulds LM, Lahstein J, Goss NH, Hearn MTW, de Kretser DM. (1989) Isolation of inhibin α -subunit precursor proteins from bovine follicular fluid. *Endocrinology* 125: 2141-2149.
- Rommerts FFG, Cooke BA. (1988) The mechanisms of action of luteinizing hormone. Transducing systems and biological effects. *En: Hormones and their actions*. Cooke BA, King RJB, van del Molen HG (Eds), Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, Part II, 163-180.
- Rommerts FFG. (1990) Testosterone: an overview of biosynthesis, transport, metabolism and action. *En: Testosterone: Action, Deficiency and Substitution*. Nieschlag E, Behre HM (Eds), Springer Verlag, Berlin, 1-22.
- Rose-E-Silva AAM, Fernandes GA, Lima-Filho EC, Antunes-Rodrigues J. (1982) Puberty and sexual maturation in hemidecorticated female rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 15: 367-375.
- Roukenen A, Vihko R. (1974) Concentrations of unconjugated and sulfated neutral sterols in boar testis. *J. Steroid Biochem.* 5: 33-38.
- Rubinstein S, Breitbart H. (1990) Transport and localization of spermine in ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 42 (suppl. 1), 139 (Abst.).
- Rui H, Purvis K. (1987) Prolactin selectively stimulates ornithine decarboxylase in the lateral lobe of the rat prostate. *Mol. Cell. Endocr.* 50: 89-97.
- Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorraga S, Calandra RS, Campo S. (1996) Immunological and biological activities of pituitary FSH isoforms in prepubertal male rats: effect of antiandrogens. *Neuroendocrinology* 63: 514-521.
- Rulli SB, Gonzalez-Calvar SI, Calandra RS. (1995) Effects of antiandrogens on ornithine decarboxylase activity/polyamines concentration in epididymis of prepubertal rats. *Adv. Contrac. Deliv. Syst.* 11: 213-216.
- Russell DH, Durie BGM. (1978) Mechanism of induction of ornithine decarboxylase. *En: Polyamines as biochemical markers of normal and malignant growth*. Prog. Cancer Res. Russell DH, Durie GM. (Eds), Raven Press, New York., 8: 59-187.
- Russell DH. (1985) Ornithine decarboxylase: a key enzyme in normal and neoplastic growth. *Drug Met. Rev.* 16: 1-88.
- Russell LD. (1996) Mammalian Leydig cell structure. *En: The Leydig cell*. Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Eds), Cache River Press, Vienna IL, 43-96.
- Sabry I, Matsuzaki SJ. (1991) Daily cycles of putrescine, spermidine and spermine in the liver, pineal gland, Harderian gland, anterior pituitary, and testes of rats kept in LD 12:12. *J. Pineal Res.* 11: 86-91.
- Saez JM, Avallet O, Lejeune H, Chatelain PG. (1991) Cell-cell communication in the testis. *Horm. Res.* 36: 104-115.
- Saez JM. (1994) Leydig cells: Endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocrine Reviews* 15: 574-626.
- Salgado ED, Green DM. (1955) Renal necrosis induced in rats by serotonin. *Amer. J. Physiol.* 183: 657-661.
- Samuels LT, Bussman L, Matsumoto K, Huseby RA. (1975) Organization of androgen biosynthesis in the testis. *J. Steroid. Biochem.* 6: 291-296.
- Samuels LT. (1960) Metabolism of steroid hormones. *En: Metabolic pathways*. Greenberg (Ed) Academic Press, New York, vol 1, 53-66.
- Sanborn BM, Wagle JR, Steinberger A, Greer DE. (1986) Maturational and hormonal influences on Sertoli cell function. *Endocrinology* 118: 1700-1709.

- Sarkar DK, Smith GC, Fink G. (1981) Effect of manipulating central catecholamines on puberty and the surge of luteinizing hormone and gonadotropin releasing hormone induced by pregnant mare serum gonadotropin in female rats. *Brain Res.* 213: 335-349.
- Scalabrino G, Ferioli ME. (1981) Polyamines in mammalian tumors. Part I. *Adv.Cancer Res.* 35: 151-268.
- Scalabrino G, Ferioli ME. (1982) Polyamines in mammalian tumors. Part II. *Adv.Cancer Res.* 36: 1-102.
- Scalabrino G, Lorenzini E, Ferioli ME. (1991) Polyamines and mammalian hormones. Part I: Biosynthesis, interconversion and hormone effects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 77: 1-35.
- Schiavi RC. (1964) Effects of anterior and posterior hypothalamic lesions on precocious sexual maturation. *Am.J.Physiol.* 206: 805-810.
- Schmidt AW, Peroutka SJ. (1989) 5-Hydroxy-tryptamine receptor "families". *FASEB* 3: 2242-2249.
- Schuber F. (1989) Influence of polyamines on membrane function. *Biochem.J.* 260: 1-10.
- Schulzberg M., Lindh B. (1988) Transmitters and peptides in autonomic ganglia. *En: Handbook of Chemical neuroanatomy.* Bjorklund A. (Ed), Elsevier, Amsterdam, vol. 6, 297-333.
- Schulze C. (1984) Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv. Anat. Embryol Cell Biol* 88: 1-104.
- Seeburg PH, Wisden W, Verdoorn TA, Pritchett DB, Werner P, Herb A, Lüddens H, Sprengel R, Sakmann B. (1990) The GABA_A receptor family: molecular and functional diversity Cold Spring Harb Symposia on Quantitative Biology, volume LV, 29-40.
- Seiler N, Bolkenius FN, Rennert OM. (1981) Interconversion, catabolism and elimination of the polyamines. *Med Biol* 59: 334-346.
- Seiler N, Dezeure F. (1990) Polyamine transport in mammalian cells. *Int. J. Biocchem* 22: 211-218.
- Seiler N, Eichentopf B. (1975) 4-aminobutyrate in mammalian putrescine catabolism. *Biochem J* 152: 201-210.
- Seiler N, Heby O. (1988) Regulation of cellular polyamines in mammals. *Acta Biochem.Biophys.Hung.* 23:1-36.
- Seiler N. (1980) On the role of GABA in vertebrate polyamine metabolism. *Physiol. Chem. Physics* 12: 411-421.
- Seiler N. (1983) Thin-layer chromatography and thin-layer electrophoresis of polyamines and their derivatives. *Methods Enzymol.* 94: 3-9.
- Seiler N. (1987) Functions of polyamine acetylation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65: 2024-2035.
- Selmanoff MK, Goldman BD, Ginsburg BE. (1977) Developmental changes in serum luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and androgen levels in males of two inbred mouse strains. *Endocrinology* 100: 122-127.
- Setchell BP (1982). Spermatogenesis and spermatozoa *En: Reproduction in Mammals, Book I: Germ Cells and Fertilization.* Austin CR, Short RV (Eds), 2^{da} edición. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 63-101.
- Setchell BP, Maddocks S, Brooks DE. (1994) Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. *En: The Physiology of Reproduction.* Knobil E, Neill JD (Eds.) Raven Press, New York, vol 1, cap 18,1063-1176.
- Setchell BP. (1978) Nerves of the testis and scrotum *En: The Mammalian testis Reproductive Biology Handbooks.* Finn CA (Ed), Ithaca, New York: Cornell Univ Press, 77-89.
- Shafer DF, Fowler JM, Jones EA. (1981) Colonic-bacteria: A source of γ -aminobutyric acid in blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 167: 301-303.
- Shaha C, Morris PL, Chen C-L C, Vale W, Bardin WC. (1989) Immunostainable inhibin subunits are in multiple types of testicular cells. *Endocrinology* 125: 1941-1950.
- Shappell NW, Fogel Petrovic MF, Porter CW. (1993) Regulation of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase by intracellular polyamine pools: evidence for a functional role in polyamine homeostasis. *FEBS Lett.* 231: 179-183.
- Sharpe RM, Cooper I. (1987) Comparison of the effects on purified Leydig cells of four hormones (oxytocine, vasopressin, opiates and LHRH with suggested paracrine roles in the testis. *J Endocrinol* 113: 89-96.

- Sharpe RM, Fraser HM, Ratnasooriya WD. (1988) Assessment of the role of Leydig cell products other than testosterone in spermatogenesis and fertility in adult rats. *Int J Androl* 11: 507-523.
- Sharpe RM. (1982) Cellular aspects of the inhibitory actions of LH-RH on the ovary and the testis. *J. Reprod. Fert.* 64: 517-520.
- Sharpe RM. (1984) Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol. Reprod.* 30: 29-34.
- Sharpe RM. (1993) Experimental evidence for Sertoli-germ cell and Sertoli-Leydig cell interactions. *En: The Sertoli cell.* Russell LD, Griswold MD (Eds) , Clearwater, FL.: Cache River Press, 391-418.
- Shibata H, Kojima I, Ogata E. (1986) Diazepam inhibits potassium-induced aldosterone secretion in adrenal glomerulosa cell. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 135: 994-999.
- Shikita M, Hall PF. (1973) Cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria. An enzyme for the side-chain cleavage of cholesterol. I. Purification and properties. *J.Biol.Chem.* 248: 5598-5601.
- Shimazaki J, Kato N, Nagai H, Yamanaka H, Shida K. (1972) 3α -reduction of 5α -dihydrotestosterone by rat ventral prostate. *Endocrinol.Japon.* 19: 97-106.
- Shioda T, Nishida S. (1966) Innervation of the bull testis. *Japan J. Vet.Sci.* 28: 251-255.
- Shubhada S, Daver K, Tsai YH. (1989a) The changing profiles of L-ornithine decarboxylase and S-adenosyl-L-methionine decarboxylase activities in testicular cell types during sexual maturation of male rats. *J. Androl.* 10: 152-158.
- Shubhada S, Lin SN, Qian ZY, Steinberger A, Tsai YH. (1989b) Polyamine profiles in rat testis, germ cells and Sertoli cells during testicular maturation. *J. Androl* 10: 145-151.
- Shubhada S, Tsai YH. (1990) Differential effects of FSH on the activities of S-adenosyl-L-methionine decarboxylase and ornithine decarboxylase in rat Sertoli cells. *J. Androl* 11: 414-421.
- Sims KL, Pitts FN. (1970) Brain glutamate decarboxylase: changes in the developing rat brain. *J. Neurochem* 17: 1607-1612.
- Sinha Hikim AP, Amador AG, Bartke A, Russell LD. (1989b) Structure/function relationships in active and inactive hamster Leydig cells: A correlative morphometric and endocrine study. *Endocrinology* 125: 1844-1856.
- Sinha Hikim AP, Amador AG, Klemcke HG, Bartke A, Russell L.D. (1989a) Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology* 125: 1829-1843.
- Sinha Hikim AP, Bartke A, Russell D. (1988a) The seasonal breeding hamster as a model to study structure-function relationships in the testis. *Tissue & Cell* 20 (1) 63-78.
- Sinha Hikim AP, Bartke A, Russell D. (1988b) Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. *Biol. Reprod.* 39: 1225-1237.
- Sinha Hikim AP, Chandrashekar V, Bartke A, Russell LD. (1993) Sentinels of Leydig cell structural and functional changes in golden hamsters in early testicular regression and recrudescence. *Int J Androl* 16: 324-342.
- Sinha YN, Selby FW, Vanderlaan WP. (1974) The natural history of prolactin and GH secretion in mice with high and low incidence of mammary tumors. *Endocrinology* 94: 757-764.
- Sirinathsinghji DJS, Motta M, Martini L J. (1985) Induction of precocious puberty in the female rats after chronic naloxone administration during the neonatal period: The opiate "brake" on prepubertal gonadotropin secretion. *Endocrinol.* 104: 299-307.
- Sisk CL (1990) Photoperiodic regulation of gonadal growth and pulsatile luteinizing hormone secretion in male ferrets. *J. Biol. Rhythms* 5: 177-186
- Skinner MK, Takacs K, Coffey RJ. (1989) Transforming growth factor α gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions. *Endocrinology* 124: 845-854.
- Skinner MK. (1991) Cell-cell interaction in the testis. *Endocrine Rev* 12: 45-77.
- Soares MJ, Colosi P, Talamantes F. (1983) Development of a homologous radioimmunoassay for secreted hamster prolactin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 172: 379-381.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1986) Introducción a la bioestadística. Reverté S.A. (Ed), Barcelona, España, cap 6, 103-105.

- Spera G, di Benedetto E, Falaschi P, Fabbri A, Lauro G, Bolotti M. (1988) Immunohistochemical localization of beta-endorphin in hyperplastic interstitial tissue of the human testis. *J Androl* 9: 78-81.
- Spinedi E, Negro-Vilar A. (1983) Serotonin and adrenocorticotropin (ACTH) release: Direct effects at the anterior pituitary level and potentiation of arginine vasopressin-induced ACTH release. *Endocrinology* 112: 1217-1223.
- Spiteri-Grech J, Nieschlag E. (1993) Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis - a review. *J Reprod Fertil* 98: 1-14.
- Stastny M, Cohen S. (1972) The stimulation of ornithine decarboxylase in testes of the neonatal mouse. *Biochem. Biophys. Acta* 261: 177-180.
- Steer MW. (1981) Understanding cell structure. Cambridge: Cambridge University Press.
- Steger RW, Bartke A, Goldman BD. (1982) Alterations in neuroendocrine function during photoperiod induced testicular atrophy and recrudescence in the golden hamster. *Biol. Reprod.* 26: 437-444.
- Steger RW, Bartke A, Matt KS, Soares MJ, Talamantes F. (1984) Neuroendocrine changes in male hamsters following photostimulation. *The J. of Exp. Zoology* 229: 467-474.
- Steinberger E, Fisher M. (1969) Differentiation of steroid biosynthetic pathways in developing testes. *Biol Reprod* 1: 119-133.
- Stephenson FA. (1988) Understanding the GABA_A receptor: a chemically gated ion channel *Biochem J* 249: 21-32.
- Stocco DM, Khan SA. (1992) Effects of steroidogenesis inducing protein (SIP) on steroid production in MA-10 mouse Leydig cells: utilization of a non-cAMP second messenger pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* 84: 185-194.
- Stocco DM. (1996) Acute regulation of Leydig cell steroidogenesis. *En: The Leydig Cell.* Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Eds), Cache River Press, Vienna, IL., cap. 11, 241-258.
- Suarez Quian CA, Niklinski W. (1990) Immunocytochemical localization of the epidermal growth factor. *Biol Reprod* 43: 1087-1097.
- Suda T, Tomori N, Tozawa F, Mouri T, Demura H, Shizume K. (1984) Distribution and characterization of corticotropin releasing factor in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 861-866.
- Suescun MO, Gonzalez SI, Chiazuzzi VA, Calandra RS. (1985) Effects of induced hypoprolactinemia on testicular function during gonadal maturation in the rat. *J. Androl* 6: 77-82.
- Sugawara T, Holt JA, Driscoll D, Strauss III JF, Lin D, Miller WL, Patterson D, Clancy KP, Hart IM, Clark BJ, Stocco DM. (1995) Human steroidogenic acute regulatory protein: Functional activity in COS-1-cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a specific pseudogene to chromosome 13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4778-4782.
- Sugino K, Nakamura T, Takio K, Titani K, Miyamoto K, Hasegawa Y, Igarashi M, Sugino H. (1989) Inhibin alpha sub-unit monomer is present in bovine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 159: 1323-1329.
- Sullivan MHF, Cooke BA. (1985) Control and production of leucotriene B₄ in rat tumour and testicular Leydig cells. *Biochem. J.* 230: 821-825.
- Sun XR, Risbridger GP. (1994) Site of macrophage inhibition of Luteinizing hormone-stimulated testosterone production by purified Leydig cells. *Biol Reprod* 50: 363-367.
- Sundaram K, Kumar N. (1996) Metabolism of testosterone in Leydig cells and peripheral tissues. *En: The Leydig cell.* Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Eds), Cache River Press, Vienna IL, 287-306.
- Sunkara PS, Ramakrishna S, Nishioka K, Rao PN. (1981) The relationship between levels and rates of synthesis of polyamines during mammalian cell cycle. *Life Sci.* 28: 1497-1506.
- 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: 8593-8597.
- Swerdloff RS, Walsh PC, Jacobs HS, Odell WD. (1971) Serum LH and FSH during sexual maturation in the male rat: Effect of castration and cryptorchidism. *Endocrinology* 88: 120-128.

- Swift TA, Díaz JA. (1987) Stimulation of polyamine biosynthesis by follicle-stimulating hormone in serum-free cultures of rat Sertoli cells. *Endocrinology* 120: 394-400.
- Tabor CW, Tabor H. (1976) 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. *Ann.Rev.Biochem.* 45: 285-306.
- Tabor CW, Tabor H. (1984) Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 749-790.
- Tamarkin L, Hutchinson JS, Goldman BD. (1976a) Regulation of serum gonadotropins by photoperiod and testicular hormone in the Syrian hamster. *Endocrinology* 99: 1528-1533.
- Tamarkin L, Westrom WK, Hamill AI, Goldman BD. (1976b) Effect of melatonin on the reproductive system of male and female hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinology* 99: 1534-1539.
- Tapanainen J, Kuopio T, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I. (1984) Rat testicular endogenous steroids and number of Leydig cells between the fetal period and sexual maturity. *Biol. Reprod.* 31: 1027-1035.
- Teerds KJ, De Rooij DG, Rommerts FFG, Van Den Hurk R, Wensing CJG. (1989) Stimulation of the proliferation and differentiation of Leydig cell precursors after the destruction of existing Leydig cells with ethane dimethyl sulphonate (EDS) can take place in the absence of LH. *J Androl* 10: 472-477.
- Teerds KJ, Dorrington JH. (1993) Localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 during testicular development in the rat. *Biol Reprod* 48: 40-45.
- Terada N, Sato B, Matsumoto K. (1980) Formation of 5 β - and 5 α -products from progesterone *in vitro* in immature golden hamster testis. *Endocrinology* 106: 1554-1561.
- Thäkä KM, Fröysa B, Thäkä S, Söder O. (1993) Hormonal and photoperiod-induces changes in testicular interleukin-1-like factor in bank voles, *Clethrionomys glareolus*. *J.Reprod.Fertil* 97: 469-474.
- Thomas AP, Diggle TA, Denton RM. (1986) Sensitivity of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase to magnesium ions. *Biochem.J.* 238: 83-91.
- Thompson RC, Seasholtz AF, Hebert E. (1987) Rat corticotropin releasing hormone gene: sequence and tissue specific expression. *Mol Endocrinol* 1: 363-368.
- Thomson I, Fraser R, Kenyon CJ. (1992) Inhibition of bovine adrenocortical steroidogenesis by benzodiazepines: a direct effect on microsomal hydroxylation or an inhibition of calcium uptake. *J. Endocrinol.* 135: 361-362.
- Tilbrook AJ, de Krester DM, Clarke JJ. (1991) Control of secretion of follicle stimulating hormone by inhibin and testosterone in rams. *Biol Reprod* 44(1): 142 (abstr. 360).
- Tillakaratne NJK, Erlander MG, Collard MW, Greif KF, Tobin AJ. (1992) Glutamate decarboxylases in nonneural cells of rat testis and oviduct: differential expression of GAD65 and GAD67. *J of Neurochemistry* 58: 618-627.
- Tillakaratne NJK, Tobin AJ. (1986) Glutamic acid decarboxylase (GAD) messenger RNA in brain and peripheral tissues of rat. *Soc Neurosci* 12: 1458 (abstr).
- Tinajero JC, Fabbri A, Ciocca DR, Dufau ML. (1993a) Serotonin secretion from rat Leydig cells. *Endocrinology* 133: 3026-3029.
- Tinajero JC, Fabbri A, Dufau ML. (1992) Regulation of corticotropin-releasing factor secretion from Leydig cells by serotonin. *Endocrinol.* 130: 1780-1788.
- Tinajero JC, Fabbri A, Dufau ML. (1993b) Serotonergic inhibition of rat Leydig cell function by propanolol. *Endocrinology* 133: 257-264.
- Tobin AJ. (1989) Structure and regulation of the gene for the glutamate decarboxylase: a candidate gene for neuropsychiatric and neurological disease. *En: Molecular Neurobiology, Proceedings of the First NIMH Conference.* Zalcman S, Scheller R (Eds), Department of Health and Human Services, Rockville, Maryland,US, 165-182.
- Tougard C, Tixier-Vidal A. (1994) Lactotropes and gonadotropes. *En: The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York, vol 1, cap 28, 1711-1748.
- Trzeciak WH, Simpson ER, Scallen TJ, Vahouny GV, Waterman MR. (1987) Studies on the synthesis of SCP-2 in rat adrenal cortical cells in monolayer culture. *J. Biol. Chem.* 262: 3713-3720.
- Tsuji M, Takeyama M, Takatsuka D, Yabumoto H, Terada N, Matsumoto K. (1984) 5 α - and 5 β -reductases for 4-ene-3-ketosteroids and 17 β -ol-dehydrogenase in epididymis and testis of golden hamster during sexual development. *J. Steroid Biochem.* 21: 179-183.

- Turek FW, Elliot JA, Alvis JD, Menaker M. (1975a) Effect of prolonged exposure to nonstimulatory photoperiods on the activity of the neuroendocrine-testicular axis of golden hamsters. *Biol. Reprod.* 13: 475-481.
- Turek FW, Elliot JA, Alvis JD, Menaker M. (1975b) The interaction of castration and photoperiod in the regulation of hypophyseal and serum gonadotropin levels in male golden hamsters. *Endocrinology* 96: 854-860.
- Turek FW, Van Cauter E. (1994) Rhythms in reproduction *En: The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York, vol 2, cap 43, 487-540.
- Ullisse S, Fabbri A, Dufau ML. (1990) A novel mechanism of action of corticotropin releasing factor in rat Leydig cell. *J Biol Chem* 265: 1964-1971.
- Urbanski HF, Doan A, Pierce M, Fahrenbach WH, Collins PM. (1992) Maturation of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis of male Syrian hamsters. *Biol. Reprod.* 46: 991-996.
- Urbanski HF, Fahy MM, Collins PM. (1993) Influence of N-methyl-D-aspartate on the reproductive axis of male Syrian hamsters. *J Endocrinol* 137: 247-252.
- Urbanski HF. (1990) A role for N-methyl-D-aspartate receptors in the control of seasonal breeding. *Endocrinology* 127: 2223-2228.
- Usdin TB, Bonner TI, Mezey E. (1994) Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distribution. *Endocrinology* 135: 2662-2680.
- Vahouny GV, Chanderbhan R, Noland BJ, Irwin D, Dennis P, Lambeth JD, Scallen TJ. (1983) Sterol carrier protein₂: Identification of adrenal sterol carrier protein₂ and site of action for mitochondrial cholesterol utilization. *J. Biol. Chem.* 258: 11731-11737.
- Vahouny GV, Dennis P, Chanderbhan R, Fiskum G, Noland BJ, Scallen TJ. (1984) Sterol carrier protein₂ (SCP₂)-mediated transfer of cholesterol to mitochondrial inner membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122: 509-515.
- Vale W, Gonzalez-Manchon C. (1989) Activin-A, inhibin and transforming growth factor- β modulate growth of two gonadal cell lines. *Endocrinology* 125: 1666-1672.
- Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corriagan A, Woo W, Karr D, Spiess J. (1986) Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 321: 776-779.
- Valenti S, Guido R, Giusti M, Giordano G. (1995) *In vitro* acute and prolonged effects of melatonin on purified rat Leydig cell steroidogenesis and adenosine 3',5'-monophosphate production. *Endocrinology* 136: 5357-5362.
- van Dissel-Emiliani, F.M.F., Grootenhuys AJ, de Jong FH, de Rooij DG. (1989) Inhibin reduces spermatogonial numbers in testes of adult mice and chinese hamsters *Endocrinology* 125: 1898-1903.
- Van Haaster LH, de Rooij DG. (1993) Cycle of the seminiferous epithelium in the Djungarian hamster. *Biol Reprod* 48: 515-521.
- Van Noort M, Rommerts FFG, van Amerongen A, Wirtz KWA. (1988) Regulation of SCP₂ in the soluble fraction of rat Leydig cell. Kinetics and possible role of calcium influx. *Mol. Cell. Endocrinol.* 56: 133-138.
- Vannelli GB, Barni T, Forti G, Negro-Vilar, Vale A, Serio W, Balboni M. (1992) Immunolocalization of inhibin alpha-subunit in the human testis. A light and electron-microscopy study. *Cell Tissue Res* 269: 221-227.
- Veeramachaneni DN, Schanbacher BD, Amann RP. (1989) Immunolocalization and concentrations of inhibin alpha in the ovine testis and excurrent duct system. *Biol Reprod* 41: 499-503.
- Veldhuis JD, Rogol AD, Johnson M, Dufau ML (1986) Endogenous opiates modulate the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. *J Clin Invest* 72: 2035-2042.
- Vendrely E, Guerillot C, Basseville C, DaLage C. (1971) Poids testiculaire et spermatogenese du Hamster dore au cours du cycle saisonnier. *CR Seances Soc Biol Ses Fil* 165: 1562-1565.
- Verhoeven G. (1980) Effects of neurotransmitters and stimulating hormone on the aromatization of androgens and the production of adenosine 3',5' monophosphate by cultured testicular cells. *J. Steroid Biochem.* 12: 315-318.

- Verhoeven G. (1992) Local control system within the testis. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 6: 313-333.
- 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: 127-129.
- Vliegen MK, Schlatt S, Weinbauer GF, Bergmann M, Groome NP, Nieschlag E. (1993) Localization of inhibin/activin subunits in the testis of adult non-human primates and men. *Cell Tissue Res* 273: 261-268.
- Voglmayr JK, Mizumachi M, Washington DW, Chen C-L C, Bardin CW. (1990) Immunization of rams against human recombinant inhibin α -subunit delays, augments, and extends season-related increase in blood gonadotropin levels. *Biol Reprod* 42:81-86.
- Vomachka AJ, Greenwald GS. (1979) The development of gonadotropin and steroid hormone patterns in male and female hamsters from birth to puberty. *Endocrinology* 105: 960-966.
- Wade GN, Bartness TJ. (1984) Effects of photoperiod and gonadectomy on food intake, body weight, and body composition in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol* 246 (Regulatory integrative Comp Physiol 15):R26-30.
- Wanderley MI, Faveretto ALV, Valenca MM, Hattori M, Wakabayashi K, Antunes-Rodrigues J. (1989) Modulatory influences of adrenergic agonists on testosterone secretion from rat dispersed testicular cells or Percoll-purified Leydig cells. *Brazilian J Med Biol Res* 22: 1421-1429.
- Warren DW, Pasupuleti V, Lu Y, Platler BW, Horton R. (1990) Tumor necrosis factor and interleukin-1 stimulate testosterone secretion in adult male rat Leydig cells *in vitro*. *J Androl* 11: 353-360.
- Watson-Whitmyre M, Stetson MH. (1988) Reproductive refractoriness in hamsters: environmental and endocrine etiologies. *En: Processing of environmental information in vertebrates*. Stetson MH (Eds), Springer-Verlag, New York, 219-249.
- Weiner KXB, Pentecost BT, Dias JA. (1990) Testosterone decrease ornithine decarboxylase messenger RNA levels in primary culture of rats Sertoli cells. *Mol. Endoc.* 4: 1249-1256.
- White LG. (1954) The effect of some seminal constituents and related substances on diluted mammalian spermatozoa. *Aust.J.Biol.Sci.* 7: 379-385.
- Wilson JD, Gloyne RE. (1970) The intranuclear metabolism of testosterone in the accessory organs of reproduction. *Rec.Prog.Horm.Res.* 26: 309-336.
- Williams-Ashman HG, Canellakis Z. (1979) Polyamines in mammalian biology and medicine. *Perspect.Biol.Med.* 22: 44-51.
- Williams-Ashman HG, Canellakis Z. (1980) Transglutaminase mediated covalent attachment of polyamines to proteins: mechanisms and potential physiological significance. *Physiol.Chem.Phys.* 12: 457-470.
- Winter JP, Vanderstichele HMJ, Timmerman MA, Blok LJ, Themmen APN, de Jong FH. (1993) Activin is produced by rat Sertoli cells *in vitro* and can act as an autocrine regulator of Sertoli cells function. *Endocrinology* 132: 975-984.
- Wisden W, Seeburg PH. (1992) GABA_A receptor channels: from subunits to functional entities. *Neurobiology* 2: 263-269.
- Wistrom CA, Meizel S. (1993) Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/Cl⁻ channel in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Developmental biology* 159: 679-690.
- Wojcik WJ, Neff NH. (1984) γ -aminobutyric acid_B receptors are negatively coupled to adenylyl cyclase in brain, and in the cerebellum these receptors may be associated with granule cells. *Mol Pharmacol* 25: 24-28.
- Wray S, Hoffman G. (1986) Postnatal morphological changes in rat LHRH neurons correlated with sexual maturation. *Neuroendocrinology* 43: 93-97.
- Wynn PC, Aguilera G, Morell J, Catt KJ. (1983) Properties and regulation of high-affinity pituitary receptors for corticotropin-releasing factor. *Biochem. Res. Commun.* 110: 602-609.
- Wynn PC, Hauger RL, Holmes MC, Millan MA, Catt KJ, Aguilera G. (1984) Brain and pituitary receptors for corticotropin releasing factor: localization and differential regulation after adrenalectomy. *Peptides* 5: 1077-1084.

- Yabumoto H, Ikoma F, Takeyama M, Tsuji M, Matsumoto K. (1985) Hormonal regulation of activities of 4-ene-5 β and 5 α -reductases and 17 β -hydroxydehydrogenase in immature golden hamster testis. *J. Steroid Biochem.* 22: 495-499.
- Yamamoto M, Takaba H, Hashimoto J, Koji M. (1987) Evidence for innervation of the myoid cell in the human seminiferous tubule. *Urol. Int.* 42: 137-140.
- Yamashita K. (1939) Histologische studien zur innervation des hodens und des nebenhodens beim menschen. *J. Oriental Med* 30: 150 (abstr).
- Yanagibashi K, Ohno Y, Nakamichi N, Matsui T, Hyashida K, Takamura M, Yamada K, Tou S, Kawamura M. (1989) Peripheral-type benzodiazepine receptors are involved in the regulation of cholesterol side chain cleavage in adrenocortical mitochondria. *J. Biochem.* 106: 1026-1029.
- Yellon S.M., Goldman B.C. (1984) Photoperiod control of reproductive development in the male Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 114 (2): 664-670.
- Yoon DJ, Sklar C, David R (1983) Presence of immunoreactive corticotropin-releasing factor in the testis. *Endocrinology* 122: 759-761.
- Yoshimasa T, Sibley DR, Bouvier M, Lefkowitz RJ, Caron MG. (1987) Cross-talk between cellular signaling pathways suggested by phorbol-ester-induced adenylate cyclase phosphorylation. *Nature* 327: 67-70.
- Yoshizaki K, Matsumoto K, Samuels LT. (1978) Localization of $\Delta^{4-5}\alpha$ -reductase in immature rat testes. *Endocrinology* 102: 918-925.
- Zhang FP, Hamalainen T, Kipia A, Pakarinen P, Huhtaniemi I. (1994) Ontogeny of luteinizing hormone receptor gene expression in the rat testis. *Endocrinology* 134: 2206-2213.
- Zhu BC, Chiochio SR, Suburo AM, Tramezzani JH. (1995) Monoaminergic and peptidergic contributions of the superior and inferior spermatic nerves to the innervation of the testis in the rat. *J Androl* 16: 248-258
- Zieher LM, Debeijuk L, Ituriza F, Mancini RE. (1971) Biogenic amine concentration in testes of rats at different ages. *Endocrinology* 88: 351-354.
- Zirkin BR, Ewing LL, Kromann N, Cochran RC. (1980) Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused *in vitro*: Correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology* 107: 1867-1874.

Parte de los resultados de esta Tesis han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Chandrashekar V, Rao JN, Bartke A, Calandra RS. (1996) Testicular gamma-aminobutyric acid and circulating androgens in Syrian and Djungarian hamsters during sexual development. *International Journal of Andrology* 19 (3): 164-170.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Calandra RS. (1996) Influence of photoinhibition on GABA and Glutamic acid levels, and on glutamate decarboxylase activity in the testis and epididymis of the golden hamster. *International Journal of Andrology* 19 (3): 171-178.
- Calandra RS, Rulli SB, Frungieri MB, Suescun O, Gonzalez-Calvar SI. (1996) Polyamines in the male reproductive system. *Acta Physiologica, Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana* 46: 209-222.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Calandra RS. (1996) Polyamine levels in testes and seminal vesicles from adult Golden hamsters during gonadal regression-recrudescence. *Journal of Andrology* 17 (6): 683-691.