

20
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

COMPARACION DE DOS METODOS DE SEPARACION
DE CELULAS DE LEYDIG DE CAPRINOS PARA
CULTIVOS *IN VITRO*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A N :
ESMERALDA GARCIA CAMACHO
MATILDE LAURA HERNANDEZ GONZALEZ

ASESOR M. en C. ARTURO ANGEL TREJO GONZALEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO.

1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

277523



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
 AUTÓNOMA DE
 MEXICO

U. N. A. M.
 ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
 CUAUTITLAN

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

DEPARTAMENTO DE
 EXAMENES PROFESIONALES
 ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Comparación de dos métodos de separación de células de Leydig de caprinos
 para cultivos in vi ro"

que presenta la pasante: Esmeralda García Camacho
 con número de cuenta: 8860121-2 para obtener el TITULO de:
 Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 29 de Septiembre de 1998

PRESIDENTE MVZ. Fernando Altamirano Abarca

VOCAL MVZ. María Guevara Vivero

SECRETARIO M. en C. Arturo Ansel Teoic González

PRIMER SUPLENTE MVZ. Zelanda Díaz Díaz

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. ...



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
ASUNTO: **VOTOS** APROBATORIOS
CUAUTITLAN

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES
ATN: Q. Ma. del Carmen Garcia Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Comparación de dos métodos de separación de células de Levdig de caprinos para cultivos in vitro".

que presenta la pasante: Matilde Laura Hernández González
con número de cuenta: 0261928-5 para obtener el TITULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"PCR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 2º de Septiembre de 1998

PRESIDENTE MVZ. Fernando Alcamirano Abarca

VOCAL MVZ. Jesús Guevara Vivero

SECRETARIO M. en C. Arturo Angel, Sr. González

PRIMER SUPLENTE MVZ. Yolanda Pérez Ruiz

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. José Luis Ortega Huerta de León

AGRADECIMIENTOS

Esmeralda.

A DIOS por darme la paz , tranquilidad y esperanza en esta vida.

A Bacilio por todo su amor e integridad de todos los valores y principios más sanos y respetuosos que me dejó.

A Pablo García (padre) por ser parte de mi existir.

A Benita Camacho (madre) por tu especial valor por la vida, por tu lucha, por tu infinito e incondicional amor de haber sido mi reservorio, mi guía, mi ejemplo, mi incansable acompañante y por supuesto por tu comprensión. gracias por tu formación humana y profesional.

A mis hermanos: Marco, Miguel, Alvaro, María, Tito y Citlali, por su apoyo y comprensión.

A Frida Lariyeni (mi hija) por llegar en el momento preciso a iluminar mi vida y ser lo más cercano a mi felicidad.

A Ricardo por los momentos compartidos de estudio, de emociones alegres y no tan alegres, pero sobre todo por ese momento en que coincidimos que se formara lo mejor de la vida... la vida misma en un ser puro, sano y moldeable de que otra manera se ejemplificaría el amor, gracias.

A Magdalena López por su apoyo con respeto y agradecimiento.

A Pompeyo, Paulina, Juana, Tano, Alba, Jazmín, Omar, Sebastian por su apoyo y aprecio. Tía a usted por su gran cariño y confianza, gracias.

A la familia Camacho Hernández.

A Diego Nicaragua y Emiliano con cariño y esperanza de ser un pequeño motivo de superación y al mismo tiempo me den la oportunidad de estar en su corazón.

A Elena por tu incansable y valiosa amistad, por las sensibilidades que vivimos y por mostrarme los reflejos del cristal gracias.

A Issac, Madeleine, Emiliano y Ana Paulina con cariño y por que han sido parte de cierta parte de esta formación profesional y emocional.

A mis amigos y compañeros: por los espacios y tiempos que compartimos conceptos, vivencias y experiencias en este caminar, Carlos, Celia, Magno, Oscar, Sandra, Mary, Fabiola, Paty, Luís, Heber, Gina, Samuel, Ramiro, Mario, Maura, Claudia, Graciela y por supuesto José Luís.

Al MVZ. MC. Arturo Trejo G. Por su particular comprensión e indescifrable amistad, gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS.

LAURA.

A DIOS Por estar siempre conmigo y darme la oportunidad de vivir.

A mis padres Fernando y Esperanza, por el apoyo moral y económico que me han brindado, con el cual he logrado terminar mi carrera profesional, y sobre todo gracias por todo ese cariño que siempre me han demostrado. Los quiero mucho.

A Mis hermanos, Fernando, Sara e Ismael, quienes me impulsaron con su apoyo y ejemplo.

A mi esposo Raymundo, porque gracias a ti, conocí la felicidad. Te Amo.

A mi hija María Fernanda, gracias por existir y brindarme la otra parte de mi felicidad.

A mis suegros Rogelio y Socorro, por ese cariño tan especial que me brindan, el cual es bien correspondido.

Al MVZ. MC. Arturo Trejo G.

Gracias por su paciencia y apoyo, pero sobre todo, por esa sonrisa que siempre conserva en su rostro, que motiva ha seguir siempre adelante.

INDICE

Resumen.....	I
Introducción.....	1
Revisión de literatura.....	3
Objetivos.....	29
Material y Métodos.....	30
Resultados.....	33
Discusión.....	37
Conclusiones y recomendaciones.....	39
Literatura citada.....	40

RESUMEN.

Para evaluar los gradientes de Percoll adecuados para separar células de Leydig en caprinos, estimular mediante hCG la producción de testosterona en células de Leydig en cultivo y estimar mediante los niveles de testosterona el porcentaje de células aisladas en cada gradiente, se realizó el presente trabajo.

Se utilizaron 5 machos caprinos criollos encastados de alpinos con peso promedio de 30 kilogramos. Se recolectaron los testículos inmediatamente después de la castración y se colocaron en Solución Salina Fisiológica con antibióticos, para cortar 10 gramos de tejido y prepararlo para asignarlo a los dos métodos de separación de células de Leydig: a) Mecánico, utilizando un bio-homogenizador de nivel celular; b) Enzimático, mediante la utilización de Tripsina al 0.25% con Verceno 0.1%. Una vez destruido el tejido para separar las células de Leydig, se procedió a centrifugarse en los siguientes gradientes de Percoll: 20, 25, 30 y 35% a 3000 rpm/30 minutos.

El contenido de cada gradiente, se colocó en una caja de cultivo con 2 ml de Medio 199 con 10% de suero fetal bovino adicionado de antibióticos y se incubó en atmósfera al 5% de CO₂ durante 24 horas, se procedió a agregar 10 UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG), para inducir la esteroidogénesis y se dejó incubar nuevamente durante 3 horas, después de esto, cada gradiente se centrifugó nuevamente a 3000 rpm/30 minutos y el sobrenadante con 0.5 µl de una solución saturada de Azida de sodio, se guardó en congelación a -20°C hasta la determinación de su contenido de testosterona mediante radioinmunoanálisis con un kit en fase líquida con un error intraensayo menor al 10%.

La evaluación estadística se realizó mediante análisis de varianza con arreglo factorial, utilizando el peso testicular de la muestra y el porcentaje de la muestra con respecto al peso del testículo como covariables.

Hubo diferencia significativa en cada cabrito ($P < 0.0001$) y en los gradientes de Percoll ($P < 0.0017$).

El efecto entre el testículo izquierdo ó derecho para la separación de células de Leydig en gradientes de Percoll, no tubo diferencia significativa ($P > 0.05$).

Para el efecto del método de separación celular sobre niveles de testosterona en cabritos, no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$).

Para el efecto de los gradientes de Percoll para la separación de células de Leydig en cabritos, se observaron diferencias significativas y se encontró una tendencia de mayor concentración de células de Leydig en la capa superior del tubo en donde no había gradiente de Percoll.

La velocidad de centrifugación pareció ser baja con respecto a los gradientes de percoll de ahí que la parte más importante de tejido capaz de secretar testosterona se almacenará en la superficie de los gradientes de percoll, sin embargo resultó ser suficiente para que algunas células de Leydig se almacenaran en el gradiente de 35%, coincidiendo con algunas publicaciones (Moore et al., 1993; Contreras y Ronco, 1994; Frayne y Nicholson, 1994), sin embargo al no ser significativo, es necesario modificar las velocidades de centrifugación incrementándolas.

El porcentaje y cantidad de tejido testicular obtenido, no afectó las variaciones del trabajo, lo que significa que proporciones similares de tejido testicular sano ofrecen poblaciones homogéneas de células de Leydig para cada especie en particular.

Existió como es natural una variabilidad propia de cada individuo, la cual fue utilizada como bloque dentro del modelo estadístico para remover variabilidad, por lo que no puede inferirse sobre este parámetro.

La cantidad de testosterona producida después del estímulo con hCG, es un indicativo de la presencia de células de Leydig, sin embargo no permite cuantificar la cantidad de células ya que no se encontraron datos a cerca de la producción en cabras, además alguna cantidad de la estimada puede provenir de la producida antes del cultivo, por lo que se propone realizar trabajos para estimar la cantidad de testosterona producida por unidad celular.

En cuanto al método de separación, tampoco hubo una diferencia significativa pero si se presento mayor separación en el método mecánico, por lo que este método a parte de económico puede ser útil aunque sería importante cuantificar la cantidad de células que sufrirían daño, así también es importante comparar el método con colagenasa ya que se menciona ampliamente en la literatura.

El gradiente de percoll del 35% pareció ser adecuado para separar las células de Leydig, sin embargo el valor de 0.47 ng/ml no fue significativo con respecto a otros gradientes, por lo que se recomienda seguir trabajando sobre este método para obtener resultados más confiables.

INTRODUCCION

Las principales funciones del testículo son la formación de los gametos masculinos y la secreción de esteroides sexuales. Respecto a esta segunda función, la relación del testículo es conocida desde la antigüedad, pero recién en este siglo se identificaron las hormonas secretadas por el mismo (Romano, 1991).

A mediados del siglo pasado, Leydig describió el tejido que rodea a los túbulos seminíferos, como unas células cargadas con lípidos a las que les atribuyó funciones de nutrición. La posible relación de estas células, que se denominan como quien las describió (Leydig), con la producción de una sustancia androgénica fue planteada por Boun y Ancel en 1903 (Citado por Huhtaniemi, 1993). Pero no fue hasta 1935, que se logra aislar y purificar la testosterona, la cual da lugar a la espermatogénesis, dicha hormona es la principal secretada por las células de Leydig (celLey). Los estudios de las últimas décadas permitieron conocer mejor la fisiología de las celLey, su regulación por la hipófisis y el hipotálamo, y con la utilización del microscopio electrónico, pudo relacionar la ultraestructura con la función endocrina de las células esteroideogénicas (Romano, 1991).

La función de las celLey es la producción de la testosterona para el soporte de la espermatogénesis y para la acción extra testicular de los andrógenos (ejemplo: características sexuales secundarias en el macho, efectos anabólicos, regulación de retroalimentación de gonadotropinas) (Huhtaniemi, 1993).

Las células de Leydig en el borrego se encuentran moderadamente esparcidas en el tejido intersticial. Hefnawy *et al.* (1996), encontraron que el tamaño de las celLey permanecían sin cambio

hasta el día 70 de edad en el cordero Romanov X Ile-de-France. Sin embargo, el número y volumen de las células de Leydig por testículo se multiplica 7 veces del día 25 al 100 de edad. El número de células de Leydig se incrementa gradualmente hasta el segundo mes de edad, tiempo en el cual se observa un intenso crecimiento. Esto corresponde a dos fases de desarrollo testicular observadas en el cordero Wood *et al.*, (1992) son de la opinión que la fase rápida de crecimiento testicular sólo ocurre cuando las células son activadas. También el número de células se ve influenciado por la raza. Por ejemplo, Georgieva *et al.*, 1994 concluye que el número total de células de Leydig a los 120 días de edad fue 1.5 veces mayor que las encontradas en corderos de la raza Romanov.

Siendo las células de Leydig las productoras de los andrógenos, el poder estudiarlas de manera aislada, constituye una herramienta más para la determinación de los factores que afectan la calidad del semen y el comportamiento reproductivo en machos caprinos, por lo que se plantea el presente trabajo para establecer las bases y la técnica para el aislamiento y cultivo de las células de Leydig *in vitro*.

REVISION DE LITERATURA.

ORIGEN Y DESARROLLO DE LAS CELULAS DE LEYDIG.

La ontogénesis de la función de las células de Leydig en mamíferos se relaciona con dos tipos de células pequeñas. Las de tipo fetal son responsables de la masculinización de las características primarias sexuales durante la vida fetal y neonatal. Estas células retroceden después en todos las especies estudiadas. Posteriormente emergen las de tipo adulto, las cuales son las responsables de la masculinización pubertal (Saez, 1994).

Desarrollo de células de Leydig de tipo fetal.

La primera señal clara reconocida de diferenciación de las gónadas del macho que pueden observarse en secciones comunes histológicas en todos los mamíferos estudiados es la formación de los cordones seminíferos. Las primeras células de Leydig en el testículo fetal aparecen después de este proceso. En la rata, el cordón seminífero se inicia en el día 13, a las 9 horas (los estados fetales son medidos desde el momento de la concepción) emergen un tipo de células largas (precursores de las de Sertoli), las cuales se agregan y rodean a las células germinales formando el cordón seminífero (Huhtaniemi, 1992).

Estos eventos se inician en la parte interior de las gónadas, al mismo tiempo se forman alrededor de este cordón las membranas basales. De ese modo las células de Leydig aparecen en la región intersticial por la diferenciación de las células somáticas del mesénquima. Las células contienen grandes

condrias, con crestas tubulares, almacén de lípidos y retículo endoplásmico liso los cuales son conocidos como las características ultraestructurales de las células esteroideogénicas, son las primeras que se observan en el día 15. El testículo fetal de la rata comienza a producir testosterona en el día 15. Poco después del día 13 el testículo fetal *in vitro* esta en disposición de convertir progesterona a testosterona, y el día 14 el testículo puede convertir de pregnenolona a progesterona (Tapanainen, *et al*, 1984). La habilidad del desarrollo del testículo fetal de rata, específicamente la unión de hormona luteinizante (LH) y la respuesta de esta hormona toma lugar entre el día 14 y 15 al mismo tiempo que la secreción de testosterona ha iniciado. La unión entre el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y la testosterona puede ser funcional después de la unión entre la LH y la respuesta de AMPC. Las diferencias entre especies sugiere que la diferenciación de sensibilización a LH y esteroideogénesis están determinadas independientemente (Habert, 1993).

Las señales de diferenciación iniciales en las primeras células de Leydig son todavía desconocidas. El control sexual genético es improbable desde que las células XX contribuyen a la formación de las células de Leydig en XX, Además la LH y hormona foliculo estimulante (FSH) son conocidas como que inducen a la multiplicación y maduración de las células en los animales adultos, la diferenciación inicial de las células en las ratas fetales es independiente de las gonadotropinas (Patsavoudi *et al.*, 1985). La diferenciación de las primeras células de Leydig toma lugar después de las células de Sertoli, esto sugiere que las células se diferencian bajo la acción parácrina de las células de Sertoli (Habert, 1993).

La matriz extra celular juega un papel esencial en la diferenciación de las células. Las células de Leydig de tipo fetal son cubiertas por una gran membrana. La diferenciación de las células en cultivos primarios gonadales es completamente bloqueado por L-azetidina 2 ácido carboxílico, la prolina que es

competidor, es añadido al medio de cultivo, entonces se produce un bloqueo parcial cuando se añade suero al medio de cultivo. Este tratamiento previene la formación de los cordones seminíferos pero no la secreción de hormona antiMulleriana (Saez, 1994). La esteroidogénesis testicular incrementa considerablemente después de la diferenciación de las células de Leydig y al mismo tiempo las células incrementa grandemente. En la rata el incremento en el número es de 0.25×10^5 células por testículo en el día 16 a 0.6×10^5 por testículo en el día 18 y alcanzan un máximo de 10^5 por testículo en el día 20. Desde el día 18 al 20, este cambio temporal en el número de células de Leydig por testículo incrementa entre el día 18 y 20, este cambio temporal en la esteroidogénesis testicular sugiere que la actividad individual de las células decrece. Además, en un estudio inmunológico de la actividad de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa en las células mostraron un decremento con la edad (Huhtaniemi, 1992).

Los factores que causan regresión funcional de las células de Leydig durante la vida fetal en la rata son desconocidos. El decremento no puede ser explicado por un decremento en la secreción de gonadotropinas o que la acción de los niveles fetales de LH como material bioactivo incrementa considerablemente durante este periodo y la sensibilidad de las células de Leydig a la estimulación de LH no cambia (Tapanainen, 1984).

En ausencia de una explicación relacionada con el control endócrino, esto puede asumir entonces que la regresión funcional y morfológica de las células está controlada por una regulación parácrina y/o autócrina (Saez, 1994).

Desarrollo de células de Leydig de tipo adulto.

En la rata, las células de Leydig de tipo adulto se presentan alrededor del día 10 postnatal e incrementa considerablemente después del día 15 alcanzando 25×10^5 células por testículo para el final de la pubertad (día 56). Ellas son principalmente formadas por la diferenciación de las células mesenquimales pero también por la división de las células de Leydig preexistentes. El incremento en el número de las celLey es controlado por la LH y FSH (Lin, 1991).

En general se acepta que, cuando la completa madurez es alcanzada, una condición estable de relativo equilibrio persiste en el número de celLey. En las células de Leydig maduras se observa que nunca existe división celular en los testículos adultos, y sin embargo este número incrementa bajo la estimulación de LH en cultivos celulares, indicando diferenciación por otros tipos de células. Los resultados indican que la proliferación de precursores de células de Leydig son probablemente regulados por factores parácrinos y endocrinos, pero la transformación de precursores dentro de las células de Leydig son absolutamente dependientes de LH/hCG (Romano, 1991).

Existen algunas diferencias morfológicas y funcionales entre células de Leydig fetales y adultas. Las de tipo fetal tienen más extenso el citoplasma, abundantes almacenes de lípidos, una menor capa periférica distinta de heterocromatina en el núcleo, y mitocondria y retículo endoplásmico liso, de diferente forma con respecto a las células de Leydig de tipo adultas (Huhtaniemi, 1992).

III.- ESTRUCTURA UNION Y REGULACION DE RECEPTORES LH/hCG.

Caracterización del receptor para LH/hCG

Uno de los aspectos más importantes en el estudio de la estructura de los receptores membranales para el reconocimiento hormonal, es la descripción de sus características fisicoquímicas y estructurales.

Para el caso del receptor de LH/hGC, se ha demostrado, utilizando técnicas de marcaje por foto afinidad, la presencia de tres complejos hormona-receptor con pesos moleculares aparentes entre 60,000 y 90,000 daltones(52). El análisis de estos receptores en condiciones naturales y desnaturalizantes, así como la presencia y/o ausencia de agentes reductores de grupos disulfuros, han demostrado la naturaleza oligomérica del receptor, cuya estequiometría no ha sido del todo establecida (Romano,1991).

En el testículo, la constante de asociación del receptor a la hGC, marcada con I-25, es de aproximadamente $2 \times 10^{-10}M$, lo que indica su elevado grado de afinidad por la gonadotropina coriónica. La cuantificación de los sitios de unión para la LH/hGC en las células de Leydig, utilizando el análisis por saturación, indica que la célula tiene la capacidad de unir en exceso a la LH/hCG en relación a su capacidad de estimulación y producción de testosterona, ya que existen alrededor de 20,000 sitios de unión por célula. Algunos estudios a este respecto, indican que es suficiente la ocupación del 1% de los sitios totales de unión, para producir la respuesta máxima, en términos de producción de esteroides al estímulo hormonal (Hileman, *et al.*, 1994).

El análisis de la interacción de la LH con sus respectivos receptores, utilizando estudios de saturación al equilibrio, indican la presencia de constantes de asociación en el orden de 10^{-9} a $10^{-10} M$. En

En la mayoría de estos estudios, la LH se une a receptores de membrana con una constante de disociación de $2-4 \times 10^{-10}$ M (Lin, *et al*, 1991).

El RNAm para los receptores de LH/hCG se expresa en el testículo, el ovario, el cerebro y en la hipófisis. En el testículo y el ovario los transcriptores varían de 1.2 a 7.6 kb. El tamaño y abundancia de estos transcriptores varía de una especie a otra y también entre el ovario y el testículo. Las células expresan un receptor quimérico que contiene sólo los primeros 206 aminoácidos de el receptor LH/hCG más los aminoácidos sobrantes de la cadena terminal de C que domina el receptor a LH unido a hCG con alta afinidad y muestra elevados niveles de AMPc que son estimulados por hCG pero no por la FSH (Saez, 1994).

En la rata se han reportado algunos sitios iniciales de transcripción, entre el nucleótido 13 y el 450 (sitio inicial de traslocación relativo).

Unión de los receptores LH/hCG

Los receptores a LH (rLH), cubren la membrana celular en siete períodos, la proteína se une a la proteína-G, esto se expresa principalmente en las células de Leydig, y en la teca del ovario, la granulosa, las células intersticiales y lúteas. Mientras que los rLH estén posibilitados para expresarse en las células blanco gonadales de acción LH. Esta expresión es también afectada por un número de hormonas y factores de desarrollo actuando por medio de la activación de la adenilciclasa u otra señal de mecanismo de traducción (Huhtaneimi, 1993).

Estudios sobre la activación de biosíntesis esteroïdal en las células de Leydig y de la granulosa/lúteas por la LH/hCG indican que AMPc cumple más como un segundo mensajero. Se ha demostrado que el AMPc es capaz de inhibir la respuesta esteroïdogénica estimulada por la concentración de hCG que no inicia algún incremento discernible en los niveles de AMPc. El efecto de análogos de AMPc son selectivos en su unión a dos tipos de AMPc dependiente de proteincinasa (APC), y/o selectivo en su unión a dos tipos de sitio de unión al AMPc en la regulación de subunidades de APC en la rata. En conclusión estos estudios de APC fueron presentes en las células Ley y un incremento sinérgico en la producción de andrógenos ocurre cuando las células fueron incubadas *in vitro* con un par de análogos que activan selectivamente APC de tipo I o II. Otra importante observación fue que el efecto de la LH esteroïdogénico fue potenciado sólo con el análogo selectivo de tipo I, indicando una compartimentalización de APC tipo I en las células de Leydig que presenta un acceso endógeno más común del AMPc (Saez, *et al*, 1994).

En otros estudios los resultados demuestran claramente que el receptor a LH/hCG es capaz de activar dos señales de activación intracelular, probablemente por medio de dos diferentes proteínas G. Estos dobles uniones a receptores con siete transmembranas dominantes también han sido observadas en otros receptores, TSH, PTH, calcitonina y glucagon (Romano, 1991).

Regulación de los receptores LH/hCG

El funcionamiento de las células Leydig adultas, está regulado fundamentalmente por las hormonas de la adenohipófisis, la LH la FSH y la prolactina. De las tres la LH es el factor primario que se requiere para mantener la estructura de las células de Leydig y su completa diferenciación, ya que estimula la síntesis de

steroides por la activación de las enzimas involucradas en la esteroidogénesis y el aumento, a largo, de la síntesis de nuevas proteínas en las células. La hipofisectomía o inhibición de la secreción de LH causa atrofia de las células, un menor habilidad para secretar testosterona, y un decremento en el número de receptores a LH para las células (Huhtaniemi, 1993).

La pérdida de receptores, LH/hCG causa desensibilización de adenilciclase cuando se pierden los receptores. Esta desunión de los receptores ha sido estudiada extensivamente para otros receptores que se unen a la proteína G, denominada rhodopsina y el receptor α -adrenérgico. En ambos modelos, la rápida desensibilización es realizada por la fosforilación del receptor, el cual en el caso del receptor α -adrenérgico es mediado por dos diferentes cinasas. La fosforilación de este receptor es directamente por la APC sin unir al receptor para la interacción de la proteína G (Onoda, *et al*, 1991).

Los efectos negativos de LH/hCG en este propio receptor y esta unión a la adenilatociclase son contradictorios con el absoluto requerimiento de LH para mantener la estructura de la células de Leydig y su función específica. Estas diferencias pueden ser explicadas por el factor que la secreción de LH es discontinua o en episodios in vivo, ocurriendo más o menos en pulsos, la amplitud y frecuencia de estos cambios dependen del estado reproductivo del animal (Saez, 1994).

Algunos estudios han evaluado las respuestas endócrinas y características certeras testiculares de líneas de carneros de los cuales la hembra ha sido seleccionada por diferentes parámetros reproductivos indicando una pequeña o nula correlación en la respuesta de la descendencia en los machos. Cárdenas, *et al.*, en (1994) realizó un estudio para determinar si el grosor o componentes histomorfológicos del testículo, la capacidad y constante de disociación (Kd) de los receptores LH y hCG testiculares, y la

secreción de testosterona por la estimulación de gonadotropinas *in vitro* difieren entre líneas de carneros Rambouillet seleccionados de hembras con bajos y altos parámetros reproductivos y carneros de líneas cruzadas al azar. Las líneas se seleccionaron aproximadamente en 20 años. Los datos fueron colectados de carneros de 22 meses de edad durante la época de cruzamiento. No existió diferencia ($P>0.05$) entre líneas de carneros para las características físicas del testículo, ni para las histomorfológicas. Sin embargo, el porcentaje de volumen de tejido vascular intersticial fue mayor en los carneros de líneas seleccionadas de hembras con bajas tasas reproductivas. Los sitios receptores por las células de Leydig y capacidad de unión de los receptores LH y hCG testiculares, por gramos de parénquima, y por miligramo de proteína de membrana no difiere ($P>0.05$) entre líneas. Los valores de Kd para receptores oLH y hCG tampoco difiere entre líneas, sin embargo, los sitios receptores de las células de Leydig, la capacidad del parénquima testicular a la unión de gonadotropinas y valores de Kd fueron mayores para los receptores oLH que para los hCG. Cárdenas concluye que la selección de hembras Rambouillet por parámetros reproductivos incrementa el volumen testicular ocupado por el tejido vascular en el intersticio. Además la selección no alteró el total de oLH y hCG estimulados con testosterona *in vitro* o la afinidad y capacidad de receptores oLH y hCG de testículos de los machos descendientes.

Los receptores de hCG/LH están relacionados con la esteroidogénesis. En general algunos estudios han observado funcionalidad para la proteína-G unida a receptores con la excepción de la muscarina y receptores α -adrenérgicos.

En otros casos la internalización ha sido reportada que ocurre vía vesículas lisas y este mecanismo ha sido propuesto para todos los receptores que se unen a proteínas G. Ghinea *et al.*, (1992), tomo la ventaja de la preparación de anticuerpos monoclonales anti-receptor LH para estudiar la distribución y el

mecanismo de internalización de estos receptores en las células de Leydig. Estas células sin embargo, no son las más convenientes para realizar estudios *in vitro* de mutagénesis, para los cuales sería necesario mayores análisis. Ghinea en su trabajo observó que los receptores a LH fueron internalizados vía la ruta incluyendo los pozos cubiertos, las vesículas lisas y los cuerpos multivesiculares o lisosomas. Estas rutas son diferentes a las observadas para α -adrenérgicos, muscarina y levaduras, factores similares son considerados previamente como posibles receptores que se unen a las proteínas-G. La distribución y las vías intracelulares de los receptores a LH son muy similares entre las células de Leydig y las células transferidas-L. Esto abre las posibilidades de realizar un segundo estudio, para mutagénesis *in vitro*, y los mecanismos moleculares interrelacionados en el paso de los receptores a LH.

III.- EFECTOS DE LH/hCG EN LAS CELULAS DE LEYDIG.

El primer paso en el efecto de la LH/hCG es la unión de la hormona al receptor. El número de receptores a la LH/hCG de la membrana de las células Leydig depende de la LH o de la hCG, hormonas que regulan sus propios receptores por un mecanismo denominado de regulación homóloga o de autoregulación. La regulación homóloga puede darse en sentido positivo, es decir que las hormonas inducen y mantiene, el número de receptores, o en sentido negativo, es decir los disminuyen.

Regulación de la producción de la oxitocina en células de Leydig.

Dentro del testículo de rata se ha localizado oxitocina en las células de Leydig. Se han realizado algunos estudios para determinar el papel de la oxitocina intratesticular como un regulador parácrino.

Las funciones de la oxitocina testicular se basan en tres criterios: (i) Puede ser localmente producida, (ii) Puede presentar una acción fisiológica y (iii) Puede ser reguladora. Evidencias de que esta oxitocina es producida localmente se deriva de algunos estudios iniciales de Nicholson and Hardy (1992), donde demostraron que células de Leydig altamente purificadas produjeron oxitocina sobre un período de tres días, la producción de esta hormona fue reducida significativamente por un inhibidor en la síntesis de proteína. Posteriormente, utilizando testículos de rata enteros, Nicholson and Pickering (1993), encontraron que la cantidad total de oxitocina producida por un período de tres horas fue significativamente mayor que el contenido en el testículo control. Además el RNAm de oxitocina ha sido identificado en el testículo de rata por análisis PCR (Foo *et al.*, 1991).

El segundo papel fisiológico para la oxitocina testicular ha sido propuesto como: modulador de las contracciones de los túbulos seminíferos los cuales pueden estar relacionados con el transporte de espermias hacia diferentes conductos (Nicholson *et al.*, 1987) y como regulador de las células de Leydig en la esteroidogénesis. Sin embargo existe controversia en esta función ya que algunos autores reportan una función de la oxitocina como inhibitoria (Kwan y Gower, 1988; Nicholson *et al.*, 1991), otros autores la reportan como estimulante de la esteroidogénesis (Tahri-Joutei y Pointis 1989) y otros concluyen que la oxitocina no presenta ningún efecto en la producción de testosterona (Sharpe y Cooper, 1987).

También se ha demostrado que la LH incrementa significativamente la producción de oxitocina en células purificadas de Leydig (Nicholson y Hardy, 1992). Estos mismo autores descubrieron que en células de Leydig altamente purificadas cultivadas con 0.1 ng/ml de LH, la tasa de producción de la oxitocina y de la testosterona fue diferente; ya que el máximo pico de producción de oxitocina fue 9 horas después de la estimulación con LH, mientras que la producción de testosterona alcanzó su máximo pico a

en cinco horas. Este prolongado pico de producción en la producción de oxitocina presenta dos hipótesis alternativas: (1) Que la LH estimula directamente a la producción de oxitocina, pero por un mecanismo diferente que al de la testosterona; (2) Los efectos de la LH son indirectamente mediados, posiblemente por la vía de la testosterona.

En 1994, Frayne y Nicholson realizaron un trabajo para determinar si la LH estimula la producción de oxitocina por las células de Leydig de ratas adultas por medio de la vía directa o indirecta de la testosterona. Concluyendo que sus datos revelaron que la LH no actúa por vía de la testosterona para estimular la producción de oxitocina y además concluyen que la LH actúa por algunos mecanismos indirectos alternos para la producción de la oxitocina. También revelaron que la producción de oxitocina por las células de Leydig puede ser regulada no sólo por la LH sino también por lipoproteínas las cuales se conoce que están presentes en el fluido intersticial. Estos datos refuerzan la evidencia que la oxitocina intratesticular puede ser un factor parácrino.

Delgadillo y Chemineau (1992), realizaron un experimento para determinar si la abolición de la liberación temporal de LH y testosterona en machos alpinos es debida por los ciclos cortos de fotoperíodo. En este trabajo Delgadillo trabajó con tres grupos de machos; en el primer grupo los expuso a 16 h luz (días largos) a 8 h luz (días cortos). El segundo grupo fue expuesto 1 mes de días largos alternando con un mes de días cortos. Y el grupo tres se expuso a dos meses de días largos alternándose con dos meses de días cortos. Las muestras de sangre se obtuvieron en los meses de septiembre a agosto para determinar LH y la testosterona. Los resultados indican que la frecuencia de los pulsos de LH varían con la longitud del día. En el grupo dos, fue mayor en los días largos que en los días cortos, en el grupo tres estas frecuencias fueron mayores en los días cortos que en los largos.

Teniendo entonces el fotoperíodo una influencia sobre las células de Leydig lo que se verá reflejado en la secreción de testosterona, en donde la concentración es máxima durante los días largos, existiendo así una correlación con las concentraciones de LH encontradas y las horas luz. Concluyendo así que la rápida alteración de los días largos y cortos atenúan o previene los cambios temporales en la actividad del eje hipotálamo-pituitaria. Así como el mantenimiento del alto peso testicular y de la alta actividad sexual se debió a los períodos de estimulación gonadotrófica del testículo alternando rápidamente con períodos de tranquilidad.

Se han realizado otros trabajos en los cuales se estudian varios factores que influyen sobre la variación de los niveles de LH y como estos niveles tienen efecto sobre las células de Leydig y estas a su vez en la producción de testosterona.

Entre estos trabajos encontramos el de Brown *et al* (1994), en donde examina los factores del fotoperíodo, de la nutrición y de la influencia social en la secreción de LH y testosterona en machos maduros cashmere en un periodo de 16 meses y poder determinar si (1) estos ciclos se presentan en animales en condiciones controladas y (2) si estos ciclos son modulados por estímulos nutricionales y sociales. Brown encontró que machos con dietas de alta calidad tuvieron una respuesta más temprana y prolongada en verano, otoño e inicio de invierno en comparación con los que recibieron dietas de menor calidad.

La magnitud de la respuesta para la LH y la testosterona fue significativamente mayor también para los animales mejor nutridos. Por lo tanto sus resultados demostraron que la secreción de LH y

testosterona se realiza en ciclos temporales en los machos cashmere, y que la nutrición y las hembras en el macho son poderosos moduladores de la secreción de estas hormonas en un proceso de estacionalidad dependiente.

V.- REGULACION LOCAL DE LAS CELULAS DE LEYDIG.

Algunos datos demuestran claramente que la regulación de la función testicular puede ser controlada localmente. La regulación local actúa en conjunto con gonadotropinas.

Comunicación de células Leydig.

En los mamíferos las células Leydig residen en el tejido intersticial, y en el espacio entre los túbulos seminíferos que contienen las vesículas sanguíneas, linfocitos, varios tejidos celulares conectivos y macrófagos. El espacio entre células Leydig es de 150-200 Å, sin embargo existe un espacio intracelular de 20 Å. Este espacio se forma por conexiones, de proteínas homólogas. La conexión de expresión principal es la 43 kDa. Esta fue localizada por microscopía electrónica tanto en las células de Sertoli como en las de Leydig. Una importante función de los espacios es su habilidad para transmitir la información molecular, incluyendo el segundo mensajero, entre célula y célula. Los canales del espacio son permeables a inositol 1,4,5-trifosfato y iones calcio así como a AMPc, (Saez, *et al.*, 1994).

Interacción células de Sertoli - Leydig

Se sabe que los efectos de la FSH sobre las celLey deben estar mediados por las células de Sertoli. Se ha observado que las celLey pretratadas con FSH y co-cultivadas con células de Sertoli, incrementan el número de sitios receptores para la LH y la producción de testosterona inducida por LH/hCG, en comparación con las células de Leydig cultivadas solas (Romano, 1991).

Más aún, estas modificaciones observadas en los co-cultivos, se acompañan de modificaciones estructurales en las células de Leydig. Cuando las celLey purificadas se cultivan solas, presentan regresión del retículo endoplásmico y de las mitocondrias, mientras que las cultivadas junto con las de Sertoli, la estimulación con la FSH induce el desarrollo de ambos organelos celulares, (Onoda, *et al.*, 1991).

Regulación parácrina de las células de Leydig

El control endócrino de las células de Leydig funciona por la LH, el control parácrino de la función de las celLey ha sido sospechado por el efecto estimulador indirecto de la FSH hacia las celLey.

En cocultivos experimentales de células de Sertoli y de Leydig y el efecto de las células de Sertoli se observó que condicionan en forma media a las células de Leydig esto confirma la producción de factores esteroideogénicos agudos y factores que se relacionan con un control positivo o negativo de las funciones de las células de Leydig. La caracterización y purificación de estos factores parácrinos ha sido recientemente descubiertas (Onoda, 1991). También se han investigado otros compuestos que se conocen con acción fisiológica en otros sistemas, algunos producidos en el testículo y que actúan en las células de Leydig. El

El factor liberador de crecimiento a insulina (IGF-I) es producido por las células de Sertoli y de Leydig bajo el control de sus respectivas gonadotropinas, FSH y LH. El IGF-I aumenta la respuesta de hCG de las células de Leydig para aumentar tanto los receptores a LH y las enzimas esteroidogénicas, por el contrario el factor de Transformación a el cual también es producido por las células de Sertoli y de Leydig es un potente inhibidor de las funciones de las células de Leydig.

Esta producción por las células de Sertoli es inhibida por la FSH. La inhibina incrementa la diferenciación de las funciones celulares de la célula de Leydig. La activina, a la inversa tiene un efecto estimulador en las funciones de las células de Leydig. El efecto de este factor de desarrollo a moléculas relacionadas principalmente consisten en una acción positiva (IGF-I, Inhibina y la Activina) o un efecto negativo (TGF- α , TGF- β /EGF, bFGF) del efecto trófico regulado por el número de receptores LH/hCG, RNAm, enzimas RNAm esteroidogénicas y otras actividades, siguiendo una regulación de las respuestas de las células de Leydig a la LH. Ambas gonadotropinas contribuyen, directamente para la LH e indirectamente por medio de los mecanismos parácrinos, por FSH, producción de testosterona (Lejeune *et al.*, 1996).

REGULACION DE LAS CELULAS DE LEYDIG CON OTROS FACTORES.

Aquí abarcaremos algunos factores que de alguna u otra forma interactúan también con las células de Leydig.

Una hormona que claramente establece algún efecto sobre las células de Leydig es la prolactina (Prl). En los ratones los receptores a Prl están presentes en las células de Leydig. Ratas hipofisectomizadas tratadas con Prl

umentaron significativamente la concentración de testosterona en respuesta a la LH. La PrI amplifica in
tro la respuesta a la esteroidogénesis en las células de ratas estimuladas con concentraciones bajas de
H, pero se ve inhibida por el metabolismo de la progesterona en niveles altos. Una alta estimulación por
PrI puede suprimir los receptores de la LH (Huhtaniemi, 1993).

Información en el control de retroalimentación de la inhibina en machos es derivada de largos
estudios in vitro relacionados con la separación de células de Sertoli, pituitaria y Leydig. En un estudio
realizado por Voglymayr *et al*, en (1990), inmunizó carneros adultos utilizando subunidad de inhibina
recombinada humana, durante 80 días, en espera de aumentar y comprender el control de la inhibina en
los machos. Los resultados demostraron que la temporada se relacionó con la elevación de los niveles de
gonadotropinas y en los carneros inmunizados fue retrasada por 1-2 semanas con respecto a los
controles. Los picos de testosterona fueron mayores en los controles que en los tratados. La capacidad del
antisuero a unir a la β -subunidad de inhibina marcada I* incremento significativamente en cada animal
inmunizado con un tratamiento de 30 días. Estos resultados demostraron que la inhibina controla la
liberación de FSH durante la temporada reproductiva, Por lo tanto esto puede también ejercer algún
efecto en la función testicular por un efecto local en las células de Leydig, lo que evidencia un cambio en
los perfiles de testosterona y el incremento de los niveles sanguíneos de FSH en carneros inmunizados
contra la subunidad de inhibina.

La inhibina es una hormona glucoproteica, la cual funciona principalmente inhibiendo la
producción y/o secreción de las gonadotropinas de la pituitaria, preferentemente la FSH. En el macho se
ha aceptado generalmente que las células de Sertoli son la mayor fuente testicular de inhibina. Recientes
estudios en el hombre y la rata han indicado que las células de Leydig también pueden producir inhibina

en el testículo. Recientemente se ha demostrado que en las células de Leydig de ratas machos se ha encontrado el RNAm para la subunidad de inhibina y producir inhibina con actividad biológica e inmunológica (Drummond, 1989).

Un estudio inmunohistoquímico de testículo de carnero intensamente teñido de inhibina fue obtenido del epitelio seminífero mientras que las células de Leydig fueron también ocasionalmente teñidas pero esto no fue bastante claro debido a que esta tinción se pudo deber ya sea a la producción de inhibina por las células de Leydig o a una consecuente unión o consumo de inhibina producida por las células de Sertoli (Veeramachaneni *et al.*, 1989).

Tilbrook *et al.* (1991) realizaron un estudio para determinar si las células de Leydig producen inhibina en el carnero. Para desarrollar esto, las células de Leydig fueron estimuladas con la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) o por el aumento de niveles endógenos de LH por medio de la inyección de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Los resultados que se obtuvieron, demostraron en el carnero, que las células de Leydig no responden a la hCG o LH endógena para secretar inhibina o para influir en otras células del testículo que la secreten. Las altas concentraciones de inhibina que se encontraron en los linfocitos testiculares sugieren que los linfocitos pueden ser una importante ruta de secreción de inhibina en el testículo del carnero.

La producción de andrógenos por las células de Leydig es estimulada por la LH de la pituitaria pero también puede ser modulada *in vitro* por estímulos parácrinos y factores de inhibición, algunos de los cuales pertenecen a la familia de factores de desarrollo. Estas acciones son medidas por la superficie celular o por la matriz extracelular. McFarlane (1996), realizó un estudio para determinar el papel del

El sulfato de heparina en la regulación de la secreción de testosterona por las células de Leydig de la rata adulta. En los resultados se observó que la presencia de cloruro de sodio (25mM) y sulfato de protamina (100 g/ml) inhibe la producción de testosterona por las células estimuladas LH arriba del 50%, pero no tuvieron efecto en las células sin estimular. La respuesta a la LH y la producción de testosterona retornó a su estado normal después de que los agentes fueron removidos del medio de cultivo. No existió diferencia significativa en el número de receptores a LH al final del periodo de cultivo entre las células tratadas con cloruro de sodio y las sin tratar. La producción de testosterona por las células de Leydig estimuladas por el AMPc fue inhibida por cloruro de sodio. La adición de heparina inhibe la producción de testosterona por las células estimuladas por la LH en una forma de dosis dependiente.

En las células de Leydig, la heparina estimuló la producción de testosterona por arriba de un 50% del que se observó en las células estimuladas por la LH. Por lo tanto estos datos sugieren que el sulfato de heparina en la superficie celular modula la producción de testosterona por las células de Leydig adultas in vitro y que estas pueden interrelacionar en la acción autócrina de la heparina como un factor de desarrollo de unión en las células de Leydig.

El desarrollo de las células de Leydig ha sido ampliamente revisado. Dos cuestiones siguen sin resolverse: 1) La naturaleza e identidad de los antecesores de las células de Leydig adultas; y 2) el estímulo hormonal el cual actúa sobre los antecesores a la diferenciación de las células de Leydig. Hardy en (1991). Los antecesores de las células de Leydig contienen concentraciones significantes de receptores a andrógenos. Cuando el metabolismo de DHT A 3'-DIOL es bloqueado, la DHT estimula la producción de testosterona por los antecesores de las células de Leydig, también probablemente vía un mecanismo dependiente de un receptor a andrógenos.

Rápidamente el metabolismo para 3'-HSD puede limitar la potencia exógena de DHT al estimular la diferenciación de antecesoros de las celLey in vitro. El factor I de liberación de insulina aumenta la producción de andrógenos por células de Leydig inmaduras purificadas de ratas. La elevada sensibilidad de las celLey inmaduras contra las células adultas indica que esta hormona péptida juega un papel en la diferenciación durante la pubertad.

Se ha descubierto que las hormonas tiroideas influyen en los testículos y ovarios. Existen evidencias clínicas que en hombres que sufren de hipotiroidismo se les asocia con oligospermias, azoospermia, oligoastinospermia, baja libido e impotencia. Estos reportes sugieren una influencia de las hormonas tiroideas sobre la función gonadal, pero esto no es claro (Jana y Bhattacharya, 1994).

Jana y Bhattacharya (1996), estudiaron la incubación de células de Leydig testiculares de machos de ratones con 3,5,3'-triyodotironina la cual induce la generación de un factor proteico el cual se localiza en la fracción sobrenadante de células de Leydig centrifugadas y sonicadas. La adición de este factor a las células de Leydig incubadas estimuló grandemente a la liberación de andrógenos. Los resultados de estos experimentos demostraron que la triyodotironina induce la síntesis de una proteína de 52 Kd en las células de Leydig testiculares las cuales en períodos producen la estimulación de liberación de andrógenos sugiriendo que esta proteína puede ser un mediador nuevo de la función de triyodotironina en las células de Leydig.

La actividad reproductiva de los carneros parece estar influida por la latitud y por el fotoperíodo. Durante la temporada de no apareamiento decrece la circunferencia escrotal, la eficiencia de la

espermatogénesis y la producción diaria de espermatozoides, también existe un decrecimiento en el diámetro de los túbulos seminíferos, así como también una declinación de la actividad y tamaño de las células de Leydig y en la producción de testosterona, (Mortimer y Lincoln, citados por Gastel, *et al* 1995).

Gastel *et al.*, en (1995), realizó un experimento de enero a diciembre de 1991 en Uruguay para observar el comportamiento reproductivo de carneros Corriedale, para observar las células de Leydig y de Sertoli utilizó muestras de testículo de estos animales y los observó en el microscopio electrónico, obteniendo como resultado que en el intersticio, las células de Leydig presentaban una menor desviación morfológica en el mes de marzo. Disturbios en la condensación de la cromatina y desechos celulares en el citoplasma, fueron más afectadas en las células de Sertoli que en el túbulo. Además las celLey demostraron un alto grado de degradación vesicular en el citoplasma, pero no algún otro cambio degenerativo. Durante septiembre y diciembre la fina estructura del túbulo seminífero se encontró igual que en invierno. Sin embargo, las células de Sertoli presentaron fagosomas y reservas de lípidos fragmentadas, esta característica desapareció hacia el verano. En el intersticio las células de Leydig mostraron signos de vesiculación citoplasmática durante la primavera, pero mostraron mejoría morfológica para el verano.

El fotoperíodo, la temperatura y la nutrición son tres factores ambientales que influyen en la reproducción por lo que Dunn, (1992), llevó a cabo una revisión principalmente de la nutrición sobre la reproducción, uno de los puntos que tomó fue la producción de espermatozoides en donde encontró que la desnutrición retarda el crecimiento testicular en toretes y decrece la concentración de testosterona en la vena espermática. También encontró una disminución en la motilidad espermática, retardo del desarrollo testicular, reducción de las células de Leydig, pequeños túbulos seminíferos y reducción de la

concentración de testosterona, esto se observó en toros Brahman que ganaron 32 kg en 112 días, comparados con los que ganaron 66 kg en el mismo periodo, Nolan, *et al*, 1990 citado por Dunn, 1992).

Las células de Leydig son las responsables de la producción de andrógenos y particularmente en el carnero, están moderadamente dispersas en el tejido intersticial. El tamaño de las células de Leydig permanece sin cambio hasta el día 70 de edad en los corderos. El volumen total y número de células de Leydig por testículo se incrementó en 7 períodos del día 25-1000 de edad. El número de celLey incrementa gradualmente a partir del segundo mes de edad, después se observa un intenso crecimiento (Reviere *et al*. 1984, citado por Matos, 1992). Esto corresponde a dos fases de desarrollo testicular observadas en corderos, Gier y Marion (1970), citados por Matos (1992), son de la opinión que la fase rápida de desarrollo testicular sólo ocurre cuando las células de Leydig son activas. Estas son diferencias en el total de número y tasa de desarrollo de las células de Leydig entre razas de borregos.

Se han realizado estudios en reptiles para probar el efecto antiandrogénico no esterooidal de la flutamina en el testículo y epidídimo. Rai y Haider (1991), trataron lagartijas con flutamina en las cuales encontraron una marcada hipertrofia en las células de Leydig. Algunas espermátidas fueron observadas en el testículo de más de la mitad de animales tratados con flutamida. La flutamina también produjo un incremento significativo de espermátocitos primarios; las espermátidas no fueron observadas en el grupo control. Una inhibición significativa de espermatogénesis fue observada en lagartijas tratadas sólo con testosterona o en combinación con la flutamida. El tratamiento con FSH ovina causó una estimulación significativa de espermatogénesis, como se indicó por el incremento de espermátocitos primarios y secundarios y la transformación de espermátocitos secundarios dentro de las espermátidas o en algunos casos dentro del espermatozoide. Una considerable reducción de lípido sudanofílico y moderada actividad

de delta5-3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa fue observado en las células de Leydig de animales tratados con FSH indicando un aumento en la esteroidogénesis. Resultados similares fueron observados en lagartijas tratadas con flutamida más FSH. Los efectos de tratamientos simultáneos de flutamida con FSH o testosterona en el ducto epidídimo revela que la flutamida inhibe las células superficiales del epitelio.

Muchos estudios electrofisiológicos han producido resultados de transporte iónico de un lado de la membrana o secretados por células. Otros estudios definen conductos de membrana de células secretoras de esteroides. Sólo tres de las propiedades electrofisiológicas comunican las células de Leydig testiculares.

Recientemente Duchatelle y Joffre (1990) han demostrado la presencia de conductos de voltaje dependientes de potasio, conductos de cloro activados por calcio y un conducto de cloro activado por la hiperpolarización en la membrana de las células de Leydig frescas separadas del testículo de rata. Realizaron un trabajo para estudiar el efecto de la LH, hCG y el AMPc en los conductos iónicos en las células de Leydig de testículo de rata. También se observaron los conductos dependientes de calcio, potasio, cloro. En el trabajo se concluye que las gonadotropinas actúan por medio del AMPc dependiente de los procesos de activación de los conductos de cloro. Estos conductos son diferentes a los activados por la hiperpolarización del cloro y a los conductos de cloro activados por calcio también presentes en las células restantes.

Se sabe que la biosíntesis de testosterona es dependiente de la disponibilidad de colesterol. Las células de Leydig del murino almacenan relativamente grandes cantidades de ester de colesterol en vacuolas de lípidos. En algunos estudios se ha demostrado en células de Leydig que la actividad de una

enzima reductasa no es activada en ratas hipocolesterolemias y que esta hipocolesterolemia no afecta la capacidad de estas células a sintetizar testosterona *in vitro*. Estos datos sugieren que lipoproteínas-colesterol no pueden ser fuentes significativas de sustrato para la biosíntesis de testosterona debido a que su disponibilidad no juega un papel importante en la regulación testicular de la esteroidogénesis. Hou *et al.*, (1990), realizó un estudio con el objetivo de estudiar las fuentes de colesterol para la biosíntesis de testosterona en células frescas de Leydig de Murino, en orden de aclarar la relativa importancia del colesterol para la síntesis de novo, o de almacenaje en los compartimentos celulares, o como derivados de Lipoproteínas de Alta Densidad del murino (LADm).

Los resultados de estos autores sugieren que las células de Leydig de murino, almacenan bastante colesterol y esters de colesterol que soportan la producción de testosterona por lo menos 12 hrs más *in vitro*. Si bien la LADm no presenta un efecto mayor en la estimulación de la biosíntesis de la testosterona, esto puede estar relacionado en la regulación del colesterol para la síntesis de novo.

Toxicidad sobre las células de Leydig.

El cloroetilmetanosulfonato (CEMS) es un agente alcalino bifuncional que fue desarrollado para suprimir tumores en desarrollo como los carcinomas de Walter, pero posteriormente se demostró que este compuesto causa infertilidad en ratas. Otros efectos son que induce toxicidad en las células de Leydig dando como resultado una privación de los andrógenos. Por lo que Klinefelter *et al* (1994) realizó un estudio para determinar si el CEMS perturba la estructura y/o función de l epidídimo, así como para determinar si el decremento de la testosterona se debía al compuesto el cual indujo cambios en la función de las células de Leydig.

Los resultados demostraron que el CEMS puede alterar la habilidad de las células de Leydig para responder a la estimulación de LH en vivo, y las alteraciones en la estructura y función del epidídimo ocurren igual cuando las concentraciones de testosterona son mantenidas.

En otro trabajo Teerds, *et al.*, (1990), estudió la formación de nuevas células de Leydig de ratas machos adultos después de la completa destrucción de la población original con etano dimetano sulfonato (EDS), llegando a la conclusión de que la regeneración de células de Leydig después de la administración de EDS es el resultado de dos sucesivas ondas de proliferación, principalmente de las células precursoras (células del parénquima) y de las nuevas células de Leydig formadas.

VI.- SEPARACION DE CELULAS MEDIANTE CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE PERCOLL.

Una de las mejores técnicas para la separación celular es el uso de PERCOLL para disgregar en diferentes gradientes varios tamaños celulares.

El Percoll está formado por partículas de sílice con un diámetro de 15 a 30 nm cubiertas con polivinilpirrolidona, este producto es químicamente inerte y por lo tanto no es tóxico, además de ser isosmótico (Pharmacia, 1994).

El mecanismo de separación es simple, cuando el Percoll es agregado a una solución salina fisiológica y centrifugado a 10,000 x g, las partículas de Percoll comienzan a sedimentarse, sin embargo,

tas partículas como ya se mencionó son de diferentes tamaño por lo que se sedimentan a diferentes velocidades, creando varios gradientes. Estos gradientes tienen formas isométricas que se agrupan en cada densidad y se forman con base al tiempo de centrifugación, la forma de los gradientes es relativamente lineal tomado en cuenta la fuerza de centrifugación y el tiempo. Estos gradientes no son estables y cambian continuamente durante el tiempo de centrifugación. Entonces las formas de los gradientes producidos en una centrifugación a altas velocidades son utilizadas para separar células con densidades similares a las de las partículas de Percoll ya que la región del tubo que ocupa cada gradiente tiene un rango muy estrecho de densidad.

El presente trabajo se diseñó para aislar células de Leydig en gradientes de Percoll y probar su respuesta secretora de testosterona después de estimularlas con hCG.

OBJETIVOS.

- 1.- Evaluar los gradientes de Percoll adecuados para separar células e Leydig en caprinos.**
- 2.- Estimular mediante hCG la producción de testosterona en células de Leydig en cultivo.**
- 3.- Estimar mediante los niveles de testosterona el porcentaje de células aisladas en cada gradiente.**

MATERIAL Y METODOS.

Localización.

Esté trabajo se realizó en el módulo de ovinos y caprinos en el laboratorio de Reproducción en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, ubicada en el Km 2.5 de la carretera Cuautitlán-Teoloyucan.

Animales

Se utilizaron 5 machos caprinos criollos encastados de alpinos con un peso promedio de 30 kilogramos.

Diseño Experimental

Se recolectaron los testículos inmediatamente después de la castración y se colocaran en Solución Salina Fisiológica con antibióticos, para proceder a cortar 10 gramos de tejido y prepararlo para asignarlo a los dos métodos de separación de células de Leydig.

Los métodos de separación fueron:

a) Mecánico, utilizando un bio-homogenizador de nivel celular, hasta destruir de manera completa el tejido.

) Enzimático, mediante la utilización de Tripsina al 0.25% con Verceno 0.1%.

Una vez destruido el tejido para separar las células de Leydig, se procedió a centrifugarse en los siguientes gradientes de Percoll: 20, 25, 30 y 35% a 3000 rpm/30 minutos.

El contenido de cada gradiente, se colocó en una caja de cultivo con 2 ml de Medio 199 con 10% de suero fetal bovino adicionado de antibioticos y se incubó en atmósfera al 5% de CO₂ durante 24 horas.

Una vez transcurridas las 24 horas, se procedió a agregar 10 UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG), para inducir la esteroidogénesis y se dejó incubar nuevamente durante 3 horas, después de esto, cada gradiente se centrifugó nuevamente a 3000 rpm/30 minutos y el sobrenadante con 0.5 µl de una solución saturada de Azida de sodio, se guardó en congelación a -20°C hasta la determinación de su contenido de testosterona.

La concentración de testosterona se midió mediante radioinmunoanálisis con un kit en fase líquida (ICN-Pharmaceuticals, Inc.) con un error intraensayo menor al 10%.

La evaluación estadística se realizó mediante análisis de varianza con arreglo factorial, utilizando el peso testicular de la muestra y el porcentaje de la muestra con respecto al peso del testículo como covariables (Snedecor y Cochran, 1971), de acuerdo al siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijklm} = \mu + C_i + T_j + S_k + P_l + \beta_1(M_n - M\bar{n}) + \beta_2(P_n - P\bar{n}) + E_{ijklm}$$

nde: Y_{ijklm} es la variable de respuesta para los niveles de testosterona en el cultivo; μ es la media poblacional constante; C_i es el efecto del i -ésimo cabrito ($i= 1,2,3,4,5$); T_j es el efecto del j -ésimo testículo (derecho, izquierdo); S_k es el efecto del k -ésimo método de separación celular ($k=$ Mecánico, Tripsina); B_1 es el efecto de los gradientes de percol ($l= 20, 25, 30$ y 35%), $\beta_1(M_n-M_{\bar{n}})$ es el efecto del peso testicular de la muestra utilizado como covariable; $\beta_2(P_n-P_{\bar{n}})$ es el efecto del porcentaje testicular de la muestra, utilizado como covariable.

RESULTADOS

En el cuadro No. 1 se muestran los cuadrados medios del análisis de varianza para la separación de células de Leydig de cabritos en gradientes de Percoll, en donde se observa que hubo diferencia significativa en cada cabrito ($P < 0.0001$) y en los gradientes de Percoll ($P < 0.0017$).

En el cuadro No. 2 se presenta el efecto del testículo izquierdo ó derecho para la separación de células de Leydig en gradientes de Percoll, en donde se observa que no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$).

En el cuadro No.3 se anota el efecto del método de separación celular sobre niveles de testosterona en cabritos y se muestra que no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$).

En el cuadro No. 4 se muestra el efecto de los gradientes de Percoll para la separación de células de Leydig en cabritos, en donde se observaron diferencias significativas y se encontró una tendencia de mayor concentración de células de Leydig en la capa superior del tubo en donde no había gradiente de Percoll.

CUADRO 1. CUADRADOS MEDIOS DEL ANALISIS DE VARIANZA PARA LA SEPARACION DE CELULAS DE LEYDIG DE CABRITOS EN GRADIENTES DE PERCOLL.

FUENTES DE VARIACION	gl	CUADRADOS MEDIOS	Pr > F
CABRITO	4	4.14	0.0001
LADO DEL TESTICULO	1	0.00	0.9730
METODO DE SEPARACION CELULAR	1	0.63	0.2257
GRADIENTES DE PERCOLL	4	2.00	0.0017
PESO DE LA MUESTRA	1	0.54	0.2610
PROPORCION DE LA MUESTRA	1	0.35	0.3661
ERROR	88	0.42	

CUADRO 2. EFECTO DEL TESTICULO IZQUIERDO O DERECHO PARA LA SEPARACION DE CELULAS DE LEYDIG DE CABRITOS EN GRADIENTES DE PERCOLL	
(Media de testosterona \pm ee)	
TESTICULO	TESTOSTERONA
DERECHO	0.41 \pm 0.09 ng
IZQUIERDO	0.42 \pm 0.09 ng
No existieron diferencias significativas (P> 0.05).	

CUADRO 3. EFECTO DEL METODO DE SEPARACION CELULAR SOBRE LOS NIVELES DE TESTOSTERONA EN CABRITOS	
(Media de testosterona \pm ee).	
METODOS DE SEPARACION	TESTOSTERONA
MECANICO	0.50 \pm 0.09 ng
TRIPSINA	0.33 \pm 0.09 ng
No existieron diferencias significativas (p>0.05).	

CUADRO 4. EFECTO DE LOS GRADIENTES DE PERCOLL PARA LA SEPARACION DE CELULAS DE LEYDIG EN CABRITOS (Media de testosterona \pm ee)

GRADIENTES DE PERCOLL	TESTOSTERONA
0	0.92 \pm 0.13 ng a
20	0.13 \pm 0.14 ng b
25	0.27 \pm 0.15 ng b
30	0.28 \pm 0.14 ng b
35	0.47 \pm 0.14 ng b

Letras diferentes en las columnas representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

DISCUSION

La literatura consultada presenta una gran variación en cuanto a los gradientes de Percoll utilizados así como a las velocidades de centrifugación y el tamaño de la muestra, el trabajo entonces consistió en adecuar diferentes metodologías para obtener una que pudiera ser implementada en el laboratorio de Reproducción Animal de la FES-Cuautitlán.

Después de leer cuidadosamente varios artículos, se obtuvieron datos sobre características y se establecieron dos protocolos de trabajo de laboratorio para escoger el que mejor se adecuara a las condiciones de nuestro laboratorio.

La velocidad de centrifugación pareció ser baja con respecto a los gradientes de Percoll de ahí que la parte más importante de tejido capaz de secretar testosterona se almacenará en la superficie de los gradientes de Percoll, sin embargo resultó ser suficiente para que algunas células de Leydig se almacenaran en el gradiente de 35%, coincidiendo con algunas publicaciones (Moore *et al.*, 1993; Contreras y Ronco, 1994; Frayne y Nicholson, 1994), sin embargo al no ser significativo, es necesario modificar las velocidades de centrifugación incrementándolas.

El porcentaje y cantidad de tejido testicular obtenido, no afectó las variaciones del trabajo, lo que significa que proporciones similares de tejido testicular sano ofrecen poblaciones homogéneas de células de Leydig para cada especie en particular.

Existió como es natural una variabilidad propia de cada individuo, la cual fue utilizada como bloque dentro del modelo estadístico para remover variabilidad, por lo que no puede inferirse sobre éste parámetro.

La cantidad de testosterona producida después del estímulo con hCG, es un indicativo de la presencia de células de Leydig, sin embargo no permite cuantificar la cantidad de células ya que no se encontraron datos acerca de la producción en cabras, además alguna cantidad de la estimada puede provenir de la producida antes del cultivo, por lo que se propone realizar trabajos para estimar la cantidad de testosterona producida por unidad celular.

En cuanto al método de separación, tampoco hubo una diferencia significativa pero si se presentó mayor separación en el método mecánico, por lo que este método aparte de económico puede ser útil aunque sería importante cuantificar la cantidad de células que sufrirían daño, así también es importante comparar el método con colagenasa ya que se menciona ampliamente en la literatura.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Para una separación adecuada en este tipo de gradientes de Percoll, es necesario aplicar una fuerza de gravedad mayor durante la centrifugación.

El gradiente de Percoll del 35% pareció ser adecuado para separar las células de Leydig, sin embargo el valor de 0.47 ng/ml no fue significativo con respecto a otros gradientes, por lo que se recomienda seguir trabajando sobre este método para obtener resultados más confiables.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

LITERATURA CITADA

- 1.- Brown, S.W., Restall, B.J., Norton, B.W. and Scaramuzzi, R.J. (1994). The "female effect" in Australia cashmere goats: effect of season and quality of diet of the LH and testosterone response of buck to oestrus does. *J.Reprod. Fert.* 100:521-527.
- 2.- Cárdenas, H., Baerardinelli, J.G., Burfening, P. and Adair, R. (1994). Histomorphology, LH and HCG receptors, and testosterone secretion in vitro in Rambouillet rams from lines in which females had been selected for low or high productive rate. *J. Reprod. Fert.* 102: 201-207.
- 3.- El-Hefnawy, T., Krawczyk, Z., Nikula, H., Vihera, I. and Huhtaniemi, I. (1996). Regulation of function of the murine luteinizing hormone receptor promoter by cis-trans-acting elements in mouse Leydig tumor cell. *Mol. Cell. Endocrin.* 119: 207-217.
- 4.- Contreras, H. y Ronco, M., (1994). Leydig cell heterogeneity as judged by quantitative cytochemistry of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in individual rat Leydig cells. *J. Steroid Biochem Molec. Biol.* 51(1/2): 73-79.
- 5.- Delgadillo, J.A., and Chemineau, P., (1992). Abolition of the seasonal the release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. *J.Reprod. Fert.* 94:45-55.
- 6.- Duchatelle, P. and Joffre, M. (1990). Potassium an chloride conductances in rat Leydig cell: effects of gonadotrophins and cyclic adenosine monophosphate. *J.Fisiol.* 428:15-37.
- 7.- Dunn, T.G. and Mosst, G. E. (1992). Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. *J. Anim. Sci.* 70: 1580-1593.

- 8.- Frayne, J. and Nicholson, H.D. (1994). Regulation of oxytocin production by purified adult rat Leydig cell in vitro: effects of LH, testosterone and lipoproteins. *J.Endocrin.* 143:325-332.
- 9.- Gastel, T., Bielli, A., Pérez, R., López, A., Castrillejo, A., Franco, J., Laborde, D., Forsberg, M., y Rodríguez, H. (1995). Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corridale rams. *Anim. Reprod. Sci.* 40:59-75.
- 10.- Georgevama, R.L., Bulahbel, S. and Georgiev, H.G. (1994). Patterns of variations in FSH, LH and 17-beta estradiol; during the posnatal development of sheep.
- 11.- Ghinea, N., Vu Hai, M.T., Picard, T.G., Schoevaert, D. and Milgrom, E. (1992). Pathways of internalization of the hCG/LH receptor immunoelectron microscopic studies in Leydig cell and transfered L-cell. *J.Cell. Biol.* 118: 1347-1358.
- 12.- Habert, R.(1993). In vivo acute testicular testosterone response to injection of luteinizing hormone in the rats foetus. *Acta Endocrinologica.* 128:268-273.
- 13.- Hardy, P.M. (1991). Homonal control of Leydig cell differentiation. *Annals N.Y. Academy of Sci.* 152-163.
- 14.- Hileman, S.M., Lubbers, L.S. Rhodes, L., Fuehl, D.E. and Jackson, G.L. (1994). Effect of inhibition 5 alfa reductasa activity on the ability of testosterone to inhibit LH release in male sheep. *Biol. Reprod.* 50:1244-1250.
- 15.- Hou, J.W., Collins, D.C. and Schleicher, R.L.(1990). Sources of chloolesterol for testosterone biosynthesis in murine Leydig cells. *Endocrinology*, 127:2047-2055.
- 16.- Huhtaniemi, I. and Pelliniemi, L. (1992). Fetal Leydig cell: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 201: 125-140.
- 17.- Huhtaniemi, I. (1993). Molecular Biology of the male reproductive system. *Capitulo: Hormonal control mechanisms of Leydig cell.* 383-420.

- 18.- Jana, R.N., Halder, S., Bhattacharya, S. (1996). Thyroid hormone induces a 52 kDa soluble protein in goat testis Leydig cell which stimulates androgen release. *Biochem. Biophys. Acta.* 1292: 209-214.
- 19.- Klinefelter, G.R., Laskey, J.W., Kelce, W.R., Ferrell, J., Roberts, N.L., Suárez, J.D. and Slott, V. (1994). Chloroethylmethanesulfonate-induced effects on the epididymis seem unrelated to altered Leydig cell function. *Biol. Reprod.* 51:82-91.
- 20.- Lejeune, F.H., Chuzel, F., Thomas, T., Avallet, O., Habert, R., Zacz, J. (1996). Regulation paracrine des cellules de Leydig. *Annales d'Endocrinologie (Paris).* 57:55-63.
- 21.- Lin, T., Guo, H., Calkin, J.H. and Chi, R. (1991). Recombinant monocyte-derived interleukin-1 receptor antagonist reverses inhibitory effects of interleukin-1 on Leydig cell steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocr.* 78: 205-209.
- 22.- Matos, C.P. and Thomas, D.L. (1992). Physiology and genetics of testicular size in sheep: a review. *Livest. Prod. Sci.* 32:1-30.
- 23.- McFarlane, J.R., Laslett, a., Kretser, D.M. and Risbridger, G.P. (1996). Evidence that heparin binding autocrine factors modulate testosterone production by the adult rat Leydig cell. *Moll. Cell. Endoc.* 118:57-63.
- 24.- Moore, A. and Morris, LD., (1993). The involvement of insulin-like growth factor-I in local control of steroidogenesis and DNA synthesis of Leydig and non-Leydig cells in the rat testicular interstitium. *Journal of Endocrinology* 138: 107-114.
- 25.- Onoda, M., Djakiew, D. and Papadopoulos, V. (1991). Pachytenen spermatocyte regulate the secretion of Sertoli cell protein which stimulate Leydig cell steroidogenesis. *Moll. Cell. Endoc.* 77: 207-216.

- 26.- Patsavoudi, E., Magre, S., Castaner, M. and Jost, A. (1985). Dissociation between testicular morphogenesis and functional differentiation of Leydig cells. *J. Endocr.* 105: 235-238.
- 27.- Pharmacia Biotech., (1994). *The world of Pharmacia Biotech 95*. Uppsala. Suecia.:21.
- 28.- Rai, U. and Haider, S. (1991) Testis and epididymis of the indian wall Lizard (*Hemidactylus flaviviridis*): Effects of flutamide on FSH and testosterone influenced spermatogenesis, Leydig cell, and epididymis. *J. Morphol.* 209:133-142.
- 29.- Romano, M.C. and Pedernera, E. (1991). *Temas selectos de biología de la reproducción capítulo: Células de Leydig*. Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, UNAM. 233-257.
- 30.- Saez, J.M. (1994). Leydig Cells: Endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocrine reviews*, 15:574-626.
- 31.- Sharpe, P.T., (1988). *Centrifugation*. En: *Methods of Cell Separation*. Elsevier. Amsterdam. Holanda.: 18-69.
- 32.- Snedecor, G.W. y Cochran, W.G., (1971). *Métodos estadísticos*. Compañía Editorial Continental S.A. México.
- 33.- Tapanainen, J., Kuopio, T., Pelliniemi, L.J. and Hutaniemi, I. (1984). Rat testicular endogenous steroids and number of Leydig cells between the fetal period and sexual maturity. *Biol. Reprod.* 31:1027-1035.
- 34.- Teerds, K.J., Rooij, D.G. and Wensing, C.J. (1990). Development of a new Leydig cell population after the destruction of existing Leydig cells by ethane dimethane sulphonate in rats: an autoradiographic study. *J. Endoc.* 126:229-236.
- 35.- Tilbrook, A.J., de Kretser, D.M. and Clarke, I.J. (1991). *Studies on the testicular source of inhibin and its route of secretion in rams: failure of the Leydig cell to secrete inhibin in response to a human chorionic gonadotrophin/LH stimulus*. *J. Endoc.* 130:107-114.

- 36.- Veeramachandri, D.N., Schanbacher, B.D. and Amann, R.P. (1989). Immunolocalization and concentrations of Inhibin alpha in ovine testis and excurrent ducts system. *Biol. Reprod.* 41:499-503.
- 37.- Voglmayr, J.K., Mizumachi, M., Washington, D.W., Chen, C.L. and Bardin C.W. (1990) Immunization of rams against Human Recombinant Inhibin alpha-gonadotrophin levels. *Biol. Reprod.* 42:81-86.
- 38.- Wood, R.I. and Foster D.L. (1992). Prenatal androgens and the timing of seasonal reproductive transition in sheep. *Biol. Reprod.* 47:389-396.