

17
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EFFECTO DE LA EDAD SOBRE LA ACTIVIDAD MODULADORA DE LA
ESTEROIDOGÉNESIS PRESENTE EN MEDIOS CONDICIONADOS
DE CÉLULAS DE SERTOLI

T É S I S

Que para obtener el título de

B I Ó L O G O

PRESENTA

LUCIA HERRERA VELÁZQUEZ

ASESOR:

M. en B. E. ENRIQUE MENDIETA MARQUEZ

1 9 9 7

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A mis padres quienes me dieron
lo mejor que tengo la vida.**

**A mis hermanos quienes saben
que no es fácil llegar.**

**A mis amigos por apoyarme
incondicionalmente.
Gracias por lo que hemos
logrado.**

Para ti Carlos, quien me enseño a apreciar que el sentido de la vida está en fijarse objetivos y no claudicar hasta obtenerlos pese a todas las adversidades.

Por ti aprendí, a valorar que lo importante no es recibir, sino dar siempre lo mejor de uno.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en B. E. Enrique Mendieta Márquez por sus valiosas sugerencias para la realización de este proyecto.

A todos los integrantes del laboratorio: Mecanismos de Regulación Hormonal . División de Ciencias Biológicas y de la salud. Universidad Autónoma Metropolitana.

A Cesar R. Chavez Ortiz Responsable del Dpto. de Apoyo Académico en computación (D.A.A.C) del C.C. H. Oriente por su infinita paciencia durante la escritura e impresión de este trabajo.

Al secretario General Lucio Sergio Flores Andrade del C. C. H. Plantel Oriente por su apoyo para la edición.

Al Departamento de Impresiones a cargo del Sr. Rosendo Vargas Torres.

INDICE

	Página
I.-MARCO TEÓRICO	1
I.1 anatomía del aparato reproductor masculino	1
I.2 anatomía testicular	1
I.3 morfología del compartimiento intersticial	3
I.4 comportamiento tubular	6
I.5 eje de regulación hipotálamo-hipófisis-testículo	13
I.6 esteroidogénesis testicular	16
1.7 interacciones células de Leydig- células de Sertoli	18
II JUSTIFICACIÓN	24
III. HIPÓTESIS	25
IV OBJETIVOS	25
V METODOLOGÍA	26
V.1 Obtención de las fracciones testiculares crudas	26
V.2 Purificación de la fracción intersticial cruda	27
V.3 Purificación de la fracción tubular cruda	28
V.4 Cultivos celulares	29
V.1 Cuantificación hormonal mediante el método de radioinmunoanálisis	30
VI RESULTADOS	31
VII DISCUSIÓN	42
VIII CONCLUSIONES	48
IX BIBLIOGRAFÍA	49

RESUMEN

El testículo esta compuesto de muchos tipos celulares en el que interactúan una variedad de células y en consecuencia un sin número de sustancias por lo que su funcionamiento es producto de la acción combinada de las diversas células presentes y de los factores emanados localmente. Al parecer en la rata existe una diferencia entre los requerimientos fisiológicos a lo largo de su desarrollo por lo que la producción de factores paracrinos secretados por las células de Sertoli son clave para el mantenimiento de la función testicular, lo cual ha sido mostrado en numerosas investigaciones *in vivo e in vitro*, donde se ha observado la presencia de factores moduladores de la esteroidogénesis en medios de células aisladas a partir de animales de diferentes edades o mantenidas en distintas condiciones experimentales.

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado la presencia de una Actividad moduladora de la esteroidogénesis (AME) en medios condicionados de células de Sertoli (CS) que produce un aumento en la síntesis de Pregnenolona (PREG) y una disminución dosis dependiente de la producción de testosterona en células de Leydig (CL) cuando estas son mantenidas en cultivo primario por 48 horas. Tomando esto en consideración el objetivo de este trabajo fue el determinar el efecto de la edad de los animales empleados en la obtención de las células de Sertoli sobre la AME presente en sus medios condicionados.

Los medios condicionados en CS (MCCS) se obtuvieron a partir de las fracciones tubulares enriquecidas en CS provenientes de ratas prepúberes (20 y 40 días) y adultas (60 y 90 días), dichas fracciones fueron cultivadas en medio mínimo de eagle modificado por dulbecco (DME) durante un periodo de 36 horas. Las CL aisladas del compartimento intersticial fueron mantenidas en cultivos primarios por periodos de 12 y 24 horas en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de MCCS (1:2, 1:5 y 1:10 diluidos en DME) posteriormente, los medios fueron recuperados para la cuantificación de PREG y T por medio del radioinmunoanálisis.

Los resultados obtenidos mostraron una AME presente en cada una de las edades dosis y tiempos evaluados, de donde los animales inmaduros (20 días) mostraron una tendencia a acumular PREG más rápidamente que los obtenidos a partir de animales adultos (90 días), ya que en estos últimos la acumulación final de PREG es alrededor del 15% mayor que en los animales inmaduros. Respecto a la síntesis de T la inhibición es más marcada en animales con 20 días en comparación con los de mayor edad, sobre todo a las 24 horas de cultivo, aunque una AME parece estar presente en los MCCS obtenidos de ratas en diferente estadio de desarrollo los mecanismos por los cuales se lleva a cabo esta regulación parecen diferir de acuerdo al estado de madurez del animal.

I. MARCO TEÓRICO

I.1. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

El sistema reproductor masculino se encuentra constituido por las glándulas sexuales y los órganos accesorios. De manera general está formado por cuatro componentes con funciones diferentes (Fig. 1) :

- a) Los testículos o gónadas, que cumplen con una doble función, generativa y endocrina, ya que actúan tanto en la producción de células germinales (espermatozoides) como en la producción de hormonas sexuales,
- b) Una complicada red de túbulos, consistentes en ductos eferentes, epidídimo, ductos deferentes y eyaculadores,
- c) Un grupo de glándulas exocrinas que contribuyen a la secreción de fluidos seminales, tales como: vesículas seminales, glándula prostática y un par de glándulas bulbouretrales accesorias, y
- d) Un órgano copulador, el pene. (Bloom y Fawcett, 1990).

I.2. ANATOMÍA TESTICULAR

Los testículos se desarrollan en la cavidad abdominal, descendiendo hacia el escroto poco antes o después del nacimiento. Se encuentran revestidos anterior y lateralmente por una cavidad serosa que es derivada del peritoneo, la *túnica vaginalis*; inmediatamente después de la *túnica vaginalis* el testículo está cubierto por una capa fibrosa llamada *túnica albugínea*, y finalmente lo cubre la *túnica vascular* que está formada por redes de vasos sanguíneos incluidos en el tejido conectivo. La *túnica albugínea* se encuentra engrosada a lo largo de la superficie posterior del testículo, y se proyecta hacia el interior de la glándula formando el *mediastino testicular*, del cual parten los septos en forma radial que dividen al parénquima testicular en *lóbulos*. (Bloom y Fawcett, 1990).

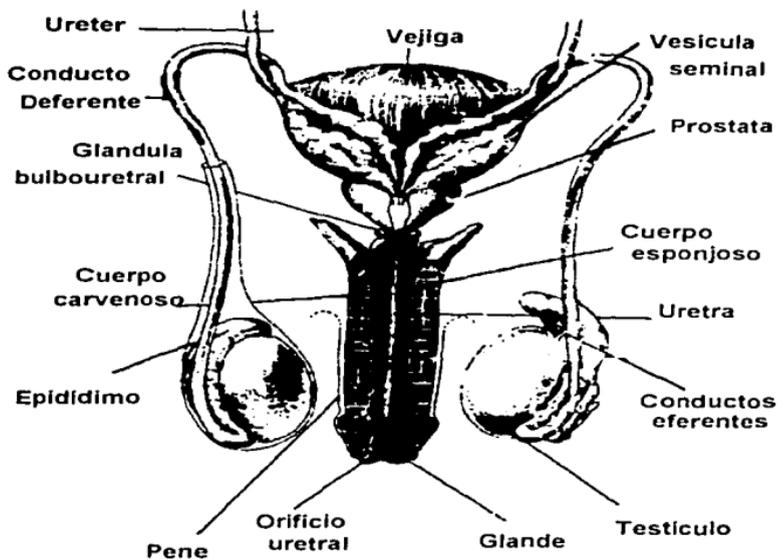


Fig. 1 Esquema que muestra la anatomía del aparato reproductor masculino, tomado de Martin Dym 1975.

Cada lóbulo testicular contiene varios *túbulos seminíferos* enrollados, los cuales van a terminar en una porción recta que se une a los túbulos de la red testicular formando el *rete testis*, donde desembocan los túbulos seminíferos (Bloom y Fawcett, 1990) (Fig. 2).

La irrigación arterial de los testículos es suministrada por la *arteria espermática* que parte directamente de la aorta abdominal a la altura de la segunda vértebra lumbar, y recorre el conducto inguinal rodeada del plexo venoso pampiniforme, llegando hasta el escroto. Las ramas arteriolas llegan hasta los tabiques testiculares y luego continúan al tejido intersticial, donde forman plexos capilares alrededor de los túbulos seminíferos. Las venas acompañan a las arterias y forman el *plexo pampiniforme* que se vacía en la vena espermática.

Las vías linfáticas son numerosas y comienzan en el tejido conectivo intersticial, donde los capilares se asemejan a hendiduras tisulares revestidas por endotelio. La linfa drena a los vasos linfáticos mayores en los tabiques testiculares y la túnica albugínea y pasa a los ganglios linfáticos aórticos lumbares.

Los nervios forman el plexo testicular, que sigue a la arteria espermática; las fibras en parte son simpáticas vasomotoras y en parte sensitivas (**Geneser, 1990**).

1.3. MORFOLOGÍA DEL COMPARTIMIENTO INTERSTICIAL.

El tejido intersticial del testículo se encuentra altamente vascularizado, y está compuesto de vasos sanguíneos y linfáticos, fibras de colágena, y algunos tipos celulares tales como fibroblastos, macrófagos, células cebadas y células de Leydig (CL).

Las CL sintetizan y liberan la hormona masculina llamada testosterona (T) (**Leeson y Leeson, 1977**). Esta estirpe celular involucra al menos dos generaciones de células: la generación celular de tipo fetal que es responsable de la masculinización de las características sexuales primarias durante la vida fetal y neonatal, y la población de tipo adulto, la cual es responsable de la masculinización durante la pubertad (**Gondos, 1980**).

En la rata las CL fetales aparecen aproximadamente a los 15 días en la región intersticial, por diferenciación de las células somáticas mesenquimales. Estas células contienen grandes mitocondrias, gotas de lípidos, y retículo endoplásmico liso (**Magres y Jost, 1980**). Estas células a los 20 días de desarrollo fetal alcanza un

máximo de 10^5 células por testículo y posteriormente disminuye claramente después del nacimiento y durante las dos primeras semanas de vida posnatal (Zirkin y Ewing , 1987).

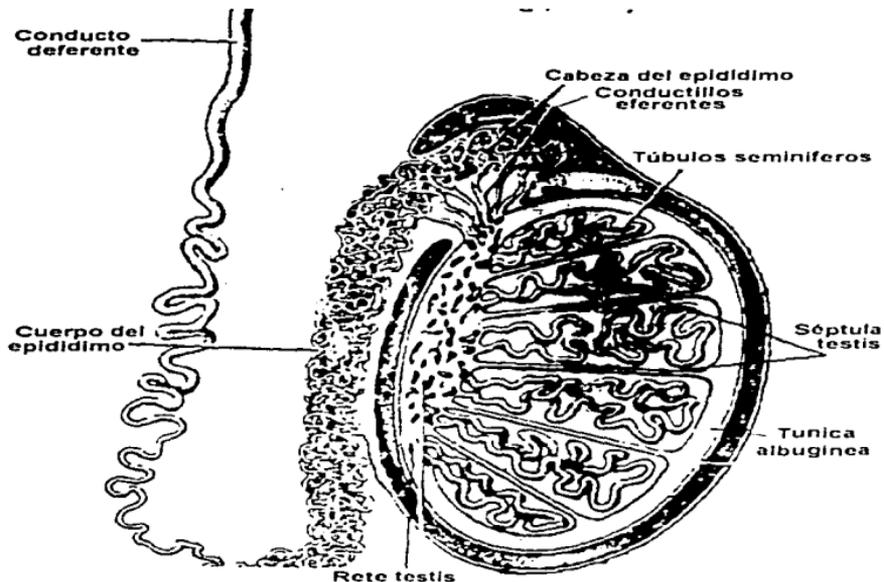


Fig. 2 Esquema de la arquitectura del testículo y del sistema ductal excretor tomado de Martin Dym 1975.

La evolución de las CL de tipo tetal y las evidencias de su regresión funcional y morfológica después de estas semanas son desconocidos; por lo tanto, tampoco se tiene de una explicación de

este fenómeno, por lo que se ha sugerido que la regresión tanto morfológica como funcional de las CL fetales es controlada por una regulación autocrina o paracrina (Saez, 1994). Durante la pubertad, el número de CL se incrementa y llega a alcanzar un máximo de 5×10^8 células por testículo en el hombre hacia los 20 años, y su número gradualmente disminuye en el hombre a los 60 años de edad (Neaves y cols, 1984).

Las CL de tipo adulto aparecen al décimo día del nacimiento e incrementa considerablemente su número después del día 15 hasta llegar a 25×10^5 células por testículo al finalizar la pubertad. Las CL son formadas principalmente por diferenciación de células mesenquimales, pero también por división de CL preexistentes (Hardy y cols, 1989).

En el humano, la diferenciación de las gónadas masculinas aparece a la sexta semana de gestación, y su citodiferenciación comienza con un incremento en el volumen citoplasmático, desarrollo del retículo endoplásmico liso, un incremento en el número y tamaño de las mitocondrias, agrandamiento del núcleo y acumulación de gotas de lípidos. Los cristales de Reinke nunca son formados en las CL fetales y son solamente observados en el adulto. Durante la infancia, el espacio intersticial es poblado por células mesenquimales estrelladas y fusiformes con núcleo elongado y citoplasma visible que son considerados precursores celulares no diferenciados. Durante la pubertad estas células se diferencian a CL adultas bajo el control de la hormona luteinizante (LH) (Prince, 1984).

Este proceso de diferenciación involucra la aparición de un marcado incremento del retículo endoplásmico liso, el cual consiste en una red de túbulos con membranas que los limitan y que contiene a la mayoría de las enzimas que participan en la biosíntesis de T a partir del colesterol (Martin y cols, 1990). El retículo endoplásmico rugoso también está disperso en la célula y se interconecta con el liso. Las mitocondrias son de tamaño moderado y contienen crestas de forma laminar así como tubulares. El aparato de Golgi se encuentra sumamente desarrollado, y en las CL se presentan gotas de lípidos, lisosomas, cristales de Reinke, así como típicos cambios en la morfología nuclear (Connell y Connell, 1977).

1.4. COMPARTIMIENTO TUBULAR (TÚBULOS SEMINÍFEROS).

Los túbulos seminíferos están rodeados por una capa basal de tejido conectivo laminar que contiene fibras elásticas y células epiteloideas aplanadas, las cuales presentan una apariencia semejante a las células musculares, por lo que son llamadas *células mioideas* o *células contráctiles peritubulares*. Estas células contráctiles están bien adheridas por sus bordes y de esa manera forman una lámina continua alrededor del epitelio (Bloom y Fawcett, 1990).

El epitelio seminífero es un epitelio estratificado complejo compuesto de dos tipos celulares básicos: células de Sertoli (CS) y células de la línea germinal (Fig 3).

Las CS son una población no proliferante en la cual cada célula se extiende desde la membrana basal hasta la luz del túbulo seminífero; en cuanto a su estructura, estas células son cilíndricas, pero tienen complejas prolongaciones apicales y laterales que rodean a las células espermatogénicas adyacentes y llenan los espacios vacíos entre ellas. Debido a su íntima asociación con estas células, se ha postulado que funcionan como nodrizas, proporcionando soporte estructural y metabólico para el desarrollo y diferenciación de las células espermatogénicas (Jégou, 1992).

El núcleo de las CS, de cromatina laxa, puede ser ovoide o triangular y puede presentar una o más escotaduras profundas; su forma y localización son variables. El retículo endoplásmico liso es abundante, el retículo endoplásmico rugoso es poco extenso y las mitocondrias son esferoidales o alargadas. El aparato de Golgi se encuentra bien desarrollado y hay una gran cantidad de microtúbulos, lisosomas, inclusiones lipídicas, vesículas, gránulos de glucógeno y filamentos delgados. En los humanos el citoplasma basal también contiene los característicos *cristaloides de Charcot-Boettcher* (Schulze, 1974).

Las CS adyacentes están unidas entre sí por un tipo de unión inusual. El complejo de unión de las CS está formado por: una *zonula occludens* muy firme de cincuenta o más líneas paralelas de fusión de

las membranas adosadas; cisternas aplanadas del retículo endoplásmico que son paralelas a la membrana plasmática a la altura de la zonula occludens, y haces de filamentos de actina con patrón de corte hexagonal que se interponen entre las cisternas del retículo endoplásmico y la membrana plasmática de las células. El retículo endoplásmico asociado con el complejo de unión posee ribosomas sólo en su superficie citoplasmática que no mira a la membrana celular. Otros tipos de unión descritos en las CS son: los *nexos maculae* comunicantes, los hemidesmosomas, y los complejos pseudodesmosómicos entre CS y las células espermatogénicas circundantes en sus fases iniciales de su desarrollo (Jégou, 1992).

Los complejos de unión Sertoli-Sertoli dividen al epitelio seminífero en dos compartimentos: uno *basal*, que contiene a las espermatogonias y los espermatoцитos jóvenes, y uno *adluminal*, que contiene a los demás espermatoцитos y a las espermátides. La compartimentalización del epitelio seminífero permite a las CS establecer microambientes en los cuales las células espermatogénicas experimentan la meiosis y otros fenómenos diferenciativos. Estudios morfológicos y fisiológicos han establecido que los complejos de unión Sertoli-Sertoli forman la *barrera hematotesticular* (Ross y Romrell, 1992) a la cual se le han asignado diversos papeles, tales como promover la cohesión y citoarquitectura del epitelio seminífero, la construcción de un microambiente físico-químico requerido para el proceso meiótico y la espermatogénesis y la prevención de contactos entre antígenos de superficie específicos entre espermátidas y espermatoцитos primarios en profase, y el sistema inmune (1975; Waites y Gladwell, 1982; De Kretser y Kerr, 1988).

Esta compartimentalización del epitelio seminífero permite a las CS establecer microambientes; de esta manera entre los dos tipos celulares del túbulo existen múltiples interacciones bidireccionales que pueden ser mediadas por contacto directo célula-célula y/o a través de factores paracrinos difundibles que son requeridos para el control de la multiplicación, reducción meiótica y maduración de las células germinales, es decir, para el mantenimiento de la función testicular y el proceso de la espermatogénesis (Saez y cols., 1983).

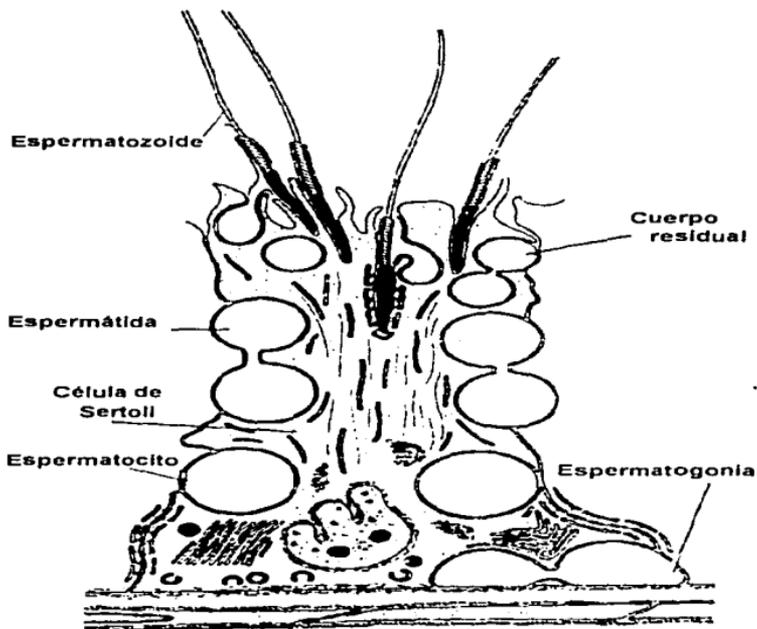


Fig 3. Esquema que muestra el corte del epitelio seminífero y la relación entre las células germinales y células de Sertoli. Tomado de Martin Dym 1977.

Las células espermatogénicas constituyen una población proliferante formada por células en diversas fases de un proceso diferenciativo complejo. Las células más inmaduras se localizan junto

a la membrana basal y a medida que proliferan y se diferencian, las células se mueven hacia la luz del túbulo seminífero (Fig. 4).

De manera general el proceso de espermatogénesis se encuentra dividido en tres fases principales:



Fig. 4 Corte de un testículo humano. Los túbulos muestran diferentes fases de la espermatogénesis. Tomado de Blomm y Fawcett, 1990.

1.- Fase espermatogónica o de espermatocitogénesis:

La espermatogonia que se encuentra contigua a la membrana basal es una célula relativamente pequeña, cuyo núcleo tiene cromatina irregular y forma acúmulos gruesos. Generalmente, se describen dos tipos principales de espermatogonias, ya que cuando el individuo alcanza la madurez sexual, las espermatogonias experimentan sucesivas mitosis y la células así formadas tienen una doble alternativa: pueden continuar semejantes a la célula madre y experimentar nuevas mitosis siendo por lo tanto una fuente de espermatogonias de tipo A, o cesan de dividirse y crecen, volviéndose mayores que las espermatogonias, recibiendo entonces el nombre de espermatogonias de tipo B, y cuando éstas se dividen por mitosis, producen células hijas que acaban diferenciándose para transformarse en espermatocitos primarios.

2.- Fase espermatocítica o meiótica:

La división celular que ocurre en los espermatocitos primarios es una reducción por división o meiosis, en donde todos los cromosomas (pares sinápticos) van a parar a los polos opuestos del huso, a diferencia de la mitosis somática en que los cromosomas individuales se dividen y se separan la mitad de los cromosomas. Como resultado de la división meiótica, la mitad de los cromosomas pasan a cada célula hija o espermatocito secundario. La división meiótica también es peculiar en que la citocinesis es incompleta, y las dos células hijas que resultan de la división del espermatocito primario permanecen conectadas por un puente de protoplasma. Los dos espermatocitos secundarios unidos más tarde se dividen por mitosis, y las cuatro células resultantes llamadas espermátides permanecen en un acúmulo sincicial, dado que de nuevo la citocinesis es incompleta.

Los espermatocitos secundarios tienen aproximadamente la mitad del tamaño de los espermatocitos primarios, se encuentran más próximos a la luz del túbulo y pocas veces se observan en cortes de túbulos seminíferos pues se dividen con rapidez, dado que inmediatamente comienza la segunda división meiótica. De este resultan las espermátidas, que son células que presentan un número haploide de cromosomas.

3.- Espermioogénesis:

Cada espermátida, localizada cerca de la luz del túbulo, sufre una serie de modificaciones citológicas que dan origen a la formación de los espermatozoides. Durante este proceso, el complejo de Golgi produce una vesícula que contiene una partícula densa: el acrosoma. Esta estructura vesicular, el casquete cefálico acrosómico se moviliza junto con el complejo de Golgi en dirección al núcleo, adosado a él y cubriendo parte de su superficie como una caperuza.

Simultáneamente, los centriolos se modifican, de uno de ellos surge un flagelo que formará la cola del espermatozoide, mientras que el otro emigra y forma un anillo en torno a la cola. Al mismo tiempo, el citoplasma se desplaza en dirección al flagelo, cubriéndolo parcialmente. Gradualmente las mitocondrias se dirigen hacia el flagelo, disponiéndose alrededor de la parte inicial de la cola del espermatozoide. Por último, el núcleo se aplana y adopta forma alargada. Al completarse la diferenciación de la cola, el espermatozoide elimina el exceso de citoplasma, en forma de una masa anucleada rodeada por membranas y a la que se le llama cuerpo residual (Fig. 5).

La espermatoogénesis ha sido ampliamente estudiada en roedores de laboratorio, donde muestra un grado de orden y regularidad (Fawcett, 1975; De Kretser y Kerr, 1988). Las diferentes fases del desarrollo de las células germinales se encuentran en diferentes niveles del epitelio germinal, con las células madre situadas en la base y las células más diferenciadas localizadas en niveles más altos.

Las células de fases diferentes del desarrollo no están distribuidas al azar dentro del epitelio, sino que aparecen en un cierto número de asociaciones o combinaciones bien definidas y fáciles de reconocer. En la rata, por ejemplo, las asociaciones celulares o estadios pueden ser observados en forma continua; las células pasan sucesivamente por 14 estadios y luego se repite la asociación inicial (Kerr 1988; Ueno y Mori, 1990).

Esta serie de cambios entre los aspectos de la misma asociación celular se denomina ciclo del epitelio seminífero. En los humanos se han encontrado 6 estadios (Kerr y De Kretser 1981) ; en el ratón (Van Pelt y de Rooij, 1990) y el mono hay 12 (Caviacchia y Dym 1977).

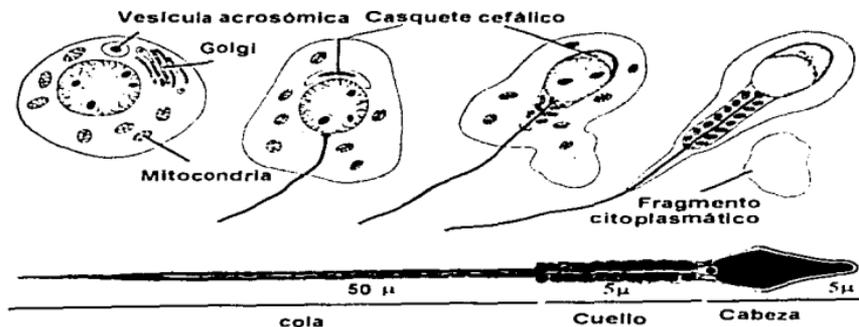


Fig 5 Principales modificaciones que sufren las espermátidas durante la espermiogénesis. Tomado de Leeson 1992.

En todas las especies, a excepción del hombre, una asociación determinada ocupa un segmento relativamente largo del túbulo seminífero. Por lo tanto, un corte transversal de un túbulo incluye sólo un tipo de asociación celular. En los túbulos humanos, las asociaciones celulares a lo largo del túbulo adoptan formas irregulares por lo que, un corte transversal deja ver dos o más asociaciones celulares distintas.

Estudios realizados con timidina tritiada, que se incorpora a las células en división mitótica o meiótica durante la síntesis del ADN, han demostrado que en el hombre el ciclo del epitelio seminífero tiene una duración constante de 16 días, y se ha calculado que una espermatogonia requiere 74 días para completar el proceso de espermatogénesis.

1.5. EJE DE REGULACIÓN HIPOTÁLAMO - HIPÓFISIS - TESTÍCULO.

En la figura 6 se representa de manera esquemática como la función testicular es regulada por dos hormonas gonadotrópicas, sintetizadas y secretadas por la hipófisis anterior, la hormona estimulante del folículo (FSH), que influye sobre la actividad de las CS y la hormona leutinizante LH que a su vez controla la actividad secretora de las células de Leydig. La secreción de estas hormonas es a su vez regulada por el hipotálamo, por medio de un decapeptido denominado hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH).

El GnRH llega a la adenohipófisis a través de la sangre circulante de los capilares y vénulas del sistema porta hipotálamico-hipofisiario y se une a los gonadotropos, induciendo así la síntesis y liberación de las gonadotropinas, las cuales llegan a las gónadas a través del torrente sanguíneo.

La cantidad de hormona liberadora presente en este sistema depende de señales reguladoras recibidas por receptores específicos a nivel del núcleo supraóptico hipotalámico, como un mecanismo de retroalimentación.

Las gonadotropinas hipofisiarias secretadas modulan su actividad uniéndose a sus receptores en las membranas plasmáticas de sus células blanco; el resultado es la activación de la adenilato ciclasa y el incremento de la concentración intracelular de la producción del 3',5'-adenosin monofosfato cíclico (AMPC), desencadenando cambios en los patrones de fosforilación proteica mediados a través de la acción de proteincinasas de tipo A, y modificaciones en las funciones particulares de cada tipo celular.

La LH se une a los receptores específicos en la membrana plasmática de las CL y estimula la producción de testosterona. La señal intracelular de esta acción es el AMPC. Este nucleótido se une a una subunidad catalítica libre. Las proteincinasas, al ser estimuladas por la LH catalizan la fosforilación de algunas proteínas intracelulares, activando la secuencia de eventos involucrados en la biosíntesis de esteroides.

La liberación de LH por parte de la adenohipófisis es regulada por la concentración sérica de T mediante un mecanismo de retroalimentación negativo. Esto ocurre a través de la acción inhibitoria directa sobre la adenohipófisis o bien mediante una inhibición de la síntesis hipotalámica de GnRH (Cheng y cols., 1976).

Por otra parte, la FSH se une a los receptores específicos en las CS activando la síntesis de varias proteínas, entre ellas la proteína unidora de andrógenos (ABP), la transferrina, el activador de plasminógeno y las testinas, y estimulando también la síntesis de estradiol (E) (Steinberger y Steinberger, 1977, Jegou, 1992).

La ABP es secretada al lumen del túbulo seminífero y en este proceso la T, producida por las CL, es transportada en concentraciones muy altas al sitio de la espermatogénesis. Aunque el GnRH regula la liberación de FSH existen evidencias de que sustancias producidas por las CS al parecer intervienen también en la regulación hormonal del aparato reproductor masculino. Por ejemplo, la inhibina, un factor glucoproteico de origen testicular con un peso molecular de entre 10 000 y 30 000 Da que se ha aislado de CS cultivadas, inhibe la secreción de FSH mediante acción directa sobre la hipófisis anterior.

Las CS producen inhibina, que a su vez retroalimenta negativamente a la hipófisis anterior para inhibir la producción de FSH en esta forma el ciclo de retroalimentación mantiene una velocidad constante en la producción de hormonas requeridas en la espermatogénesis, sin caer en la subproducción, que es necesaria para el mantenimiento de la función reproductora masculina (El Safoury y cols., 1974).

Diversos mecanismos de retroalimentación mantienen las concentraciones normales de hormonas en el torrente sanguíneo, siendo regulada la síntesis y secreción de las gonadotropinas por la compleja interacción entre hormonas sexuales y otros productos de secreción tubular, el sistema nervioso central y la unidad hipotálamo-hipófisis (Wilson y Foster, 1992).

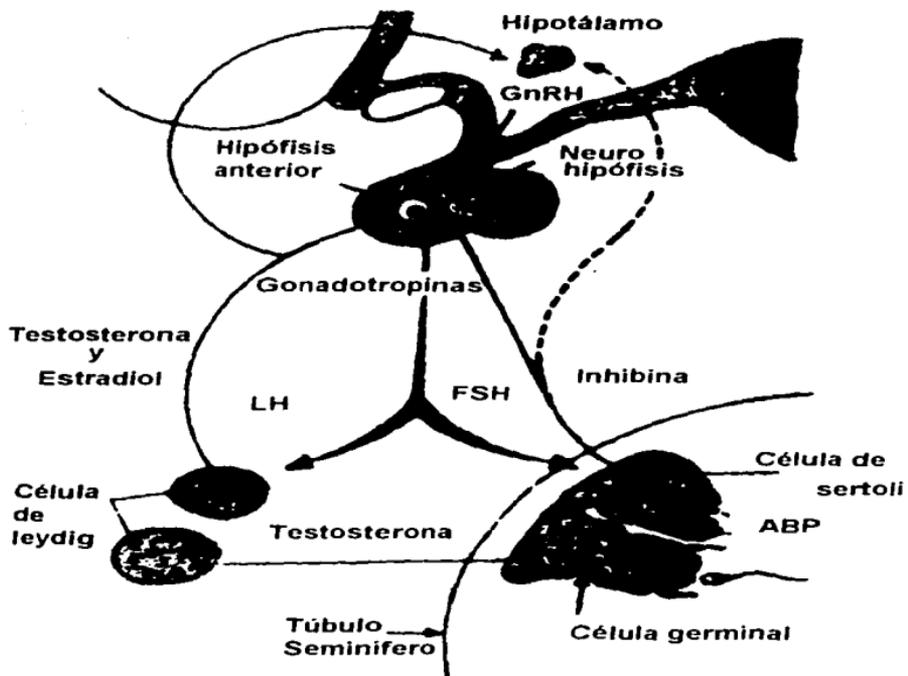


Fig.6 Eje de regulación Hipotálamo-Hipófisis-Gónada. modificado de Pescovitz 1994.

1.6. ESTEROIDOGÉNESIS TESTICULAR.

La esteroidogénesis testicular ha sido ampliamente estudiada con la finalidad de encontrar caminos o rutas predominantes en la biosíntesis de las hormonas, obteniéndose una gran cantidad de datos acerca de los compuestos intermediarios y sistemas enzimáticos involucrados. En este contexto es importante señalar que a partir de las observaciones que han sido realizadas sobre el metabolismo esteroidogénico se han encontrado dos vías biosintéticas denominadas de los intermediarios Δ^4 y Δ^5 (Hall, 1970) (Fig 7).

La T al igual que todas las hormonas esteroideas es sintetizada del colesterol que es en turno, formado del acetato. Este colesterol esteroidogénico es proporcionado en parte de la síntesis local del acetato y en parte del colesterol importado de las lipoproteínas plasmáticas (Gwynne y cols 1985). Sin embargo, el primer paso considerado como parte de las vías esteroidogénicas es la formación de la pregnenolona (PREG) a partir del colesterol, esta reacción es realizada en el compartimiento mitocondrial de las CL.

En esta conversión, el colesterol pierde la cadena lateral en dos etapas por dos citocromos P450, en donde un fragmento de 6 átomos de carbono es removido por el citocromo P450 C_{27SCS} y un fragmento de 2 átomos de carbono por el citocromo P450C_{21SCC} requiriendo además NADPH, oxígeno y una cadena de transporte electrónico activa (Hall y cols, 1975) . Como resultado de este reacción se obtienen los intermediarios 22-OH colesterol, 20,22-hidroxicolesterol con la consiguiente formación de pregnenolona e isocaproaldehído que son liberados hacia el compartimiento microsomal o citosólico, donde existen las enzimas de la vía esteroidogénica que cataliza la transformación de PREG a T.

Considerando la secuencia de los Δ^4 la PREG es transformada a progesterona por la acción de las enzimas 3 β -hidroxisteroide dehidrogenasa (3 β -OHS) y por la Δ^4 - Δ^5 isomerasa. Posteriormente la enzima 17 α -hidroxilasa y la C₁₇₋₂₀ liasa asociadas al retículo endoplásmico liso en actividad con el citocromo P450 promueven la conversión de progesterona a 17 α -hidroxiprogesterona (17-OH Prog)

y Androstendiona (A) respectivamente. Por último una reducción del grupo cetona por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa produce la T.

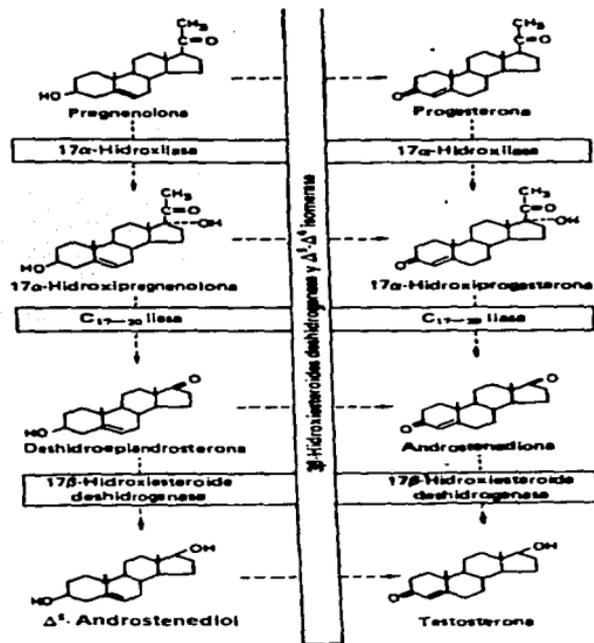


Fig. 7 Vías de la biosíntesis de la testosterona. La vía de la izquierda se denomina la Δ^5 o vía de la deshidroepiandrosterona; la vía al lado derecho se denomina la vía Δ^4 o de la progesterona. tomado de Martin Δ . W. 1986.

Al parecer la ruta Δ^4 es preferida en los humanos y es predominante en un número importante de especies durante la etapa adulta, incluyendo a la mayoría de los roedores.

Así también, se han proporcionado evidencias que apoyan la existencia de una vía alternativa denominada de los Δ^5 , que involucra la presencia de los intermediarios 17α -Hidroxipregnenolona (17-OH PREG) Deshidroepiandrosterona (DHEA) y Δ^5 Androstenediol (Diol), que también puede operar en diversas especies.

Ambas vías son operante en diversas especies en mayor o menor proporción y la prioridad que presente alguna ruta esteroidogénica determinada dependerá de la especie, la edad, la estacionalidad reproductiva, así como de otra serie de factores que aún no han sido completamente definidos (Samuels y Cols, 1975).

1.7.INTERACCIONES CELULAS DE LEYDIG--CELULAS DE SERTOLI (REGULACIÓN PARACRINA).

Aunque el principal regulador endocrino de la función testicular es el eje hipotálamo-hipófisis-testículo, se han mostrado indicios sobre la presencia de interacciones paracrinas entre las CL y las CS. Históricamente, las primeras evidencias de la comunicación local ente los túbulos seminíferos y las CL fue realizado por Johnson y Ewing en el año de 1971, quienes mostraron que la FSH incrementa la producción de T en el testículo de conejo perfundido cuando es sometido a dosis máximas de LH. Para respaldar el papel de FSH en el desarrollo de las CL, tanto en humanos como en la rata, se ha tratado de establecer una correlación entre las concentraciones séricas de FSH y la respuesta esteroidogénica de las CL durante la maduración sexual (Odell y Swerdloff, 1976; Sizonenko y cols, 1973).

Al respecto, diversos resultados experimentales han indicado que algunos productos secretados por el túbulo seminífero modifican la función celular de las CL. Por ejemplo, se ha observado que tratamientos de FSH a ratas hipofisectomizadas inmaduras no solamente estimulan el crecimiento del túbulo sino también causan hipertrofia e hiperplasia de las CL incrementando tanto el número de

receptores de LH testicular como la respuesta esteroideogénica de estas células a LH (Moger y Murphy, 1982; Kerr y Sharpe, 1985).

Sin embargo, estas observaciones han sido objeto de un gran debate, debido a que las preparaciones de FSH utilizadas en estos ensayos se encontraban contaminadas con LH, pero recientes estudios utilizando LH altamente purificada, indican que la administración de FSH a ratas inmaduras hipofisectomizadas pueden incrementar los niveles de RNAm y el número de sus receptores, además de modificar la respuesta esteroideogénica de las CL (Vihko y cols. 1991; Ruseell., 1993).

Existen evidencias de que daños producidos experimentalmente en las CS repercuten en la morfología celular de las CL y su capacidad esteroideogénica, estos daños han sido inducidos por exposición a rayos X (Rich y De Kretser, 1979), criptorquidia (De Kretser y cols., 1979, Kerr y cols., 1979a, 1979b), deficiencia de vitamina A (Huang y cols., 1984), ligaduras aferentes (Risbridger y cols., 1981), o tratamientos térmicos (Sharpe R.M. 1986; Saez y cols., 1987).

Por ejemplo, Aoki y Fawcett (1978) mostraron que implantaciones locales de sustancias antiandrogénicas producen atrofia de los túbulos seminíferos y este daño está asociado con la hipertrofia de las células intersticiales que están confinadas a la vecindad del implante. Estos resultados parecen indicar la existencia de un mecanismo local de control de las CL.

Las principales modificaciones funcionales provocadas *in vivo* en las CS de estos animales fueron: reducción en la producción de ABP, un incremento en los niveles séricos de FSH y LH así como cambios morfológicos que involucran la acumulación de gotas de lípidos, alta vacuolización y cambios en el retículo endoplásmico liso. Por otra parte, las CL presentaron hipertrofia y un incremento en el contenido de organelos, particularmente de mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico liso. Los niveles de T permanecen normales o disminuyen y los niveles plasmáticos de LH se vieron incrementados (Risbridger y cols., 1981a, 1981b).

La naturaleza de los factores responsables del incremento en el tamaño celular de las CL y su capacidad esteroidogénica aún es desconocida, pero existen algunos probables candidatos para este papel tales como el estradiol (E), ya que las CS tienen la capacidad de producir este esteroide en respuesta a FSH, además de que las CL tienen receptores para esta hormona (Brinkmann y cols., 1972). Sin embargo, en modelos de rata adulta, los niveles de E disminuyen con el incremento de la capacidad esteroidogénica en CL y en otras especies el E no tiene efecto alguno (Benhamed y cols., 1982; Saez y cols., 1983).

Cultivos de las CL con segmentos de túbulos seminíferos en un estado específico del ciclo espermatogénico sugieren que el estadio VII del túbulo seminífero regula positivamente la producción de T (Parvinen y cols., 1984) aunque se ha reportado también que estos estadios pueden ejercer el efecto opuesto. (Syed y cols., 1985; Vihko y Huhtaniemi., 1989). Sin embargo, en recientes estudios utilizando el modelo de rata con deficiencia de vitamina A no se ha encontrado diferencia alguna en la concentración de T producida por CL en presencia del fluido tubular seminífero en los estadios VII-VIII y XII-XIII. (Roberts y Zirkin., 1991).

Otros estudios han sido realizados para investigar las interacciones entre CS y CL y el mecanismo por el cual LH estimula a las CL. En sistemas *in vitro* se ha observado que tanto el fluido intersticial como el medio condicionado de las células de Sertoli (MCCS) tienen influencia sobre la actividad esteroidogénica de CL incrementando la producción de T a través de un efecto no específico (Parvinen y cols., 1984). La secreción de este factor o factores, que es probablemente una proteína, es incrementada por tratamientos previos de las CS con FSH (Perrard-Sapori y cols., 1986).

Otro posible modulador paracrino es el factor testicular liberador de la hormona luteinizante (LHRH) que media la función del testículo por modulación de la permeabilidad capilar y la secreción de T (Sharpe y Harmor., 1983); sin embargo, observaciones recientes indican que ni el factor estimulador presente en el fluido intersticial (Sharpe y cols., 1984; Sharpe., 1990) ni el encontrado en los MCCS es LHRH (Verhoeven y Cailleau., 1985).

Otros autores han descrito la actividad de un factor estimulador de las CL producido por los túbulos seminíferos de testículos humanos o de rata o por cultivos primarios de CS, que parece incrementar la síntesis de T en cultivos primarios de CL en períodos cortos de incubación (4-5 h); al parecer este factor estimula una etapa temprana en la vía esteroidogénica, bloqueando la conversión de los precursores C-21 en andrógenos (**Papadopoulos y cols., 1987**).

Así mismo, se ha reportado la existencia de un factor secretado por túbulos seminíferos proveniente de ratas adultas que inhibe la esteroidogénesis dependiente de LH *in vitro* durante períodos cortos de incubación (**Syed y cols., 1988**).

Además de estos efectos agudos sobre la esteroidogénesis, las CS parecen tener efectos tróficos a largo plazo sobre las CL, lo cual se ha observado en cultivos primarios de CL de cerdo en presencia de MCCS que previamente han sido cultivadas en presencia de FSH e insulina observándose la disminución tanto en el número de receptores para hCG como la respuesta esteroidogénica asociada a esta estimulación (**Perrard-Sapori y cols., 1987**).

Las CS de rata y cerdo secretan más de 80 proteínas, algunas de las cuales son reguladas por FSH pero muy pocas han sido identificadas debido a las dificultades de aislamiento y purificación de estos factores.

La identidad molecular de los factores responsables de la modulación paracrina de la esteroidogénesis no se conoce claramente, ya que han reportado que el factor activo en MCCS en humano y rata pesa 10-30 KD, (**Caillaud J, 1985, Verhoeven., 1987**) mientras que **papadopoulos, Cheng y cols (1993)** reportan que el factor en humano pesa cerca de 80 KD. Un tercer grupo mostró que tres diferentes proteínas tienen la habilidad de estimular la esteroidogénesis de las CL. Una de estas proteínas pesa entre 17-20 KD y ha sido parcialmente purificada. Por otra parte los túbulos seminíferos de rata en estados IX-XI secretan un factor en rango de 30-100 KD el cual inhibe la producción de T, AMPc y hcG (**Roberts y Zirkin, 1991**).

Otro factor de naturaleza inhibitoria ha sido parcialmente purificado del medio condicionado de la línea celular clonada de Sertoli TM-4. El pretratamiento de CL de rata con este factor disminuye a las 24 horas en una forma dosis dependiente, el efecto estimulador de hCG y toxina de cólera en la producción de AMPc y T. Sorprendentemente, el factor disminuye el efecto de forscolina en la producción de AMPc, pero no en la producción de T (Zwain y cols., 1991).

Nuestro grupo de trabajo ha reportado la presencia de un factor modulador de la esteroidogénesis en MCCA (Herrera y cols., 1996), de naturaleza presumiblemente proteica y con un peso molecular aproximado de 20 a 25 Kda, (Ruiz Paniagua, 1994) que provoca la disminución en la síntesis de T y una acumulación paralela de PREG en cultivos primarios de CL mantenidos *in vitro* durante un máximo de 48 horas (García Castro y Rodríguez Maldonado, 1989; Bustos, 1991).

Por otra parte, la naturaleza del o de los factores involucrados en estas interacciones aún no ha sido determinado, aunque algunos factores de naturaleza inhibitoria que ya han sido descritos son de naturaleza proteica oscilando entre los diez y treinta KDa (Syed y cols., 1988). Sin embargo, existen múltiples interacciones entre las células testiculares, cuyo papel potencial en el control paracrina de la función testicular aún es desconocido, al igual que el momento en el cual los mecanismos regulatorios son ya funcionales en la vida del animal.

Puede mencionarse que para que pueda llevarse a cabo adecuadamente el crecimiento, diferenciación y mantenimiento de la función testicular, deben tomarse en cuenta una serie de interacciones entre los elementos celulares germinales y somáticos. Estas interacciones estarán mediadas principalmente por hormonas y/o factores de crecimiento, que se encuentran presentes en algunas ocasiones desde la vida fetal o neonatal, o bien que adquieren importancia a lo largo de la vida temprana del animal (Wilson y Foster., 1992).

Así, p.ej., el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis en animales prepuberales y adultos requiere de factores de crecimiento locales que son regulados espacial y temporalmente durante el desarrollo gonadal (**Bellvé y Zheng, 1989**). Es muy probable por lo tanto, que también la función esteroideogénica testicular se encuentre regulada de manera diferente de acuerdo a la edad y el estado fisiológico del animal, como lo han sugerido múltiples autores (**Sharpe, 1990; Wilson y Foster, 1992**).

II. JUSTIFICACION.

En la actualidad se conoce de la existencia de las interacciones paracrinias en los compartimientos testiculares por lo que es reconocido ampliamente que las células de Leydig presentes en la porción intersticial interactúan estableciendo un eje de regulación con las células de Sertoli ubicadas en el compartimiento tubular. Diferentes grupos de trabajo han desarrollado varios modelos experimentales para aportar evidencias sobre este tipo de regulación por lo que se ha mostrado que las CS son capaces de modular la actividad funcional de las CL modificando su respuesta esteroidogénica.

Trabajos recientes han contribuido a la comprensión de los mecanismos de control de esta interacción paracrina testicular utilizando fracciones celulares enriquecidas, cultivos primarios, o medios condicionados de las CS y CL cultivados en ausencia o presencia de FSH, Insulina o diversos factores de crecimiento celular de donde se ha propuesto la existencia de uno o más factores que tienen la capacidad de modificar la esteroidogénesis de las CL tanto en forma inhibitoria como estimuladora, dependiendo de la metodología utilizadas.

Por lo anterior hay que considerar que el efecto evocado por las CS sobre las CL es diverso, lo cual puede atribuirse a las diferentes condiciones experimentales empleadas, tales como, la composición del medio de cultivo, el tipo de sustrato o la fuente celular utilizada así también es importante mencionar que en los trabajos anteriores no se ha hecho un estudio en el cual se de un seguimiento de esta actividad reguladora a lo largo del desarrollo del animal por lo que, tomando esto en consideración, el presente trabajo tuvo la finalidad de evaluar el efecto de la edad, de los animales de los cuales se obtuvieron los MCCS sobre la actividad esteroidogénica de las CL, contribuyendo de esta forma al estudio *in vitro* de la fisiología testicular.

III. HIPÓTESIS

El medio condicionado de células de sertoli obtenido de ratas prepúberes y adultas mostrará un efecto modulador disímil sobre la síntesis de pregnenolona y testosterona.

IV. OBJETIVOS

IV.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del medio condicionado de células de Sertoli (MCCS) obtenidas de ratas de diferentes edades sobre la actividad esteroidogénica de las células de Leydig (CL) de ratas adultas normales en cultivo primario.

IV.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

Obtener cultivos primarios enriquecidos en células de Sertoli (CS) de ratas de diferentes edades.

Evaluar el efecto del MCCS obtenido de ratas prepúberes y adultas a distintas dosis y tiempo sobre la síntesis de pregnenolona y testosterona en cultivo primario de CL de ratas adultas.

V. METODOLOGÍA.

V.1. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES TESTICULARES CRUDAS.

Los animales de experimentación fueron ratas macho normales de 20, 40, 60 ó 90 días de edad, mantenidas en el Bioterio de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, por períodos de luz-obscuridad de 12 hrs c/u, y alimentación y agua *ad libitum*.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente se les extirparon los testículos por vía abdominal. Los testículos fueron descapsulados y liberados de la vena central bajo condiciones de esterilidad; una vez descapsulados se lavaron con solución salina amortiguadora de Krebs (KRBG) - NaCl 125 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1 mM, Tris 35 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, pH 7.4 - a la que se le agrega glucosa al 0.2 % y gentamicina al 0.05 % (Mendieta, 1992). Cada par de testículos se colocó en 7 ml de KRBG-colagenasa (1 mg/ml) en baño con agitación a 37°C durante 18 minutos; al término de este período se suspendió la actividad de la enzima por dilución con 15 ml de solución salina isotónica y la suspensión celular se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

La suspensión celular se filtró a través de una malla estéril de nylon con un poro de 50 a 100 µm de diámetro. El filtrado (fracción intersticial cruda) se utilizó para la obtención de las CL mientras que el remanente en la malla (fracción tubular cruda) se trató para la obtención de la fracción enriquecida en CS (Bermúdez y cols, 1988).

V.2. PURIFICACION DE LA FRACCION INTERSTICIAL CRUDA.

Las células del filtrado se sedimentaron a 1500 x g durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de KRBG para ser colocado encima de 8 ml de una solución KRBG-Ficoll-albúmina sérica bovina (Ficoll 400 13%-

albúmina 0.2%, pH 6.5) y centrifugado a 1000 x g durante 15 minutos a 4°C. El segundo sobrenadante se desechó y el botón celular se resuspendió en medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dubecco (DME), sin suero o alguna otra adición.

Las células se contaron, para ajustar la densidad celular a 3×10^5 CL/ml en DME, y se sembraron en cámaras multipozos NUNC de plástico con un volumen de 2.5 ml por pozo (García Castro y Rodríguez Maldonado, 1989; Bustos, 1991).

V.3. PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN TUBULAR CRUDA.

Para obtener la fracción tubular enriquecida en CS, la fracción tubular cruda se fragmentó con un bisturí hasta obtener pedazos de aproximadamente 5 mm de longitud, los que se incubaron con 20 ml de KRBG-pancreatina (0.2 mg/ml) durante 20 min a 28°C, con agitación manual periódica.

La suspensión se dejó sedimentar durante 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y la suspensión celular se fragmentó mecánicamente, pasándola a presión a través de una aguja de un calibre de 20 ga. La suspensión se colocó posteriormente sobre un gradiente discontinuo de KRBG-sacarosa del 2 al 6% con intervalos de 1% para cada escalón, y se sedimentó a 1 x g durante 30 min a 4°C. Se recuperaron las fracciones correspondientes al 4 y 5% por aspiración, la suspensión se filtró a través de una malla y las células se sedimentaron por centrifugación a 1500 x g durante 2 minutos. El sobrenadante se desechó y el botón obtenido se resuspendió en DME, para realizar el conteo celular, ajustando la densidad a 2×10^5 CS/ml, para que las células fueran sembradas posteriormente en un volumen final de 10 ml en botellas de cultivo NUNC con una superficie de siembra de 25 cm².

La evaluación de la pureza en ambos tipos celulares, se realizó con tinción utilizando Fucsina ácida e identificando a las células por su morfología. Así también, se ha evaluado la capacidad de respuesta de las fracciones celulares, utilizando como parametro de respuesta la

producción de testosteronas para las CL y la producción de estradiol para las CS (*Síntesis de Novo*).

V.4. CULTIVOS CELULARES.

Los cultivos se mantuvieron en DME sin adición de suero, vitaminas, hormonas o cualquier otro factor. Las condiciones de cultivo fueron una atmósfera aire-CO₂ (95-5%) y 37°C de temperatura. Las CS de animales de 20, 40, 60 y 90 días de edad se cultivaron durante períodos de 36 hrs, mientras que las CL de animales adultos se preincubaron durante 24 hrs con DME, y al término de este período se sustituyó el medio original por MCCS de los animales de diferentes edades diluido a las proporciones de 1:2, 1:5, 1:10 o por DME fresco. Las CL se mantuvieron posteriormente en cultivo durante períodos de 12 y 24 hrs más, bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Cada uno de los bioensayos y puntos evaluados fueron realizado por triplicado.

V.5. CUANTIFICACIÓN HORMONAL MEDIANTE EL MÉTODO DE RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA).

Los medios de cultivo de las CL se recuperaron después de los correspondientes períodos de incubación y se procesaron para la cuantificación de PREG y T utilizando técnicas específicas de RIA (Bérmudez y cols., 1973; Herrera y cols., 1974) de la siguiente forma:

Alicuotas de 0.5 ml se transfirieron a tubos de vidrio, y se congelaron hasta el día de la determinación a -12 C. La fuente de anticuerpos fue un suero de conejo hiperinmunizado, con complejos hapténicos de albúmina sérica de bovino y los 19 hemisuccinatos correspondientes. Los ligandos marcados fueron PREG 1,2-³H y T 1,2,6,7,16,17-³H con actividades específicas de 42 Ci/mmol y 123 Ci/mmol respectivamente.

V.5.1 Preparación de la curva patrón.

Para la curva patrón se preparan soluciones etanólicas de concentraciones conocidas en diluciones progresivas de un orden de magnitud, a partir de una "solución madre" de concentración espectroscopicamente comprobada de 1mg/ml. Se eligieron rangos de sensibilidad para T y PREG de 0 a 1000 picogramos (pg). La curva patrón se preparó tomando volúmenes fijos de las soluciones mencionadas como se describe en la tabla I.

Se prepara una mezcla de ensayo en DME en forma de que en cada 100 μ l se tengan aproximadamente 5000 cuentas por minuto (cpm) del ligando marcado y anticuerpo suficiente para tener una dilución parcial 1:1000 para PREG y 1:2000 para T.

A cada tubo de muestra o de curva patrón se agregaron 100 μ l de la mezcla de ensayo, se agitaron para homogenizar la solución y que la dilución final del anticuerpo quedara 1:6000 para PREG y 1:12000 para T. Se dejaron icubar por 18 horas a 4 C para que se estableciera el equilibrio en la unión de ligandos, al término del periodo de incubación y para separar la fase unida de la libre, se agregaron 200 l de una suspensión de Carbón activado-Dextran T-70 (625-62.5 mg/100 ml), se agitaron y se sometieron a una fuerza de 1500x g a 4 C y durante 15 minutos; el sobrenadante se decantó a viales de conteo. Para la evaluación del contenido de radioactividad se utilizó un espectrofotómetro de centelleo líquido Beckman serie 7000. Todos los ensayos fueron evaluados bajo la misma curva patrón, la cual mostró un coeficiente de regresión de $r=0.9867$ para testosterona y $r=0.9498$ para pregnenolona.

tabla 1. Preparación de la curva patrón para la determinación cuantitativa de PREG y T

TUBO	SOLUCIÓN ESTANDAR	VOLUMEN	MASA AGREGADA
1-3	---	0	0
4-6	0.1pg/ μ l	0	0
6-9		10	1
10-12		25	2.5
13-15	1 pg/ μ l	5	5.0
16-18		10	10.0
19-21		25	25.0
22-24	10pg/ μ l	5	50.0
25-27		10	100
28-30		25	250
31-33	100pg/ μ l	5	500
34-36		10	1000
36-39	1000pg/ μ l	25	25000

V.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los resultados se realizó mediante la comparación de medias y varianzas de los grupos control y experimental; la significancia estadística de las diferencias se obtuvo por medio de la prueba de t - Student con 2 colas, para niveles de $P < 0.05$. Así también se utilizó análisis de varianza simple Seguida por Tukey.

VI RESULTADOS

OBTENCIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN CL Y CS

En el caso de la fracción intersticial cruda proveniente de ratas macho con una edad de 90 días partiendo de una composición inicial en CL del 6 % fue posible su purificación a través de una solución KRBG- Ficoll obteniendo una preparación final aproximada del 50% de pureza. Las células contaminantes presentes fueron células germinales tales como espermatoцитos primarios y espermatoгонias , sin una presencia apreciable de espermatozoides.

Para la fracción enriquecida en CS se utilizaron ratas macho de 20,40, 60 y 90 días de edad, en estas células el grado de pureza fue alrededor del 10 %, siendo las fracciones menos contaminadas aquéllas pertenecientes a una edad menor. Es importante recalcar que en esta fracción se detectaron espermátidas a partir de los 40 días de edad y espermatozoides a los 60 y 90 días pero no fue posible detectar la presencia de CL como contaminantes, por lo que a pesar de la escasa pureza obtenida fue posible evaluar de manera confiable las características metabólicas de ambos compartimentos *in vitro* de forma separada.

EFFECTO DE LA EDAD EN LA ACTIVIDAD MODULADORA DE LA ESTEROIDOGÉNESIS (AME)

Los resultados de este trabajo mostraron que el medio condicionado obtenido de la fracción enriquecida en células de Sertoli de ratas macho en distintas edades, tiene una actividad moduladora sobre la función metabólica de las CL en cultivo primario y además esta influencia varía significativamente dependiendo del estadio fisiológico de la rata.

Cuando a las CL se les estimuló con MCCS de ratas macho de 20 días de edad (tabla 2) se observó, un notable incremento en la producción de PREG por las CL. Cuando las diferentes dosis empleadas son comparadas con el control DME, es notable que tanto a las 12 hrs como a las 24 hrs de incubación después de haber sido adicionado el medio condicionado, hay un aumento significativo tanto

en la dilución 1:2 como en la dilución 1:5 lo cual no se presenta en la dilución 1:10.

Para cada una de las dosis empleadas, este efecto tiende a ser más marcado a las 24 hrs ya que los valores para la dilución 1:2 corresponden a 230.66 pg/ 10⁶ CL en comparación con el valor obtenido para el control DME el cual solo alcanzó un valor de 141.33 pg/10⁶ CL, lo que representa una diferencia del 63%.

Este efecto también es observado a las 12 horas cuando el MCCS es diluido en proporción 1:2 por lo que el valor cuantificado a esta dosis fue de 80.86 pg/10⁶ CL que corresponde a una diferencia del 45% en la producción de PREG respecto a su control. En lo que respecta a la dosis 1: 5 la concentración de PREG se incrementó un 25% y un 40% más que sus respectivos controles a las 12 hrs y 24 hrs respectivamente.

Cuando el MCCS fue obtenido de animales inmaduros con 40 días de edad (Tabla 3) se observa una tendencia a acumular más rápidamente PREG a las 24 horas de cultivo (88%) cuando el medio recuperado se encuentra diluido en una proporción 1:2, en comparación con el control y las diferentes dosis empleadas, ya que en ellas, esta tendencia es menos notoria debido a que sólo se logra un incremento en producción de PREG del 57 % a las 12 hrs de cultivo en la dilución 1:2 , el cual se ve disminuido en la dosis 1:5 hasta 20% las 12 hrs y hasta 40% a las 24 hrs siendo este nulo cuando el MCCS es diluido con DME en una proporción 1:10.

En el caso del cultivo que emplea MCCS obtenido de la fracción enriquecida en CS de la rata de 60 días de edad la acumulación de PREG sólo alcanzó un moderado incremento. La respuesta máxima evocada a esta edad fue del 52% a las 24 horas de cultivo para la dosis 1:2. Cuando los valores obtenidos a esta edad son comparados con el control DME para los tiempos evaluados, se observa un patrón diferente a lo observado en las edades anteriores, ya que la acumulación de PREG no es tan marcada lo que se corrobora en la dilución 1:5 donde solo se alcanza una acumulación de PREG alrededor del 20% (tabla 4).

En lo referente a las ratas adultas de 90 días, se presentó un incremento proporcional en la síntesis de PREG el cual alcanzó a máximo en los cultivos de CL tratados con MCCS de 12 y 24 hrs *in vitro* diluido a una proporción 1:2 con DME. Así también el efecto fue claro para la dilución 1:10 donde la concentración de PREG fue de 58.33 pg/10⁶ CL y de 201.53 pg/10⁶ CL para los tiempos anteriormente señalados, hay que mencionar que al igual que en las edades anteriores la dilución 1:10 no mostró diferencias significativas en comparación con el control DME.

La inhibición sobre la síntesis de T fue máxima a la edad de 20 días. Así por ejemplo a las 24 hrs de incubación correspondiente a la dosis 1:2 mostró aproximadamente un 65 % de inhibición comparado con la producción de T basal obtenida en estos ensayos. Las diferentes dosis produjeron efectos inhibitorios semejantes para todas las diluciones y tiempos en los MCCS de ratas de esta edad (tabla 6).

En el MCCS obtenido de ratas de 40 días la disminución de la producción de T fue similar a la respuesta evocada por el MCCS de las ratas prepúberes de 20 días a las 24 hrs de incubación para la dilución 1:2 la inhibición fue del 55%, siendo esta acción inhibidora muy marcada sobre la producción basal presente, cabe aclarar que en lo que respecta a la producción de T, al igual de lo que se presentó en los animales de 20 días al parecer existe una relación dosis-efecto entre las diluciones empleadas (tabla 7).

El efecto evocado por MCCS en la producción de T a los 60 días (tabla 8) el patrón de respuesta es menos marcado en las dosis empleadas tanto a las 12 hrs de cultivo como a las 24 hrs cuando los valores son comparados con el control DME y con valores obtenidos cuando el MCCS es recuperado de los animales de 20 y 40 días de edad. Así podemos ver que la inhibición de T fue del 50 % para la dosis 1:2 a las 12 hrs de incubación y para las 24 hrs de cultivo se obtuvo que el MCCS puede inhibir la producción de T hasta en 44%.

La actividad inhibidora de la síntesis de T a los 90 días en el caso de la dilución 1:2 fue de 611.00 pg/10⁶ CL (40 %) a las 12 hrs y de 1564.60 pg/10⁶ CL (44%) a las 24 hrs. Las dosis 1:5 a los mismos

tiempo evaluados presentó también diferencias significativas, Ya que la producción de T disminuyó cerca del 30% a los tiempos evaluados.

Así mismo la dosis 1:10 mostró un efecto inhibitorio del 15% a las 12 hrs de cultivo y de 22% a las 24 horas (Tabla 9).

La figura 8a muestra los cambios que se dan en la concentración de PREG en cultivos de CL obtenidas de rata adulta (90 días) cuando están en contacto con MCCS proveniente de rata en diferente estadio de desarrollo.

Tenemos que en la dosis 1:2 sólo el MCCS obtenido de ratas prepúberes (20 días) mostró diferencias significativas a las 12 y 24 hrs de cultivo . También se encontró que el MCCS obtenido de animales de 40 y 60 días solo hay diferencias a las 12 horas de cultivo. En cuanto a la producción de T (Fig.8b) a esta misma dilución, el MCCS ejerce una influencia diferente a lo observado en las ratas adultas cuando este es recuperado de la fracción enriquecida en CS de animales de 20 y 40 días de edad a las 12 y 24 horas de cultivo, por el contrario el MCCS proveniente de animales con 60 días no mostró una variación significativa respecto a los animales adultos.

Respecto a la dosis 1:5 únicamente hay cambios significativos respecto a la producción de PREG (Fig.9a) de la rata adulta con el MCCS proveniente de ratas prepúberes de 40 días para los dos tiempos evaluados, lo cual coincide con lo observado para la producción de T (Fig. 9b) a esta edad pero no para lo que se aprecia en respuesta del MCCS a los 20 días ya que también para esta dosis hay un cambio marcado en la producción de T tanto a las 12 como a las 24 horas.

En lo que toca a la dosis 1:10 (Fig.10a y 10b). El MCCS de rata adulta mostró una tendencia diferente respecto a las otras edades obteniéndose cambios significativos a la edad de 20 y 40 días a las 24 hrs y a los 60 días únicamente a las 12 hrs. Sin embargo este efecto no se correlacionó en la producción de T ya que en este caso no se observó diferencia alguna en las diferentes edades.

PRODUCCIÓN DE PREGNENOLONA

TABLA 2

DOSIS	TIEMPO	12 HRS		20 DÍAS DE EDAD	
		pg/10 ⁶ células	E.S.M.	pg/10 ⁶ células	E.S.M.
	CONTROL	55.73 ± 1.86		141.33 ± 4.20	
	1:2	80.86 ± 2.71 *		230.66 ± 7.57 *	
	1:5	69.86 ± 3.44 *		197.20 ± 6.31 *	
	1:10	58.06 ± 3.04		146.66 ± 7.77	

TABLA 3

DOSIS	TIEMPO	12 HRS		40 DÍAS DE EDAD	
		pg/10 ⁶ células	E.S.M.	pg/10 ⁶ células	E.S.M.
	CONTROL	69.46 ± 2.66		127.8 ± 6.80	
	1:2	109.63 ± 8.91 *		240.33 ± 9.22 *	
	1:5	83.33 ± 1.77 *		179.53 ± 6.24 *	
	1:10	44.43 ± 2.28		124.60 ± 2.40	

* Diferencias respecto al control (DME).

Tabla 2 y 3 Media ± E.S.M. de las concentraciones de pregnenolona en el medio de cultivo de Leydig tratadas con diferentes dosis de MCCS proveniente de ratas macho de 20 y 40 días de edad correspondiente a las 12 y 24 hrs de incubación *in vitro*. Los resultados están tabulados en Pg/10⁶ CL y representan los promedios de 3 bioensayos.

PRODUCCIÓN DE PREGNENOLONA

TABLA 4

60 DÍAS DE EDAD

TIEMPO	12 HRS		24 HRS	
	pg/10 ⁶ células	E.S.M.	pg/10 ⁶ células	E.S.M.
CONTROL	48.86 ± 1.17		162.06 ± 10.17	
1:2	64.60 ± 3.33 *		246.80 ± 11.15 *	
1:5	58.33 ± 1.95 *		201.53 ± 9.97 *	
1:10	48.86 ± 2.24		153.66 ± 5.73	

TABLA 5

90 DÍAS DE EDAD

TIEMPO	12 HRS		24 HRS	
	pg/10 ⁶ células	E.S.M.	pg/10 ⁶ células	E.S.M.
CONTROL	40.06 ± 4.68		151.00 ± 5.80	
1:2	76.33 ± 3.62 *		264.53 ± 10.17 *	
1:5	70.46 ± 6.42 *		213.06 ± 7.15 *	
1:10	59.13 ± 3.28		178.40 ± 5.80 *	

*Diferencias respecto al control (DME).

Tabla 4 Y 5 . Media ± E.S.M. de las concentraciones de pregnenolona en el medio de cultivo de Leydig tratadas con diferentes dosis de MCCS proveniente de ratas macho de 60 y 90 días de edad correspondiente a las 12 y 24 hrs de incubación *in vitro*. Los resultados están tabulados en Pg/10⁶ CL y representan los promedios de 3 bloensayos.

PRODUCCIÓN DE TESTOSTERONA

TABLA 6

20 DÍAS DE EDAD

DOSIS	TIEMPO	12 HRS		24 HRS	
		pg/10 ⁶ células	E.S.M.	pg/10 ⁶ células	E.S.M.
	CONTROL	1066.13 ± 24.00		2618.93 ± 72.31	
	1:2	424.26 ± 96.38 *		897.46 ± 50.17 *	
	1:5	506.66 ± 56.48 *		1435.26 ± 56.28 *	
	1:10	920.20 ± 31.88 *		2400.53 ± 46.91 *	

TABLA 7

40 DÍAS DE EDAD

DOSIS	TIEMPO	12 HRS		24 HRS	
		pg/10 ⁶ células	E.S.M.	pg/10 ⁶ células	E.S.M.
	CONTROL	1124.93 ± 84.37		2493.93 ± 109.62	
	1:2	494.06 ± 18.64 *		1137.26 ± 18.86 *	
	1:5	744.26 ± 35.04 *		1505.26 ± 27.64 *	
	1:10	867.80 ± 38.40 *		2000.33 ± 55.53 *	

*Diferencias respecto al control (DME).

Tabla 6 y 7 . Media ± E.S.M. de las concentraciones de testosterona en el medio de cultivo de Leydig tratadas con diferentes dosis de MCCS proveniente de ratas macho de 20 y 40 días de edad correspondiente a las 12 y 24 hrs de incubación *in vitro* . Los resultados están tabulados en Pg/10⁶ CL y representan los promedios de 3 bioensayos.

PRODUCCIÓN DE TESTOSTERONA
 TABLA 8.
 EDAD

60 DÍAS DE

DOSIS	TIEMPO	12 HRS	24 HRS
		pg/10 ⁶ células E.S.M.	pg/10 ⁶ células E.S.M.
	CONTROL	991.33 ± 36.73	2852.40 ± 272.95
	1:2	659.00 ± 8.17 *	1405.46 ± 109.28 *
	1:5	739.66 ± 27.08 *	1607.93 ± 98.84 *
	1:10	792.86 ± 19.15 *	2048.13 ± 172.86 *

TABLA 9
 EDAD

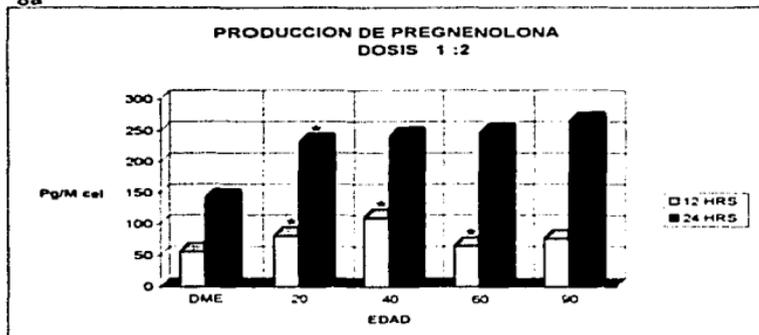
90 DÍAS DE

TIEMPO	TIEMPOS	12 HRS	24 HRS
		pg/10 ⁶ células E.S.M.	pg/10 ⁶ células E.S.M.
	CONTROL	1017.66 ± 36.73	2793.40 ± 272.95
	1:2	611.00 ± 8.17 *	1564.60 ± 109.28 *
	1:5	703.20 ± 27.08 *	1879.13 ± 98.84 *
	1:10	852.60 ± 19.15 *	2194.20 ± 172.86 *

*Diferencias respecto al control (DME).

Tabla 8 y 9. Media ± E.S.M. de las concentraciones de testosterona en el medio de cultivo de Leydig tratadas con diferentes dosis de MCCS proveniente de ratas macho de 20 y 40 días de edad correspondiente a las 12 y 24 hrs de incubación *in vitro*. Los resultados están tabulados en Pg/10⁶ CL y representan los promedios de 3 bioensayos.

8a



8b

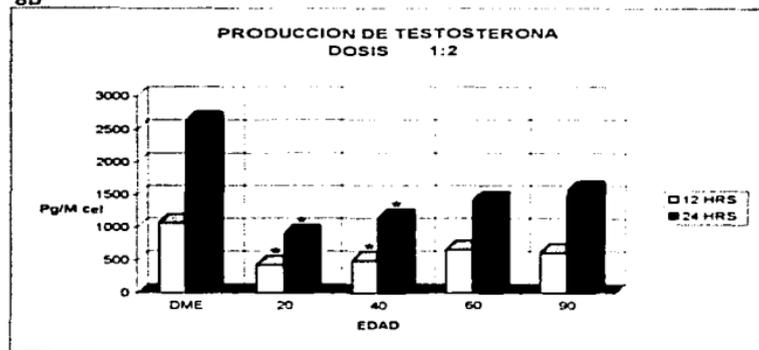
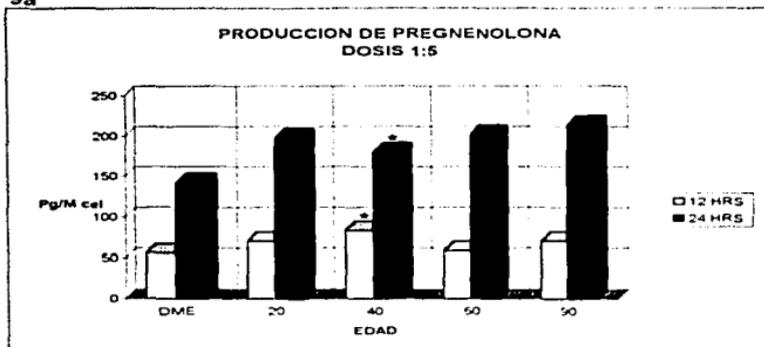


Fig 8a y 8b. Gráfica que muestra la Media \pm E.S.M. de las concentraciones para la dosis 1:2 de MCCS proveniente de ratas macho de 20, 40, 60 y 90 días. Correspondiente a las 12 y 24 hrs de incubación in vitro.

9a



9b

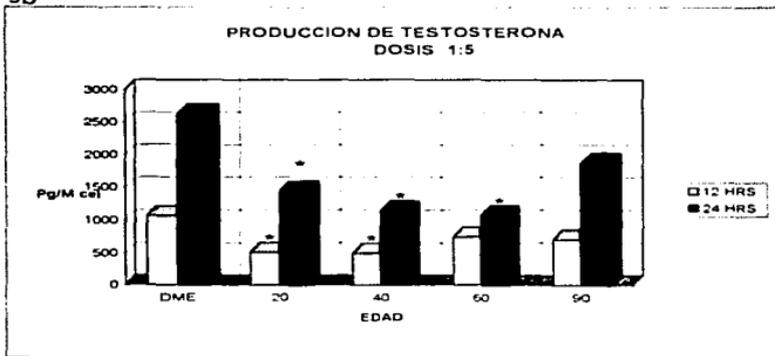
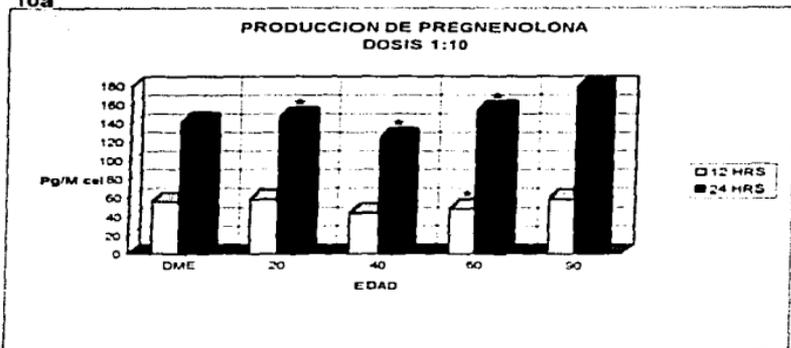


Fig 9a y 9b. Gráfica que muestra la Media \pm E.S.M. de las concentraciones para la dosis 1:5 de MCCS proveniente de ratas macho de 20, 40, 60 y 90 días. Correspondiente a las 12 y 24 hrs de incubación *in vitro*.

10a



10b

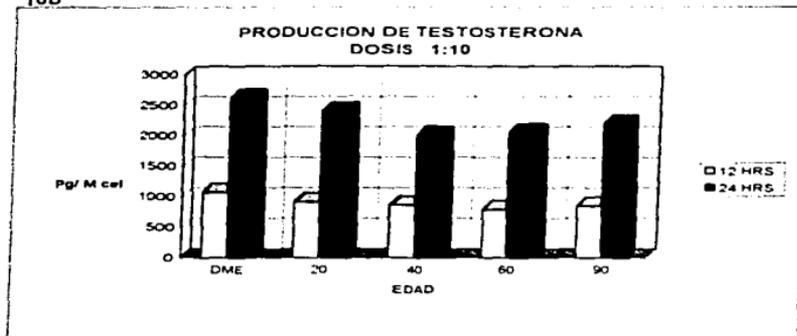


Fig 10a y 10b. Gráfica que muestra la Media \pm E.S.M. de las concentraciones para la dosis 1:10 de MCCS proveniente de ratas macho de 20, 40, 60 y 90 días. Correspondiente a las 12 y 24 hrs de incubación *in vitro*.

VII DISCUSIÓN

La respuesta de las células testiculares mantenidas *in vitro* varía en función de las condiciones de cultivo y la fuente celular utilizada ya que estas pueden provenir de animales en diferentes estados de desarrollo. En todos los modelos se ha propuesto la existencia de factores derivados de los túbulos seminíferos que tienen la capacidad de modificar la esteroidogénesis en CL en cultivo primario en forma tanto inhibitora como estimuladora (Saez y cols, 1987).

La mayoría de las investigaciones han usado organismos inmaduros con la finalidad de disminuir la contaminación de células germinales y cultivarlas en un alto grado de pureza ya que en etapas tempranas del desarrollo hay escasez de espermátidas y baja presencias de espermatoцитos. Así también, algunos autores han argumentado que a pesar de las diferencias en la edad, estas células se asemejan en cierto grado a su contraparte adulta ya que se ha demostrado que la mayoría de los polipéptidos secretados por ratas de 20 y 60 días de edad son similares. Sin embargo, también se ha documentado que las CS pasan por una maduración funcional y estructural durante el desarrollo puberal por lo que esta polémica se encuentra aun sin resolver (Skinner y Griswold, 1982).

Tomando en consideración lo anterior, nuestro grupo de trabajo ha utilizado como modelo de estudio fracciones celulares enriquecidas en CL y CS obtenidas de ratas adultas normales. Ambas fracciones enriquecidas no se encontraban significativamente contaminadas entre sí y tenían la capacidad de responder a la estimulación gonadotrópica específica por lo que fueron utilizadas para el establecimiento de cultivos primarios de corta duración, que han permitido iniciar la evaluación del efecto de los posibles reguladores paracrinos que participan en la modulación de la actividad esteroidogénica de las gónadas. (Bermúdez y cols 1988, Mendieta y cols, 1992).

Los datos previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo mostraron la existencia de una actividad moduladora de la esteroidogénesis presente en los medios condicionados de fracciones enriquecidas en CS de rata adulta (MCCS) de naturaleza proteínica, dada su termosensibilidad a temperaturas mayores o iguales a 70 °C

y a su inactivación por medio de tratamientos con enzimas proteolíticas como la tripsina y con un peso molecular aproximado de 20 a 25 kda, que provoca la disminución en la síntesis de T y una acumulación paralela de PREG en cultivos primarios de CL mantenidos *in vitro* durante un máximo de 48 horas (García Castro, Rodríguez Maldonado, 1989, Bustos 1991, Ruiz Paniagua, 1994).

Las CS provenientes tanto de animales inmaduros como maduros no han sido utilizadas de manera sistemática para estudiar su fisiología y comparar su comportamiento *in vitro*, por lo que el aportar evidencias sobre el papel que juegan los factores paracrinos es estas células asociados con los cambios maduracionales en turno, nos da indicios concernientes sobre este tipo de modulación durante el comienzo y mantenimiento de la espermatogénesis.

Por lo anterior, en este trabajo se empleó un modelo experimental en el que las condiciones de cultivo fueron basales, es decir, no se les adicionó ningún factor de enriquecimiento como hormonas, factores de crecimiento o suero como suplemento al medio de cultivo, lo cual fue constante en cada una de los tratamientos, tiempos y edades evaluadas y en donde las células mostraron una morfología adecuada.

Desde el punto de vista funcional, considerando la actividad esteroidogénica se observó que hubo un incremento significativo y más marcado a las 24 horas de incubación en los ensayos en los que no se utilizó el MCCS y los cuales son considerados los controles experimentales, por lo que la respuesta inhibitoria de la esteroidogénesis evocada por este medio en cada una de las edades utilizadas, no es producto de las condiciones experimentales descritas anteriormente.

Los datos experimentales muestran un efecto inhibitorio claro de los medios recuperados de cultivos primarios de CS provenientes de las ratas macho prepúberes (20 y 40 días), y adultas (60 y 90 días) sobre la síntesis de T en cultivos de CL de rata adulta normal hasta por un periodo de 24 horas, por lo que parece existir una relación dosis- efecto entre la dilución empleada del MCCS y la respuesta evocada por las CL a lo largo del periodo de incubación.

El efecto inhibitorio de la síntesis de T fue aparentemente más evidente cuando se utilizó el MCCS de ratas inmaduras de 20 días de edad sobre todo a las 24 horas de cultivo (Fig 8b). Otros autores señalan que a esta edad hay un efecto estimulador en la síntesis de esteroides.

Sin embargo, al establecer una comparación entre los modelos experimentales empleados se encontró que el MCCS producía incrementos en la producción de T cuando las CL eran estimuladas con LH o FSH (Liu Yixun , 1987) de forma dosis-dependiente (Janeki y cols ,1985; Papadopoulos y cols , 1987; Onoda,1991).

Así también, Verhoeven y Cailleau en 1986 utilizando MCCS obtenido de ratas a esta edad encontraron un factor proteico con peso molecular de 30 K-Da que incrementa la producción de T bajo estimulación de las CL con FSH.

En lo concerniente a las ratas de 40 días de edad nosotros encontramos que la inhibición de T es máxima a las 24 horas de cultivo donde alcanza un porcentaje aproximado de inhibición de 55% (Fig. 8b). Así también se obtuvo que la producción de T no varía respecto a lo obtenido a los 20 días de edad pero sí con la producción de testosterona de las ratas a los 60 y 90 días de edad. Por su parte Grotjan y Heindel reportan que el MCCS obtenido de ratas de 40 días realiza la producción de T basal de un 51% hasta el 97 % cuando ésta es comparada con los controles experimentales.

Como podemos ver un conjunto de factores hacen que la respuesta obtenida cambie en los diferentes modelos experimentales, razón por la cual, en el testículo durante el periodo prepúbereal, en cuanto aspectos relacionados con la modulación paracrina no se tiene una descripción de la secuencia de eventos que se establece durante el desarrollo, por lo que es conveniente mencionar que los datos con los que se cuentan han sido inferidos a partir de animales experimentales (Gondos,1980).

En el humano se ha descrito en cuanto a aspectos morfológicos testiculares que en el periodo prepúbereal, existen células preespermátogénicas, CS predominantemente en cordones seminíferos

y CL parcialmente diferenciadas, respecto a aspectos funcionales se tienen reportes de que el testículo responde a estímulos gonadotrópicos en cualquier periodo de su vida (Lordin y De Kretser 1974) por lo que el eje hipotálamo-hipofisis-gónada ya se encuentra establecido y CL pueden sintetizar T.

Dadas las condiciones anteriores es posible que en el período prepuberal se de una baja actividad metabólica, debido a que en este momento no se requiere de altas concentraciones para que se efectúe el proceso de espermatogénesis por lo que el factor encontrado a esta edad puede estar actuando como regulador fisiológico de los requerimientos testiculares a esta edad.

Hay que mencionar que en lo que se refiere a interacciones paracrin, no se reporta mayores evidencias sobre efecto del MCCS ha la edad de 40 días ni a los 60 días por lo que los resultados obtenidos en este trabajo son, las primeras evidencias de la AME.

A los 60 días de edad encontramos que aunque se presenta una actividad moduladora, está no es tan marcada como en las animales prepúberes y tiende a ser más parecida a lo encontrado en la rata adulta, por lo que tal vez esta sea una etapa de transición en la que se están llevando a cabo cambios tanto en la actividad metabólica, como en el contenido de receptores para la hormona así como un incremento gradual en los requerimientos de T asociado con la aparición de espermatogonias en mitosis activa y con el inicio de la espermatogénesis (Gondos, 1980).

Para las ratas de 60 días de edad, solo se han reportados algunos valores plasmáticos de androgenos los cuales son de 0.202 μ g/100 ml de plasma. En ratas de diferentes edades, también se han encontrado algunas diferencias en las concentraciones de LH, y FSH dependiendo de los investigadores. Así, una notable disminución de los niveles de LH en suero fueron observados entre los 20 y 22 días de edad (Dohler y Wuttke, 1976) o a los 37 - 40 días (Gupta et al, 1975).

Las concentraciones plasmáticas de FSH se incrementan después de los 33 días de edad, para disminuir posteriormente a los

valores adultos sobre los 60 días de edad (**Gupta y cols , 1975**). Sin embargo **Dohler y Wuttke (1976)** mencionan que no hay variación aparente en los niveles de FSH cerca de los 23 días de edad pero que hay un incremento entre los 37-45 y una disminución hacia los niveles adultos posterior a las edades mencionadas.

En otros estudios realizados (**Payne y cols, 1977**) se llevo a cabo la evaluación de la producción de T por testículo en diferentes grupos experimentales variando tanto la edad como la presencia o ausencia de LH. La producción de T en ausencia de LH mostró un incremento entre los 58 y 89 días en donde los valores obtenidos fueron de 278 ng/4h/testículo y de 472 ng/4h/testículo. Estos autores también reportan los valores en la producción de T a los 20 días de 6.7 ng/4h/testículo y a los 41 días de 80.6 ng/4h/testículo. Así también, observaron un gran estimulación de los valores obtenidos con la adición de LH.

Con respecto a la respuesta evocada por las CS de las ratas adultas de 90 días se observó también un efecto inhibitorio lo cual concuerda con los reportes anteriores del grupo de trabajo donde se demostró una influencia específica del MCCS sobre los andrógenos de la vía biosintética de los cultivos primarios de las CL durante las primeras 48 horas (**García y cols, 1989**) pero no con los reportes de otros autores ya que ellos hacen referencia a la presencia de factores estimuladores de la esteroidogénesis.

Así **Verhoeven y cols. (1987)** encontraron un factor en el medio enriquecido de CS el cual estimula la actividad de las CL en periodos cortos de incubación y cuya regulación se asemeja a la de otras proteínas que son sintetizadas en las CS tales como el ABP y la transferrina. Por su parte, (**Janecki y cols, 1985**) encontraron que en el medio condicionado existía un factor que presenta su actividad estimuladora máxima sobre la esteroidogénesis de las CL bajo estimulación con FSH entre las 12-18 hrs de cultivo y que presenta un peso molecular de 10 y 15 kDa.

Syed y cols. (1988) demostraron la existencia de una sustancia termosensible de gran peso molecular en el medio condicionado de túbulo seminífero (MCTS) obtenido después de la incubación de los

túbulos seminíferos en los estadios VIII y XI del ciclo espermatogénico de la rata, el cual parcialmente inhibe la producción dosis dependiente de T, estimulada por la LH y toxina de cólera en la fracción cruda de células intersticiales *in vitro*. datos que también concuerdan con lo reportado por (Parvinen y cols 1984). Así también, se ha reportado que un factor secretado por el MCTS tiene una influencia estimuladora sobre la producción de T dependiente de estado del túbulo en CL purificadas (Parvinen y cols 1984, Syed y cols 1985; Papadopoulos y cols 1986, 1987). trabajos posteriores indican que el MCTS de rata adulta ejerce efectos moduladores inhibidores en células de Leydig purificadas (Vihko y Huhtaniemi, 1989; Quereshi, 1993).

Es reconocido también que el MCCS de rata adulta con CL cultivadas en ausencia de FSH (Papadopoulos y cols 1987), tienen acción inhibidora en diversos parámetros de este tipo celular ya que inhiben la producción de T.

Es necesario la realización de mayores estudios para respaldar los resultados obtenidos en este trabajo, por lo que se sugiere evaluar las propiedades del factor presente y el mecanismo de acción por el cual inhibe la esteroidogénesis.

VIII CONCLUSIONES

1.- El M CCS proveniente de ratas de 20, 40 60 y 90 días de edad provoca una disminución sobre la producción de testosterona y un incremento en la síntesis de pregnenolona en cultivos primarios de células de Leydig adulta (90 días).

2- El efecto inhibitor es más marcado en el M CCS de ratas con 20 días de edad., por lo que la regulación de este factor parece ser diferente en los animales inmaduros respecto a los maduros, lo cual puede estar relacionado con el desarrollo del animal.

IX BIBLIOGRAFÍA

Aoki A. y Fawcett D. (1978). IS THERE A LOCAL FEEDBACK FROM THE SEMINIFEROUS TUBULES AFFECTING ACTIVITY OF LEYDIG CELLS? *Biol Reprod* 19: 144-158.

Bellvé A. y Zheng W. (1989). GROWTH FACTORS AS AUTOCRINE AND PARACRINE MODULATORS OF MALE GONADAL FUNCTIONS. *J Reprod Fertil* 85: 771-793.

Benahmed M., Bernier M., Ducharme J. y Saez J.M. (1982). STEROIDOGENESIS OF CULTURED PURIFIED PIG LEYDIG CELLS. SECRETION AND EFFECTS OF ESTROGENS. *Mol Cell Endocrinol* 28: 705-716.

Bermúdez J., León C. y Herrera J. (1973). FUNDAMENTOS Y ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS DE ANALISIS POR SATURACION. *Rev Méd IMSS* 12: 11-22.

Bermúdez J., Mendieta E. y Herrera J. (1988). EVALUACION DE LOS METODOS DE AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE CELULAS DE LEYDIG Y SERTOLI. *Arch Inv Méd* 19: 291-301.

Berridge M. (1985). THE MOLECULAR BASIS OF COMMUNICATION *Biol Reprod* 21: 823-838.

Bloom J. y Fawcett D. (1990). TRATADO DE HISTOLOGIA, 11a Ed, McGraw- Hill, México D.F., pp 802- 857.

Boujrad N., Guillaumin J., Bardos P., Huchereau R., Drosdowsky M., y Carreau S. (1992). GER CELL-SERTOLI CELL INTERATIONS AND PRODUCTION OF TESTOSTERONE BY PURIFIED LEYDIG CELLS FROM MATURE RAT. *J. steroid Biochem Mol Biol* 41:677-681.

Brinkmann A., Muller E., Lambers-Stalhofzen G., Mechielsen H. y Van der Molen H.(1972). AN ESTRADIOL RECEPTOR IN RAT TESTES INTERSTITIAL CELLS. *FEBS Lett* 26: 301-306.

Bustos J. (1991). EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS Y ENZIMATICOS SOBRE LA ACTIVIDAD MODULADORA DE LA ESTEROIDOGENESIS DE CELULAS DE LEYDIG PRESENTE EN EL MEDIO CONDICIONADO DE LAS CELULAS DE SERTOLI. Tesis para obtener el titulo de Biólogo, ENEP Zaragoza, UNAM, 35 pp.

Cailleau J, Heyns w Verhoeven G.(1985). A FILTER DISC ASSAY FOR THE MEASUREMENT AND CHARACTERIZATION OF ANDROGEN-BINDING PROTEIN IN UNCONCENTRATED MEDIA FROM SERTOLI CELL-ENRICHED CULTURES. *J Steroid Biochem* 21:691.

Carreau S., Papadopoulos V., y Drosdowsky M. (1988). STIMULATION OF ADULT RAT LEYDIG CELL AROMATASE ACTIVITY BY A SERTOLI CELL FACTOR. *Endocrinology* 122:1103-1109.

Connell C. y Connell G. (1977). THE INTERSTITIAL TISSUE OF THE TESTIS. IN: Johnson A.D. y Gomes W.R. (Eds). *The testis*, Vol. IV, Academic Press, NY, pp 333-369.

Caviacchia J. y Dym M. (1977) RELATIVE VOLUME OF SERTOLI CELLS IN MONKEY SEMINIFEROUS EPITHELIUM: A STEREOLOGICAL ANALYSIS *American Journal of Anatomy* 150: 501-507.

Chen Y., Paye A. y Kelch R. (1976) FSH STIMULATION OF LEYDIG CELL FUNCTION IN THE HYPOPHYSECTOMIZED IMMATURE RAT. *Proc Soc Exp Biol Med* 153:473-475.

Cheng C., Morris P., Zwain Y., Carreau S. y Drosdowsky M. (1993) A LEYDIG CELL STIMULATOR FROM SERTOLI CELLS IN: Grave G. Cutler G B (eds) *Sexual Precocity: Etiology, Diagnosis and Management*. Raven Press, New York, pp 221-227.

De Kretser D., Sharpe R. y Swanston I. (1979). ALTERATIONS ON STEROIDOGENESIS AND HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN BINDING IN THE CRYPTORCHID RAT *Endocrinology* 105: 135-138.

De Kretser D. y Kerr (1988) THE CYTOLOGY OF THE TESTIS.In Knobil E,Neill J et al (eds) The Physiology of Reproduction,VOI I chapter 20,pp 837-932

Dym, M. (1975) THE MAMMALIAN RETE TESTIS A MORPHOLOGICAL EXAMINATION. Anat Rec 186: 493

El Safoury S. y Bartke A.(1974) EFFECTS OF FOLLICLE STIMULATING HORMONE AND LUTEINIZING HORMONE ON PLASMA TESTOSTERONE LEVELS IN HYPOPHYSECTOMIZED AND IN INTACT INMATURE AND ADULT MALE RATS. J Endocrinol 61:193-198.

Fawcett D. (1975) ULTRASTRUCTURE Y FUNCTION OF THE SERTOLI CELL. In Hamilton D. W.y Greep Ro (Eds) Handbook of Physiology, Endocrinology Section 7,Vol. V pp 21-55

Liu Y. Dahl K.,(1987) A FACTOR (S) PRODUCED BY SERTOLI CELLS STIMULATES ANDROGEN BIOSYNTHESIS BY LEYDIG CELLS IN NEONATAL RATS, Sci Sin 31:818

García Castro J. y Rodríguez Maldonado E. (1989). EVALUACION DEL EFECTO DEL MEDIO CONDICIONADO DE CELULAS DE SERTOLI SOBRE LA FUNCION ESTEROIDOGENICA DE CELULAS DE LEYDIG DEL TESTICULO DE LA RATA ADULTA NORMAL. Tesis para obtener el titulo de Biólogo, ENEP Zaragoza, UNAM, 46pp.

Geneser F. (1990). HISTOLOGIA, 2a. Ed, Editorial Panamericana, México D.F., p 578.

Gondos B. (1980) DEVELOPMENT AND DIFFERENTIATION OF THE TESTIS AND MALE REPRODUCTIVE TRACT. IN: Steinberger A, TESTICULAR DEVELOPMENT, STRUCTURE, AND FUNTION. Raven press, New York, pp 3-20.

Gwynne, J., Hess B., Rountree R., Mahagge D., (1985). THE ROLE OF HIGH DENSITY LIPOPROTEINS IN ADRENAL STEROIDOGENESIS. Endocrinol Res 10:411-429.

Gupta, D., rager k., Zanzychi J., y Eichner M. (1975).. J. Endocrinol.66:183.

Hall P. (1970). ENDOCRINOLOGY OF THE TESTIS. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R. y Vandemark N.L. (Eds.). The testis, vol. II, Academic Press, NY, pp 245-276.

Hall, P., Lee I, Lipson, E., (1975) THE ROLE OF MITOCHONDRIAL CYTOCHROME P450 FROM BOVINE ADRENAL CORTEX IN SIDE CHAIN CLEAVAGE OF 20S, 22R- DIHYDROXYCHOLESTEROL. J. Biol Chem 250,2283-2290.

Hardy M., Zirkin B. y Ewing (1989) KINETIC STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF THE ADULT POPULATION OF LEYDIG CELLS IN TESTES OF THE PUBERAL Endocrinology 124: 762-770.

Herrera J., Morán L., Raudales L., León C. y Bermúdez J. (1974). RADIOINMUNOANALISIS DE PREGNENOLONA, 17-HIDROXIPREGNENOLONA Y DEHIDROPIANDIOSTENDIONA Y SUS FORMAS SULFOCONJUGADAS. Arch Invest Méd 5: 617-630.

Herrera J., Garcia-Castro J., Rodríguez Maldonado E., Mendieta E. y Bermúdez J. (1996) SERTOLI CELL CONDITIONED MEDIUM MODULATE THE ANDROGEN BIOSYNTHETIC PATHWAYS IN RAT LEYDIG CELL PRIMARY CULTURES. Arch Androl 37: 127-133

Huang H., Zaidi P. y Nieschlag F. (1984). PITUITARY-TESTICULAR INTERRELATIONSHIPS DURING GERMINAL INVOLUTION IN THE VITAMIN A DEFICIENT RAT. Endocrinology 100: 33-41.

Janecki A., Jakubowiak A. y Lukaszik A. 1985 STIMULATORY EFFECT OF SERTOLI CELL SECRETORY PRODUCTS ON TESTOSTERONE SECRETION BY PURIFIED LEYDIG CELLS IN PRIMARY CULTURE. Mol Cell Endocrinol 42:235-243.

Jégou B. (1992). THE SERTOLI CELL. Bailliere Clin Endocrinol Met 6: 273-311.

Johnson B., y Ewing L. (1971) FOLLICLE -ESTIMULATING HORMONE AND THE REGULATION OF TESTOSTERONE SECRETION INRABBIT TESTIS. science 173: 635-637.

Kerr J.(1988) A LIGHT MICROSCOPIC AND MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE SERTOLI CELL DURING THE SPERMATOGENIC CYCLE OF THE RAT.Anatomy and Embryology 177: 341-348.

Kerr J., Rich K. y De Krester D. (1979a). ALTERATIONS OF THE FINE STRUCTURE AND ANDROGEN SECRETION OF THE INTERSTITIAL CELLS IN THE EXPERIMENTAL CRYPTORCHID RAT TESTIS. Biol Reprod 20: 409-422.

Kerr J., Rich K. y DeKrester D. (1979b). EFFECTS OF EXPERIMENTAL CRYPTORCHIDISM ON THE ULTRASTRUCTURE AND FUNCTION OF THE SERTOLI CELL AND PERITUBULAR TISSUE OF THE RAT TESTIS. Biol Reprod 21: 823-838.

Kerr J., y De Kretser D. (1981) THE CYTOLOGY OF THE HUMAN TESTIS.In Burger H y De Kretser D. (eds). The Testis,pp 141-149. New York: Raven Press.

Kerr J. y Sharpe R. (1985) FOLLICLE-STIMULATIN HORMONE INDUCTION OF LEYDIG CELL MATURATION. Endocrinology 116:1565-1575.

Leeson R. y Leeson S. (1977). HISTOLOGIA, 3a. Ed., Editorial Interamericana, México, DF, pp. 481-501.

Lejeune H., Skalli M., Sanchez P., Avallet O. y Saez J. (1993) ENHANCEMENT OF TESTOSTERONE SECRETION BY NORMAL ADULT HUMAN LEYDIG CELLS BY CO-CULTURE WHIT ENRICHED PREPARATIONS OF NORMAL ADULT HUMAN SERTOLI CELLS. Int J Androl 16:27-34.

Lording D., y De Krester D. (1972) COMPARATIVE ULTRASTUCTURAL AND HISTOCHEMICAL STUDIES OF THE

INTERSTITIAL CELLS OF THE RAT TESTIS DURING FETAL AND POSTNATAL DEVELOPMENT.

Magres. y Jost A. (1980) THE INITIAL PHASES OF TESTICULAR ORGANOGENESIS IN THE RAT. Arch anat Microsc Morphol Exp 69: 297-318.

Martin W., Mayes P., Rodwell V. y Granner K. (1990). BIOQUIMICA DE HARPER, 10a. Ed., Editorial El Manual Moderno, México, DF, pp. 543-547.

Mendieta E. (1992) CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN CELULAS DE LEYDIG Y SERTOLI DE RATAS ADULTAS NORMALES. Tesis para obtener el grado de maestro en biología experimental, UAM-Iztapalapa 113p.

Moger W., y Murphy (1982) REEVALUATION OF THE EFFECT OF FOLLICLE-STIMULATING HORMONE ON THE STEROIDOGENIC CAPACITY OF THE TESTIS: THE EFFECTS OF NEURAMINIDASE-TREATED FSH PREPARATIONS. Biol Reprod 26:422-428.

Neaves M., Johnson L., Porter J., Parker C. Petty C. (1984) LEYDIG CELL NUMBERS, DAILY SPERM PRODUCTION AND SERUM GONADOTROPIN IN AGEING MEN. J Clin Endocrinol Metab 59:756-763.

Ojeifo J., Byers S., Papadopoulos V. y Dym M. 1990 SERTOLI CELL-SECRETED PROTEIN(S) STIMULATES DNA SYNTHESIS IN PURIFIED RAT LEYDIG CELLS *IN VITRO*. J Reprod Fertil 90:93-108.

Odell W. y Swerdloff R. (1976) ETIOLOGIES OF SEXUAL MATURATION: A MODEL BASED ON SEXUALLY MATURING RAT. Recent Prog Horm Res 32:245-288.

Oneda M., Djakiew D. y Papadopoulos V, (1991). PACHYTENE SPERMATOCYTES REGULATE THE SECRETION OF SERTOLI CELL PROTEIN(S) WHICH STIMULATE LEYDIG CELL STEROIDOGENESIS Mol Cell Endocrinol 77: 207-216.

Papadopoulos V., Kamtchouing P., Drosdowski M. y Hochereau de Reviens M.(1987). ADULT RAT SERTOLI CELLS SECRETE A FACTOR OR FACTORS WHICH MODULATE LEYDIG CELL FUNCTION. *J Endocrinol* 114: 459-468.

Parvinen M., Nikula H. y Huhtaniemi Y. (1984) INFLUENCE OF RAT SEMINIFEROUS TUBULES ON LEYDIG CELL TESTOSTERONE PRODUCTION *IN VITRO*. *Mol Cell endocrinol* 37:311-336.

Perrard- Sapori M., Chatelain P., Vallier P. y Saez J. (1986) *IN VITRO* INTERACTION BETWEEN SERTOLI CELLS AND STEROIDOGENIC CELLS. *Biochem Biophys Res Commun* 134:957-962.

Perrard-Sapori M. , Chatelain P. y Saez J. (1987). MODULATION OF LEYDIG CELL FUNCTION IN CULTURE WITH PIG SERTOLI CELL CONDITIONED MEDIUM: EFFECTS OF INSULIN, SOMATOMEDIN-C AND FSH. *Mol Cell Endocrinol* 50: 193-201.

Prince F. (1984) ULTRASTRUCTURE OF IMMATURE LEYDIG CELL IN THE HUMAN PREPUBERTAL TESTIS. *Anat Rec* 209:165-176.

Purvis K., Clause O. y Hansson V. (1979) LH CONTAMINATION MAY EXPLAIN FSH EFFECTS ON RAT LEYDIG CELLS. *J Reprod Fertil* 56:657-665.

Reventos J., Perrard-Sapori M., Chatelain P., y Saez J. (1989) LEYDIG CELL AND EXTRACELLULAR MATRIX EFFECTS ON SERTOLI CELL FUNCTION: BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGIC STUDIES. *J. Androl* 10:359-365.

Rich K. y DeKretser D. (1979). EFFECT OF FETAL IRRADIATION ON TESTICULAR RECEPTORS AND TESTOSTERONE RESPONSE TO GONADOTROPHIN STIMULATION IN ADULT RATS. *Int J Androl* 2: 343-352.

Risbridger G., Kerr J., Peake R. y DeKretser D. (1981a). AN ASSESSMENT OF LEYDIG CELL FUNCTION AFTER BILATERAL OR UNILATERAL EFFERENT DUCT LIGATION: FURTHER

EVIDENCE FOR LOCAL CONTROL OF LEYDIG CELL FUNCTION. Endocrinology 108: 1234-1241.

Risbridger G., Kerr J., Rich K. y DeKretser D. (1981b). TEMPORAL CHANGES IN RAT LEYDIG CELL FUNCTION AFTER THE INDUCTION OF BILATERAL CRYPTORCHIDISM. J Reprod Fert 63: 415-423.

Risbridger G., Drummond A., Kerr J. y de Kretser D. (1987) EFFECT OF CRYPTORCHIDISM AN MITOGENIC ACTIVITIES IN RAT TESTICULAR ON STEROIDOGENIC INTERSTICIAL FLUID J Reprod fertl 81:617-624

Roberts K. y Zirkin B. (1991) ANDROGEN REGULATION OF SPERMATOGENESIS IN THE RAT. Ann NY Acad Scvi 637,90-106.

Rommerts F., Hoogerbrogge J., y vander Molen H.,(1986) STIMULATION OF STEROID PRODUCTION IN ISOLATED LEYDIG CELLS BY UNKNWON FACTOR IN TETICULAR FLUID DIFERES FROM EFFECTS OF LH RELEASING HORMONE. J Endocrinol 109:111-117.

Ross T. y Romrell E. (1992). HISTOLOGIA, 2a. Ed, Editorial Panamericana, México, D.F., pp 579-609.

Ruiz Paiagua L.S.C. (1994) CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UN FACTOR INHIBIDOR DELA ESTEROIDOGÉNESIS A PARTIR DE MEDIOS CONDICIONADOS DE CÉLULAS DE SERTOLI. Tesis para obtener el titulo de Maestro en Biología Experimental, UAM-Iztapalapa. pp 67.

Saez J. (1994) LEYDIG CELLS: ENDOCRINE, PARACRINE, AND AUTOCRINE REGULATION Endocrine Reviews Vols 15: 574-626.

Saez J., Benahmed M., Reventos J., Bommelaer M., Mombrial C. y Haour F. (1983). HORMONE REGULATION OF PIG LEYDIG CELLS IN CULTURE. J Steroid Biochem 19: 375-384.

Saez J., Haour F., Loras B. y Sanchez P. (1987). OESTROGEN-INDUCED LEYDIG CELL REFRACTORINESS TO GONADOTROPIN STIMULATION. Acta Endocrinol 89: 379-392.

Samuels L., Bussman L., Matsumoto K. y Huseby R. (1975). ORGANIZATION OF ANDROGEN BIOSYNTHESIS IN THE TESTIS. J Steroid Biochem 6: 291-297.

Schulze C. (1974). ON THE MORPHOLOGY OF THE HUMAN SERTOLI CELL. Cell Tissue Res 153: 339-355.

Sharpe R. y Harmar A. (1983). THE NATURE AND BIOLOGICAL ACTIONS OF TESTICULAR LHRH. In: Dumont, J.E., Nuñez, J. y Dantor R.M.- Hormones and cell regulation (Edited by J. E. Dumont, J. Nuñez and R.M. Denton) Elsevier/North-Holland, Amsterdam, Vol 2 pp 217-230

Sharpe R., Cooper I. y Bartlett J. (1984). INTRATESTICULAR PRODUCTION OF A HIGH MOLECULAR WEIGHT NEW FACTOR WHICH STIMULATES LEYDIG CELL TESTOSTERONE *IN VITRO*. IN: Recent Progress in the cellular endocrinology of the testis, Vol 123, INSERM, Paris, pp 413-418.

Sharpe R., y Cooper I. (1984a).INTRATESTICULAR SECRETION OF A FACTOR(S) WITH MAJOR STIMULATORY EFFECTS ON LEYDIG CELLTESTOSTERONE SECRETION *IN VITRO*.Mol Cell Endocrinol 41:247-255.

Sharpe R, Kerr J, Fraser H. , Bartlett J, (1986) INTRASTETICULAR FACTORS AND TESTOSTERONA SECRETION. EFFECT OF TREATMENTS THAT ALTER THE LEVEL OF TESTOSTERONE WITHIN THE TESTIS.J Androl 7:180.

Sharpe R., y Cooper Y.(1987) COMPARISON OF THE EFFECTS ON PURIFIED LEYDIG CELLS OF FOUR HORMONES (OXYTOCIN, VASOPRESSIN, OPIATES AND LHRH) WHIT SUGGESTED PARACRINE ROLES IN THE TESTIS. J. ENDOCRINOL 113:89

Sharpe R. (1990). INTRATESTICULAR CONTROL OF STEROIDOGENESIS. *Clin Endocrinol* 33: 787-807.

Sizonenko P., Cuendet A. y Daumier L. (1973) EVIDENCE FOR ITS MEDIATING ROLE ON TESTOSTERONE SECRETION IN CRYPTORCHIDISM. *J Clin Endocrinol Metab* 37:68-73.

Skinner, M., Griswold, M. (1982) SECRETION OF TESTICULAR TRANSFERRIN BY CULTURED SERTOLI CELLS IS REGULATED BY HORMONES AND RETINOIDS. *BIOL. REPROD.* 27:211-221.

Steinberger A. y Steinberger E. (1977). THE SERTOLI CELL. IN: Johnson A.D. y Gomes W.R. (Eds). *The Testis, Vol IV*, Academic Pres, NY, pp 371-379.

Syed V., Khan S., y Ritzen E. (1985) STAGE-SPECIFIC INHIBITION OF INTERSTITIAL CELL TESTOSTERONE SECRETION BY RAT SEMINIFEROUS TUBULES *IN VITRO*. *Mol Cell Endocrinol* 40:257-264.

Syed V., Khan S., Lindh M. y Ritzén E. (1988). MECHANISM OF ACTION OF THE FACTOR(S) SECRETED BY RAT SEMINIFEROUS TUBULES INHIBITING INTERSTITIAL CELL TESTOSTERONE PRODUCTION *IN VITRO*. *Acta Endocrinol* 119: 427-434.

Ueno H, Mori H. (1990) MORPHOMETRIAL ANALYSIS OF SERTOLI CELL ULTRESTRUCTURE DURIG THE SEMINIFEROUS EPITHELIAL CYCLE IN RATS. *Biology of reproduction* 43:769-776.

van Pelt A. y De Rooij D. (1990) THE ORIGIN OF THE SYNCHONIZATION OF THE SEMINIFEROUS EPITHELIUM IN A VITAMIN A REPLANEMENT. *Biology of Reproduction* 42: 677-682.

Verhoeven G. y Cailleau J. (1985). A FACTOR IN SPENT MEDIA FROM SERTOLI CELL-ENRICHED CULTURES THAT STIMULATES STEROIDOGENESIS IN LEYDIG CELLS. *Mol Cell Endocrinol* 40: 57-68.

Verhoeven G., y Cailleau J.(1986) SPECIFICITY AND PARCIAL PURIFICATION OF A FACTOR IN SPENT MEDIA FROM SERTOLI CELL-ENRICHED CULTURES THAT STIMULATES STEROIDOGENESIS IN CELLS LEYDIG. J Steroid biochem25:393-402.

Verhoeven G., y Cailleau J (1987) A LEYDIG CELL STIMULATORY FACTOR PRODUCED BY HUMAN TESTICULAR TUBULES Mol Cell Endocrinol 49: 137-148.

Verhoeven G., y Cailleau J. (1990) INFLUENCE OF COCULTURE WITH SERTOLI CELLS ON STEROIDOGENESIS IN INMATURE RAT LEYDIG CELLS.Mol Cell Endocrinol 71:239-251.

Verhoeven G., y Cailleau J.(1991) RAT TUMOR LEYDIG CELLS AS A BEST SYSTEM FOR THE STUDY OF SERTOLI CELL FACTORS THAT STIMULATE STEROIDOGENESIS J.Androl 12: 9-17.

Vihko K., Huhtaniemi I. (1989) A RAT SEMINIFEROUS RAT EPITHELIAL FACTOR THAT INHIBITS LEYDIG CELL cAMP AND TESTOSTERONE PRODUCTION: MECHANISM OF ACTION, STAGE-SPECIFIC SECRETION AND PARTIAL CHARACTERIZATION . Mol Cell Endocrinol65:119-127.

Vihko K., LaPolt P., Nishimori K., Hsueh A.(1991) STIMULATORY EFFECTS OF RECOMBINANT FOLLICLE-STIMULATING HORMONE ON LEYDIG CELL FUNCTION AND SPERMATOGENESIS IN INMATURE HYPOPHYSECTOMIZED RATS. Endocrinology 129:1926-1932.

Waites G., Gladwell R. (1982) PHYSIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF FLUID SECRETION IN THE TESTIS AND BLOOD-TESTIS BARRIER .Physiological Reviews 62:624-671

Wilson J. y Foster D. (1992). WILLIAMS' TEXTBOOK OF ENDOCRINOLOGY, 8th Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp 799-809.

Zirkin B. y Ewing L. (1987) LEYDIG CELL DIFFERENTIATION DURING MATURATION OF THE RAT TESTIS: A STEREOLOGICAL STUDY OF CELL NUMBER AND ULTRASTRUCTURE. Anat Sc Amer 253: 124-135.

Zwain , Morris, y Cheng (1991) IDENTIFICATION OF AN INHIBITORY FACTOR FROM A SERTOLI CLONAL CELL LINE (TM4) THAT MODULATES ADULT RAT LEYDIG CELL