

00381



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DEL POSIBLE PAPEL REGULADOR DE LAS
UNIONES COMUNICANTES EN LA FUNCIÓN
SECRETORA DE LAS CÉLULAS DE LEYDIG.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A :

JOSÉ FRANCISCO BRAVO MORENO

DIRECTORA DE TESIS : DRA. ELIA MARTHA PÉREZ ARMENDÁRIZ

MÉXICO, D.F.

FEBRERO DEL 2005

m341358



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.

Dedicatoria

A mis Abuelos a mis Padres y a mis Hermanos.

A mi Tía y a su hijo, mi sobrino Luis Armando.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jose Francisco Bravo
Moreno

FECHA: 24 de Febrero del 2005

FIRMA: Benito Moreno

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca de doctorado que se me otorgó, y a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (DGEP), por la beca complementaria otorgada. A los donativos CONACYT num. 26789N, DGAPA-UNAM IN330297 y IN231799, otorgados a la Dra. Pérez-Armendariz, que financiaron este proyecto. A la UNISSER, Del Departamento de Medicina Experimental de La Facultad de Medicina, UNAM, por cubrir el costo de la segunda publicación incluida en esta tesis.

Agradezco a los miembros del comité tutorial, quienes también fueron sinodales del examen, por el apoyo mostrado durante la realización y culminación del proyecto de tesis. Dicho comité estuvo conformado por el siguiente grupo de investigadores:

- *La Dra Elia Martha Pérez-Armendáriz, Profesora e Investigadora de la Unidad de Enseñanza y Salud Reproductiva del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. La Dra. Pérez- Armendáriz también fungió como Directora del proyecto de tesis.*
- *La Dra Martha C. Romano Pardo, Investigadora y Profesora del Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV).*
- *La Dra. Laura Escobar Pérez, Profesora e Investigadora del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM.*

Agradezco de manera muy especial la participación de los demás miembros sinodales del proyecto de tesis, estuvo conformado por el siguiente grupo de investigadores:

- *El Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano, Profesor e Investigador del Departamento de Genética y Toxicología Reproductiva de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM (FES-Z).*
- *El Dr. Javier Velázquez Moctezuma, Profesor e Investigador del Departamento de Biología de la Reproducción de la UAM Iztapalapa.*
- *La Dra. María Betzabet Quintanilla Vega, Profesora e Investigadora del Departamento de Toxicología (Sección Externa) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV).*
- *El Dr. Edmundo Bonilla González. Profesor e Investigador del Departamento de Ciencias de la Salud de la UAM Iztapalapa.*

Agradezco al personal de la Administración del Posgrado de la Facultad de Ciencias de la UNAM en especial al Sr. Antonio Suarez, por las atenciones mostradas durante el tiempo de realización de esta tesis.

Agradezco a la Dra Deni Claudia Vargas López, Jefa del Posgrado de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por indicarme las diligencias administrativas pertinentes para la adecuada culminación de este proyecto.

Agradezco al Dr. Gregorio Pérez Palacios, Coordinador del Posgrado de la Facultad de Medicina de la UNAM y Jefe de la Unidad de Enseñanza y Salud Reproductiva del Departamento de Medicina Experimental de la propia Facultad, por permitirme utilizar su espacio para la terminación del proyecto.

INDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN. 1.0.- Componentes celulares del testículo	5
1.1.- Las células germinales.....	5
1.1.1.- Periodo fetal.....	5
1.1.2.- Periodo posnatal.....	6
a).- Espermatogonias.....	6
b).- Espermatocitos.....	6
c).- Espermiogénesis y Espermátidas.....	6
1.2.- Células somáticas del parénquima tubular.....	7
1.3.- Las células de Sertoli.....	7
1.4.- Las células somáticas intersticiales.....	7
1.5.- Las células de Leydig.....	9
2.0.- ANTECEDENTES GENERALES SOBRE EL ORIGEN DE LAS CÉLULAS TESTICULARES	9
2.1.- Desarrollo de la gónada sexualmente indiferenciada.....	10
2.2.- Origen y proliferación de las células germinales.....	10
2.3.- Hipótesis sobre el origen de las células somáticas.....	11
a).- Procedencia de las células de Sertoli a partir de las células tubulares mesonéfricas.....	11
b).- Procedencia de las células de Sertoli a partir del epitelio celómico.....	11
c).- Procedencia de las células intersticiales y de los cordones sexuales a partir del estroma mesonéfrico.....	12
3.0.- ANTECEDENTES GENERALES SOBRE EL DESARROLLO DE LAS PRINCIPALES CELULAS TESTICULARES	13
3.1.- Topología, proliferación y diferenciación de las células germinales	13
a).- Proliferación de las células germinales en ratón.....	13
b).- Diferenciación de las células germinales.....	13
3.2.- MOLECULAS REGULADORAS DE LA PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE LAS CELULAS GERMINALES DURANTE EL DESARROLLO EN EL ROEDOR	14
3.2.1.- Periodo fetal, neonatal y prepuberal	14
a).- Hormonas gonadotrópicas.....	15
b).- Modulación parácrina de la proliferación y diferenciación de las células germinales.....	16
i).- La activina y la follistatina.....	17
ii).- Hormona inhibidora muleriana (MIH).....	17
c).-Posible efecto del número de células de Sertoli en la proliferación de las células germinales.....	17
3.2.2.- INICIO Y MANTENIMIENTO DE LA ESPERMATOGENESIS	18
A).- Inicio de la espermatogénesis.....	18
i).- Regulación por la acción sinérgica de la FSH, LH y la testosterona.....	18
B).- Mantenimiento de la espermatogénesis.....	19
a).-Regulación ejercida por la testosterona.....	19
b).- Posible efecto regulatorio indirecto ejercido por la hormona FSH.....	20
3.3 ANTECEDENTES SOBRE EL DESARROLLO DE LAS CELULAS SOMATICAS DEL TESTICULO	21
3.3.1.- Antecedentes generales sobre la topología, proliferación y diferenciación de las células de Sertoli en el ratón	21
i).- Moduladores de la proliferación y diferenciación de las células de Sertoli.....	21
3.3.2.- Antecedentes generales sobre el desarrollo de las células intersticiales de Leydig	22

A).- Desarrollo de las células de Leydig durante el periodo fetal.....	22
B).-Etapas del desarrollo de las células de Leydig durante el periodo posnatal.....	23
i).- Periodo neonatal y prepuberal.....	23
ii).- Periodo puberal y adulto.....	24
3.3.3.- Regulación de la proliferación y diferenciación de las células de Leydig.....	24
3.3.3.1.- Periodo fetal.....	24
3.3.3.2.- Periodo posnatal.....	25
i).- La hormona luteinizante (LH) regula la diferenciación de las células de Leydig posnatales.....	25
ii).- Efecto regulador de la FSH en el control del desarrollo de las células de Leydig posnatales.....	26
iii).- Efecto regulador autócrino de los andrógenos en las células de Leydig y su sinergismo con la LH.....	26
iv).- Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I).....	26
v).- TGF α e interleucina.....	27
4.0.- LOS ELEMENTOS NEUROENDOCRINOS DE LA REPRODUCCIÓN.....	28
4.1.- Definición y descripción general de las principales gonadotropinas.....	28
4.2.- Descripción general de las células hipofisarias productoras de gonadotropinas.....	29
4.3.- Ontogenia de la expresión de LH.....	29
4.4.- Ontogenia de la expresión de FSH.....	30
4.5.- Retroalimentación negativa en el control de la secreción de gonadotropina.....	30
5.0.- VIAS METABOLICAS DE LOS ANDROGENOS EN LAS CELULAS DE LEYDIG.....	31
5.1.- Citocromo P450 scc (liberadora de la cadena lateral).....	31
5.2.- 3 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa/ Δ^4 - Δ^5 Isomerasa (3 β -HSD).....	32
5.3.- Citocromo P450 17.....	32
5.4.- 17 β - Hidroxiesteroide deshidrogenasa/cetosteroide reductasa (17 β -HSD/17KSR).....	32
5.5.- 5 α -Reductasa.....	33
5.6.- Localización de las enzimas esteroideogénicas.....	33
5.7.- Regulación de las enzimas esteroideogénicas y del receptor a LH en las células de Leydig inducido por gonadotropinas.....	34
a).- Regulación del receptor a LH.....	34
b).-Regulación del receptor a FSH.....	35
b).- Regulación de las enzimas esteroideogénicas inducido por LH.....	35
c).- Posible regulación de algunas enzimas esteroideogénicas inducido por la acción de la FSH.....	36
6.0.- UNIONES COMUNICANTES O SINAPSIS ELECTRICA.....	38
6.1.- Antecedentes generales sobre la estructura de las uniones comunicantes.....	38
6.2.- Antecedentes moleculares de las uniones comunicantes.....	39
6.3.- Antecedentes generales sobre la biofísica de los canales de unión comunicantes.....	40
6.4.- Regulación de las conexinas.....	42
6.5.- Transferencia de segundos mensajeros a través de uniones comunicantes.....	43
6.6.-Antecedentes generales sobre la función de las uniones comunicantes.....	44
6.7.- Regulación de la secreción mediada por uniones comunicantes.....	45
7.0.-ANTECEDENTES SOBRE LAS UNIONES COMUNICANTES EN EL TESTICULO.....	46
7.1-Identificación de uniones comunicantes en las células del testículo.....	46
a).- Testículo fetal.....	46
b).- Testículo neonatal y prepuberal.....	46
c).- Testículo adulto.....	46
7.2.- Conexinas descritas en las células del testículo adulto.....	47
a).- Túbulo seminífero.....	47
b).- Conexinas descritas en las células intersticiales.....	48

i).- Evidencias moleculares de la expresión de la Cx43 en las células de Leydig adultas.....	48
ii).- Evidencias electrofisiológicas de la expresión de la Cx43 en las células de Leydig adultas.....	49
iii).- Antecedentes sobre la regulación de la expresión de la Cx43 y de la comunicación intercelular en las células de Leydig adultas.....	49
iv).- Heterogeneidad en las células de Leydig.....	50
v).- La conexina 43 en la función testicular.....	51

FIGURAS.....	52
HIPOTESIS.....	71
OBJETIVOS.....	72
ARTICULOS	
DISCUSION.....	73
ABREVIATURAS.....	80
BIBLIOGRAFIA.....	82

RESUMEN

En 1994 el laboratorio de la Dra. Pérez-Armendariz documentó por primera vez que las células de Leydig se intercomunican principalmente a través de canales formados por la Cx43 (Cx43). Esta conclusión la obtuvo en base a resultados moleculares y al registro de corrientes de unión comunicante entre pares aislados de células de Leydig sometidas a doble fijación de voltaje. Un par de años después, su grupo también demostró que dos principales reguladores de la función testicular, las hormonas LH y hCG, incrementan la expresión de la Cx43 y la comunicación intercelular en forma paralela al incremento en la secreción de testosterona sugiriendo su interrelación. Dado que la producción de LH y de testosterona durante el desarrollo es bifásica, uno de los objetivos de esta tesis fue el contestar si la Cx43 se expresaba en las células de Leydig durante la ontogenia del ratón, y si la expresión de esta conexina era regulada *in vivo* en forma bifásica. También por estudios de la Dra Pérez-Armendariz y de varios otros grupos de investigación, se sabe que en testículo adulto, la Cx43 se expresa en las células de Sertoli así como también entre las células de Sertoli y las células germinales. También que durante la vida adulta su expresión se regula durante el ciclo de la espermatogénesis. Estos hallazgos indicaron la relevancia de la Cx43 para la función testicular. Recientemente, ésta ha sido demostrada ya que se encontró que la delección del gen de la Cx43 induce una disminución de las células germinales durante la vida fetal y neonatal. No obstante, la expresión de la Cx43 en estos periodos no había sido investigada. De lo anterior, en la presente tesis también nos preguntamos si la Cx43 se expresa en las células del cordón seminífero durante el periodo fetal, neonatal y prepuberal, así como si su expresión es regulada en forma paralela al inicio de la espermatogénesis. Para contestar estas preguntas desarrollamos anticuerpos policlonales específicos para identificar a la Cx43. Con éstos realizamos estudios de inmunocitoquímica de doble-marcaje en criosecciones de testículo a diferentes edades del desarrollo fetal, neonatal, prepuberal, puberal y adulto. Para esto también utilizamos anticuerpos contra proteínas específicas de los diferentes tipos celulares del testículo. Encontramos que la Cx43 se expresa desde las etapas más tempranas del desarrollo gonadal al día 11.5 post coitum (dpc). Su expresión se mantiene a todo lo largo de la vida fetal, neonatal y prepuberal. Al día 12.5 dpc, cuando la gónada morfológicamente ya se ha diferenciado sexualmente, encontramos que su distribución celular es amplia, forma uniones homocelulares entre las células de Leydig así como también entre las de Sertoli. Además, forma uniones heterocelulares entre las células de Sertoli y las células germinales durante la ontogenia del ratón. Tanto en las células de Leydig intersticiales como en las células de Sertoli, su expresión se incrementa progresivamente durante la vida fetal. También en ambos tipos celulares, la expresión de la Cx43 se regula muy dinámicamente durante la vida neonatal y prepuberal. En el cordón seminífero, la regulación de la Cx43 neonatal y prepuberal ocurren correlacionada al inicio y progresión de la espermatogénesis. En las células de Leydig, su expresión se regula en una forma bifásica que se correlaciona directamente con la producción bifásica de testosterona a través del desarrollo en el ratón. De lo anterior, los resultados de esta tesis nos permite proponer que la Cx43, está participando en la regulación de la producción de testosterona *in vivo*. También, el proponer que la pérdida de las células germinales descrita en ausencia del gen de la Cx43, resulta de alteraciones en la comunicación intercelular mediada por canales formados con esta conexina durante las etapas tempranas del desarrollo fetal gonadal. Los resultados de esta tesis fueron materia de dos publicaciones en revistas internacionales aquí incluidas y una de las figuras del segundo artículo fue seleccionado para la portada de la revista.

INTRODUCCIÓN

1.0. - COMPONENTES CELULARES DEL TESTÍCULO

El testículo se encuentra suspendido fuera de la cavidad abdominal en un pliegue epidérmico conocido como escroto. En los mamíferos, los testículos descienden hacia el escroto durante el desarrollo postnatal. Esto les proporciona una temperatura más fría (34°C) dotándolos de un medio ambiente óptimo para la diferenciación de los espermatozoides. El testículo está formado por un componente tubular y otro intersticial. El primero está formado por los cordones seminíferos que en el adulto se diferencian a los túbulos seminíferos. En el interior de los cordones y túbulos seminíferos se localizan las células germinales y las células de Sertoli. Estas últimas rodean a las células germinales tanto en su estadio de gametos inmaduros como durante su diferenciación a espermatozoides. Además de los espermatozoides, en el túbulo seminífero se producen una variedad de hormonas proteicas, las cuales regulan la reproducción masculina. El segundo compartimiento o componente extratubular, está formado por células intersticiales que incluyen a las células de Leydig, las cuales liberan la testosterona que es la principal hormona endocrina producida por el testículo que es responsable de la masculinización del sujeto (Fig. 1 A).

Como punto inicial de esta tesis se definirán los tipos celulares principales que componen al testículo y se resumirán sus características morfológicas y fisiológicas principales (Cormack, 1988; Steiner y Cameron, 1990).

1.1) Las células germinales

El desarrollo de las células germinales requiere de dos procesos fisiológicos conocidos como mitosis y meiosis. Convencionalmente se define a la mitosis como el proceso por el cual se duplica una célula al igual que su material genético, y como meiosis el proceso por el cual una célula genera otras cuatro sin duplicación de su material genético. En este caso su número cromosómico se reduce a la mitad, lo cual culmina con la generación de gametos (Conmarck, 1988).

1.1.1) Periodo Fetal

Gonocitos. Durante la etapa embrionaria, las células germinales son inicialmente conocidas como gonocitos. Estos son identificados por tener un núcleo redondo y mucho más grande que el de cualquiera de las otras células testiculares. En el testículo del ratón, al día 12.5 poscoitum (dpc), los gonocitos pueden identificarse por estar uniformemente distribuidos, rodeados de las proyecciones citoplásmicas de las células de Sertoli dentro de los cordones seminíferos. Al día 16 dpc, los gonocitos se localizan en el centro del cordón seminífero, posición que conservarán hasta el nacimiento (Vergoween et al., 1991).

1.1.2 Periodo posnatal (dpp)

En la prepubertad las células germinales inician su diferenciación, la cual culmina con la formación de los espermatozoides (ver adelante). A partir de esta etapa de desarrollo las células germinales presentarán continuamente ciclos de proliferación y diferenciación en el túbulo seminífero. A continuación se resumen algunas características principales de los diferentes estadios de diferenciación de las células germinales.

a) Espermatogonias.

El primer estadio de diferenciación de los gonocitos son las espermatogonias. Estas se les clasifica en dos subtipos, células tipo A o tipo B. La espermatogonia tipo A en el ratón se observa a partir del día 3 dpp, tiene abundante cromatina en forma de gránulos finos y el nucleolo se encuentra cerca de la membrana nuclear. Más tarde, las espermatogonias tipo A se diferencian a espermatogonias tipo B (Cormack, 1988). Este tipo de espermatogonias presenta los núcleos más voluminosos y la cromatina se encuentra más dispersa. Las espermatogonias se multiplican y se diferencian a espermatocitos primarios en estado preleptoténico. Los espermatocitos preleptoténicos atraviesan la barrera hematotesticular (ver adelante) y pasan del compartimiento basal al adluminal (Nebel et al., 1962).

b) Espermatocitos

Los espermatocitos preleptoténicos entran a la profase meiótica la cual consiste de cinco etapas. En la primera etapa, de *leptoteno* (L) se hacen visibles y se alinean los cromosomas en el plano ecuatorial de la célula. En la segunda etapa llamada *cigoteno* (Z) cada cromosoma busca a su compañero homólogo para formar cromosomas divalentes. En la etapa de *paquitenio* (PQ) los cromosomas se condensan y se hacen más gruesos. En la etapa de *diploteno* (DP) los dos cromosomas de cada divalente se separan y la célula sufre diacinesis concluyéndose con ello la primera profase meiótica. A este tipo de célula germinal se le denomina espermatocito secundario. En la etapa inmediata, la célula entra a la *metafase* y con ello se inicia la segunda división meiótica, cada célula presenta a los cromosomas divalentes en el plano ecuatorial. En la *anafase*, cada cromosoma del divalente se separa hacia los polos y en la *telofase* cada una de las células hijas queda con la mitad del número cromosómico original. La célula germinal originada de la última división meiótica recibe el nombre de espermátida redonda (Cormack, 1988).

c) Espermiogénesis y espermátidas

Se define como espermiogénesis el proceso de diferenciación y desarrollo que determina el cambio de los espermatocitos a espermátidas. La Fig.1B muestra un esquema resumido de las principales etapas en la diferenciación de las espermátidas. La fase de Golgi abarca los pasos 1-3. El aparato de Golgi cercano a la membrana nuclear produce dos gránulos formados por carbohidratos denominados “acrosómicos”, los

cuales se fusionan como un solo, este recibe la denominación de gránulo acrosómico porque se posiciona en el extremo anterior o cefálico de la membrana nuclear (akron significa extremidad). A partir de un centriolo, se genera un pequeño filamento caudal que finalmente será el futuro flagelo, el cual irá creciendo progresivamente. En los pasos 4-7: la fase CAP, el gránulo acrosómico produce dos estructuras, el acrosoma que es un granulo pequeño situado justo a la mitad del extremo anterior del núcleo, y una estructura semejante a una membrana que se desarrolla alrededor del acrosoma cubriendo aproximadamente una tercera parte de la superficie nuclear, esta membrana se denomina caperuza o capuchón cefálico (cap-head). En el paso 8-12: fase del acrosoma. El núcleo y el acrosoma se orientan hacia la región basal del túbulo, el núcleo se elonga y la caperuza se extiende hacia la región caudal. Más tarde, el núcleo y el acrosoma se aplanan y se alargan situándose en lo que se podría considerar la región dorsal del núcleo, el acrosoma adquiere una estructura en forma de gancho. En los pasos 13-16: La fase de maduración en donde los espermias adquieren su forma totalmente madura, en esta etapa, el núcleo se condensa y aplanan aun más, el acrosoma ya no se puede diferenciar de la caperuza, éste junto con el núcleo adquieren forma afilada en el extremo cefálico, el excedente citoplasmático se desprende y es fagocitado por las células de Sertoli y finalmente la espermátida toma su forma definitiva (Oakberg, 1956).

1.2) Células somáticas del parénquima tubular

1.3.- Las células de Sertoli

Las células de Sertoli, son células somáticas parenquimatosas que se diferencian al momento que ocurre la diferenciación sexual gonadal. Esto puede observarse claramente por microscopía electrónica en el ratón al día 12.5 dpc (ver adelante). Conjuntamente con las células germinales, las células de Sertoli forman el cordón y posteriormente los túbulos seminíferos. Desde su aparición, la membrana de la célula de Sertoli siempre mantiene íntimo contacto con las células germinales, por lo que se ha considerado que tienen un papel en la maduración de los gametos. También han sido denominadas como células nodrizas (ver figura 1 A). Estas rodean con sus procesos citoplasmáticos a las células germinales en sus distintos estados de diferenciación. En el estado adulto, las células de Sertoli tienen forma columnar y su membrana se polariza. Las células de Sertoli descansan sobre una membrana basal. Las células de Sertoli adultas presentan un núcleo irregular el cual se localiza en la parte basal del túbulo. Al microscopio electrónico se observa que el núcleo presenta a sus lados masas de cromatina no condensada, lo que produce la impresión de que el núcleo es triple. Con tinción especial al microscopio de luz también se identifica como un núcleo tripartita. La célula de Sertoli contiene más retículo endoplásmico liso que retículo endoplásmico rugoso. Adicionalmente presentan lisosomas, lo cual les permite degradar y fagocitar

cuerpos residuales de los espermatozoides (Rev: Cormarck, 1990; Rev: Fawcet, 1975). Además de su posible función como células nodrizas de las células germinales, las células de Sertoli son capaces de tener un gran número de interacciones endocrinas, parácrinas y autócrinas debido a que secretan una variada cantidad de moléculas (ver adelante). Por ejemplo, la secreción de inhibina inducida por la hormona folículo estimulante (FSH) en las células de Sertoli adultas inhibe por retroalimentación negativa la liberación de la propia hormona. Otra importante función de las células de Sertoli es el ser la célula responsable de formar la barrera hematotesticular en el túbulo seminífero del animal adulto. Esta barrera se encuentra formada por proteínas de las membranas de dos células de Sertoli adyacentes formando los complejos de unión que permiten la adhesión firme entre estas células. Los complejos de unión incluyen a diferentes estructuras tales como: uniones estrechas, uniones comunicantes, desmosomas y elementos fibrilares. Estos complejos delimitan la región basal y la región adluminal, limitando el transporte de grandes moléculas entre estos compartimentos y segregando proteínas específicas en la membrana basal y apical. Por ejemplo, se sabe que la región basal del túbulo expresa una proteína llamada glicoproteína p la cual expulsa drogas citotóxicas (Melaine et al., 2002). Las células germinales se encuentran embebidas en el citoplasma de las células de Sertoli, tanto en la región basal como apical. Desde que se descubrió la barrera hematotesticular, se consideró que tenía como una de sus funciones principales el proteger a las células germinales de influencias dañinas de moléculas citotóxicas que provienen de la circulación sanguínea, confinando dentro de la luz de los túbulos los productos antigénicos producidos por las células germinales posmeióticas. De esta forma se evita su contacto con la circulación sanguínea y la consecuente generación de una reacción autoinmune (Fawcet, 1975, Gilula et al., 1976, Rev: Steiner y Cameron, 1990). Se ha propuesto el que la región adluminal mantiene un microambiente inmunológicamente privilegiado mediante la secreción específica y dirigida de moléculas inmunosupresoras, debido a que es extremadamente raro ver linfocitos cercanos al lumen o en el intersticio, lo que potencialmente, podría generar acciones citotóxicas (Filippini et al., 2001).

1.4) Las células somáticas intersticiales

Las células intersticiales se encuentran localizadas entre los túbulos seminíferos (Fig. 2A). Estas incluyen a las células semejantes a los fibroblastos o células mesenquimatosas, macrófagos, células endoteliales, células endoteliales linfáticas, células perivasculares y células miotubulares. Estas últimas presentan actividad contráctil sobre el túbulo seminífero y delimitan el espacio intersticial tanto en la vida fetal como postnatal. El principal tipo celular dentro del intersticio son las células de Leydig, que son las responsables de la producción de testosterona. Estas células durante la vida adulta llegan a constituir el 80 % de las células intersticiales (Vergoween et al., 1991).

1.5) Las células de Leydig

Las células de Leydig en los roedores se organizan como agregados o acúmulos. Es frecuente encontrarlas cerca de vasos sanguíneos que rodean a los túbulos seminíferos (Fig. 2A y 2B). Tienen una forma poligonal presentando un núcleo ovoide, la heterocromatina frecuentemente rodea la envoltura nuclear. Son uninucleares en la mayoría de las especies de mamíferos. En el ratón, su diámetro promedio es de 20 μm . Su número absoluto en el ratón adulto, se ha estimado en 2.0×10^6 células/testículo (Vergowen et al., 1993). Existe una relación directa entre la superficie del retículo endoplásmico liso (REL) y la capacidad para producir testosterona. De hecho, el área del REL es regulada por la hormona luteinizante (LH). El área del REL se incrementa en presencia de ésta hormona e involuciona al disminuir el estímulo gonadotrópico (Ewing y Zirkin, 1983). Las células de Leydig presentan un aparato de Golgi con formas vesiculadas. Estas son abundantes en las épocas de reproducción y menos abundantes en los periodos de quiescencia en las especies de reproducción estacional (Rev: Rusell, 1996). Las células de Leydig presentan gotas de lípidos al término de la vida fetal y en la época de madurez en el animal adulto. Estas gotas son claramente visibles en el ratón (Kerr et al., 1985), mientras que en la rata, sólo se observan en el periodo fetal y parte del periodo prepuberal (Ge et al., 1998). Cuando son observadas al microscopio electrónico, también se encuentran numerosas proyecciones citoplasmáticas. De hecho las células de Leydig son capaces de englobar partículas. Las células de Leydig frecuentemente forman procesos que se adentran formando depresiones en la superficie membranal de los macrófagos que se encuentran en contacto con ellas en el espacio intersticial. No obstante se desconoce la función de estas interacciones (Niemi et al., 1986; Rev: Orth, 1993; Rev: Rusell, 1996). Los bordes externos de los cúmulos de células de Leydig están rodeados de material de colágeno típico de las membranas basales. Las células de Leydig sirven como una fuente de esteroides para la diferenciación masculina y para la espermatogénesis. Los productos secretorios de las células de Leydig incluyen a la testosterona. Para una mayor información sobre estructura y función de las células de Leydig pueden consultarse las revisiones de Rusell, 1996, y Ewing y Keene, 1993.

2.0) ANTECEDENTES GENERALES SOBRE EL ORIGEN DE LAS CELULAS TESTICULARES

Las células germinales en la etapa embrionaria migran desde el intestino posterior y el mesenterio dorsal hacia el primordio o cresta gonadal que resulta de un engrosamiento del *mesonefros* (ver adelante) (Steinberger y Steinberger, 1975). A partir de la diferenciación sexual gonadal, que en el ratón ocurre al 12.5 día poscoitum (dpc), las células germinales quedan englobadas en las proyecciones citoplasmáticas de las células parenquimatosas que se diferencian a células de Sertoli. Estas últimas producen y secretan proteínas que forman una lamina basal. También al 12.5 dpc algunas de las células somáticas intersticiales se diferencian a células de Leydig (ver resultados sección I) y otras a células contráctiles llamadas

peritubulares que rodean a los cordones seminíferos, delimitando así el espacio intersticial del componente tubular. Se desconocen los mecanismos precisos que inician este proceso (Vergoween et al., 1991).

2.1) Desarrollo de la gonada sexualmente indiferenciada

El mesonefros se define como un tejido embrionario que se origina del mesodermo y se detecta a partir del 9 dpc. De éste derivan en el macho los órganos siguientes: los testículos, los riñones, la rete testis y los ductos seminíferos. El mesonefros está formado por *tejido estromal*, *tubulos mesonéfricos*, túbulos wolfianos y tejido vascular. El mesonefros se observa a partir del día 9 dpc en el ratón (Byskov et al, 1986). La *cresta germinal o genital* se produce como un engrosamiento o abultamiento del mesonefros. A partir de este engrosamiento se forma la gónada indiferenciada. Esta se observa por microscopía electrónica al día 9.5 en el ratón (Rev: Byskov, 1986) y en la rata se observa al día 12.5 postcoitum (Satoh, 1985). La llamada cresta genital contiene células mesenquimatosas y células germinales. Las células mesenquimatosas se dividen en “atípicas y típicas”. Las *células atípicas* se ha propuesto que pueden diferenciarse hacia precursoras somáticas, ya que estas forman arreglos celulares lineales que semejan células epiteliales y que son conocidas como “*cordones sexuales*”. Adicionalmente, se encuentran las células mesenquimatosas típicas. A esta masa central de células formada por los cordones sexuales. células mesenquimatosas, excluyendo a las células primordiales germinales, se le ha denominado *blastema o médula* (Steinberger y Steinberger. 1975). Por otra parte, en esta etapa (9.5 dpc) ya se reconoce un epitelio formado por varias capas de células que cubren la médula de la cresta genital o germinal el cual recibe el término actual de *epitelio celómico* (Rev: Byskov, 1986, Karl y Capel 1998). El origen de las células somáticas del testículo ha sido un tema muy controvertido durante varios años. Como veremos adelante existen hipótesis al respecto pero continua siendo un tema de investigación actual.

2.2) Origen y proliferación de las células germinales

Existe consenso general de que las células germinales tienen un origen extragonadal. Las células germinales primordiales son primero detectadas en el ratón, a los 7-8 dpc como una población de células que reaccionan a la fosfatasa alcalina en tejidos embrionarios cercanos a la base del alantoides. Recientemente, también se han identificado mediante la expresión del antígeno nuclear germinal 1, GNCA1 (Enders y May, 1994). En el ratón, las células germinales migran a través del mesenterio dorsal hacia la cresta genital a donde llegan al día 9 y 9.5 dpc en el ratón (Byskov, 1986; Hogan et al., 1986) y en la rata entre el día 12.5 y 13 dpc (Satho, 1985). Durante su migración y durante su establecimiento en la gónada proliferan (ver adelante).

2.3) Hipótesis sobre el origen de las células somáticas

Witchi, en 1951 postula, a partir de observaciones del primordio gonadal de testículo de rana, que las células mesenquimatosas mesonéfricas dan origen a los llamados “*cordones sexuales*” a partir de los cuales se forma el blastema gonadal, pero además sugiere que conforme se desarrolla la médula se adelgaza la capa de células del epitelio celómico, es decir, según su hipótesis, la médula se desarrolla por células que provienen de los túbulos mesonéfricos y del epitelio celómico. A partir de esta hipótesis han surgido modificaciones las cuales se han hecho extensivas a los vertebrados superiores. Estas han sido sustentadas en evidencias que se resumen en esta sección. Para abundar sobre este tema pueden consultarse las revisiones de: Byskov, 1986, Merchant-Larios y Taketo, 1991, Orth, 1993 y Wartenberg, 1989.

a) Procedencia de las células de Sertoli a partir del epitelio de los tubulos mesonéfricos

Satho (1986) y Zamboni y Upadhyay (1982) proponen que las células de Sertoli se forman a partir de los llamados “*cordones sexuales*” de la gónada indiferenciada, y estos que se originan de la diferenciación de las células de los túbulos mesonéfricos. Esta hipótesis la sustentan en la observación de que los túbulos mesonéfricos se localizan colindando con la gónada en muy estrecho contacto con las células mesenquimatosas “atípicas” que dan lugar a los cordones sexuales, sugiriendo su continuidad (Satho, 1982; Zamboni y Uphaday, 1986). Esta hipótesis no ha podido por ahora ser verificada pues se requeriría de una marca que permitiera monitorear a estas células tubulares, desde su estado indiferenciado en el mesonefros, lo cual en la práctica no es posible al momento (Karl y Capel, 1998).

b) Procedencia de las células de Sertoli a partir del epitelio celómico

Burns en 1961, propuso que el epitelio celómico es quien da origen a los “*cordones sexuales*” y posteriormente a la masa gonadal. Esto lo sustentó en sus observaciones morfológicas en donde distinguió que el epitelio celómico parecía guardar continuidad con los cordones sexuales desde la formación del primordio gonadal. Más recientemente, para probar que las células de Sertoli provienen del epitelio celómico, Karl y Capel (1998) microinyectaron células del epitelio celómico en la gónada indiferenciada del ratón en el día 11.5 dpc con el colorante fluorescente DiI. Posteriormente, monitorearon, utilizando microscopía confocal, su ubicación en la gónada diferenciada. Este colorante fluorescente se incorpora a la bicapa lipídica uniéndose a los grupos tiol de las proteínas existentes en la misma. En principio no afecta la viabilidad de la célula y tiene la ventaja de que no se difunde a las células vecinas. También utilizaron anticuerpos específicos dirigidos contra la hormona inhibitoria muleriana (MIH) que es un marcador de las células de Sertoli, así como contra el factor esteroideogénico-1 (SF-1), utilizado aquí como un marcador de especificidad de las células de Leydig. En estudios de colocalización les fue posible

concluir que al 12.5 dpc, la marca del DiI se encontraba en las células de Sertoli. También el DiI se identificó en algunas células intersticiales SF-1 negativas, esto es, no se encontró en las células de Leydig. No obstante en este trabajo no se investigó a que subtipo celular correspondían.

c) Procedencia de las células intersticiales y de los cordones sexuales a partir del estroma mesonéfrico

Byskov, 1986, postula que las células somáticas de la gónada fetal incluyendo a los cordones sexuales y a las células intersticiales se forman a partir de células provenientes del mesénquima mesonéfrico. A diferencia de Witchi (1951), Byskov nunca involucra al epitelio celómico. También propone que el mesénquima genera toda la masa gonadal a excepción de las células germinales. Una derivación de esta hipótesis, como veremos a continuación, ha sido puesta a prueba utilizando ratones transgénicos ROSA 26. Estos ratones fueron generados por ingeniería genética mediante la transfección de una construcción "genica" en células totipotenciales de embrión de ratón, la cual contiene el gen de la β -galactosidasa. Las células que integraron el gen, fueron incorporadas en un embrión en etapa de blastocisto el cual luego fue implantado en una hembra pseudopreñada (Frederich y Soriano, 1991). De esta forma, el gen se insertó en el genoma al azar y se expresó ubicuamente. Para el caso del ratón ROSA 26, a la fecha no existe un estudio que demuestre si hay tejidos en estos animales que no expresan el gen. Merchant et al., (1998) estudiaron chimeras *in vitro* de implantes del mesonefros de ratones transgénicos ROSA 26 con una gónada indiferenciada de ratón silvestre. Ambos tejidos se obtuvieron al día 11.5 dpc, se pusieron en contacto físico y fueron co-cultivados y estudiados por 71 a 91 hrs. Como los ratones transgénicos expresan la enzima β -galactosidasa, su actividad se detecta por medio de la reacción con un cromóforo, el producto de la reacción con éste, genera una coloración azul visible al microscopio de luz. Al microscopio electrónico también es posible detectar los cristales derivados del producto de la reacción del cromóforo. Después de haberse cultivado las quimeras por 3 a 4 días, se observaron células intersticiales en la gónada positivas a la β -galactosidasa mediante estudios de microscopía electrónica. Tanto las células semejantes a fibroblastos o células mesenquimatosas, peritubulares y las células de Leydig, tuvieron marca positiva a la β -galactosidasa. A partir de este trabajo estos investigadores concluyen que los principales tipos de células intersticiales embrionarias testiculares tienen su origen en las células del estroma o mesénquima mesonéfrico. No obstante, dada la ubicua distribución del gen de la β -galactosidasa, estos estudios no permiten diferenciar si las células provienen tan solo del estroma o de los túbulos mesonéfricos. En este trabajo no se discute si esta enzima está o no presente en las células de Sertoli.

Resumiendo, existen evidencias de que las células somáticas intersticiales gonadales provienen del mesonéfrico, aunque falta precisar si éstas provienen del mesénquima o de los túbulos mesonéfricos. También existen evidencias de que las células somáticas de Sertoli provienen del epitelio celómico. No

obstante, a la fecha no hay estudios que permitan descartar el que las células precursoras de Sertoli puedan provenir del túbulo y/o del estroma mesonéfrico.

3.0) ANTECEDENTES GENERALES SOBRE EL DESARROLLO DE LAS PRINCIPALES CÉLULAS TESTICULARES

3.1.Topología, proliferación y diferenciación de las células germinales

a) Proliferación de las células germinales en ratón

Como ya se mencionó, se sabe que los gonocitos proliferan durante su migración por el intestino posterior hacia la cresta gonadal. Esto ocurre entre el día 7 y 8 dpc. También el que continúan proliferando cuando se establecen en la gónada. Para el caso del testículo esta proliferación se mantiene hasta el día 16.5 dpc, edad a la cual los gonocitos entran en un periodo de quiescencia hasta el nacimiento. Los cambios en la proliferación ocurren asociados a cambios en la distribución de los gonocitos. Su distribución en la gónada es homogénea mientras proliferan y es central cuando han dejado de proliferar al día 16.5 dpc (Vergoween et al., 1991).

Después del nacimiento, algunos gonocitos se hacen más alargados y sus membranas proyectan pseudópodos hacia la región basal del cordón seminífero. Al día 3 dpp en el ratón es posible localizarlos en la periferia del túbulo (Vergoween et al., 1991). Asociado a este cambio en su localización, reinician su actividad mitótica. Existe el reporte de que el número absoluto de gonocitos se incrementa progresivamente hasta el día 5dpp, pero no se conoce lo que sucede entre los días 6-7 pp (Baker y O'Shaughnessy, 2000; Nebel et al., 1962; Vergoween et al., 1991). A partir de esta fecha, la mayor parte de los gonocitos ya se diferenció a espermatogonias. Las espermatogonias presentan ciclos de proliferación a todo lo largo de la vida postnatal (Baker y O'Shaughnessy, 2000; Rev: Steinberger y Steinberger 1975: Vergoween et al., 1991).

b) Diferenciación de las células germinales

Durante el periodo entre el nacimiento y la prepubertad, entre el día 3 y 21 dpp en el ratón, las células germinales se diferencian mediante el proceso conocido como espermatogénesis. Al día 3 dpp es posible observar la primera espermatogonia. Entre el día 10 al 12 dpp es difícil observar gonocitos (Fig. 3), y existe un alto porcentaje de espermatocitos en preleptoteno que entran a la meiosis Fig. 4 (Nebel et al., 1962). La célula menos diferenciada, la espermatogonia, se divide para formar células premeióticas o espermatocitos primarios o preleptoténicos. Una vez que los espermatocitos pasan la barrera, se convierten en espermatocitos leptoténicos, los cuales por el proceso de reducción cromosómica forman células

obstante, a la fecha no hay estudios que permitan descartar el que las células precursoras de Sertoli puedan provenir del túbulo y/o del estroma mesonéfrico.

3.0) ANTECEDENTES GENERALES SOBRE EL DESARROLLO DE LAS PRINCIPALES CELULAS TESTICULARES

3.1.Topología, proliferación y diferenciación de las células germinales

a) Proliferación de las células germinales en ratón

Como ya se mencionó, se sabe que los gonocitos proliferan durante su migración por el intestino posterior hacia la cresta gonadal. Esto ocurre entre el día 7 y 8 dpc. También el que continúan proliferando cuando se establecen en la gónada. Para el caso del testículo esta proliferación se mantiene hasta el día 16.5 dpc, edad a la cual los gonocitos entran en un periodo de quiescencia hasta el nacimiento. Los cambios en la proliferación ocurren asociados a cambios en la distribución de los gonocitos. Su distribución en la gónada es homogénea mientras proliferan y es central cuando han dejado de proliferar al día 16.5 dpc (Vergoween et al., 1991).

Después del nacimiento, algunos gonocitos se hacen más alargados y sus membranas proyectan pseudópodos hacia la región basal del cordón seminífero. Al día 3 dpp en el ratón es posible localizarlos en la periferia del túbulo (Vergoween et al., 1991). Asociado a este cambio en su localización, reinician su actividad mitótica. Existe el reporte de que el número absoluto de gonocitos se incrementa progresivamente hasta el día 5dpp, pero no se conoce lo que sucede entre los días 6-7 pp (Baker y O'Shaughnessy, 2000; Nebel et al., 1962; Vergoween et al., 1991). A partir de esta fecha, la mayor parte de los gonocitos ya se diferenció a espermatogonias. Las espermatogonias presentan ciclos de proliferación a todo lo largo de la vida postnatal (Baker y O'Shaughnessy, 2000; Rev: Steinberger y Steinberger 1975: Vergoween et al., 1991).

b) Diferenciación de las células germinales

Durante el periodo entre el nacimiento y la prepubertad, entre el día 3 y 21 dpp en el ratón, las células germinales se diferencian mediante el proceso conocido como espermatogénesis. Al día 3 dpp es posible observar la primera espermatogonia. Entre el día 10 al 12 dpp es difícil observar gonocitos (Fig. 3), y existe un alto porcentaje de espermatocitos en preleptoteno que entran a la meiosis Fig. 4 (Nebel et al., 1962). La célula menos diferenciada, la espermatogonia, se divide para formar células premeióticas o espermatocitos primarios o preleptoténicos. Una vez que los espermatocitos pasan la barrera, se convierten en espermatocitos leptoténicos, los cuales por el proceso de reducción cromosómica forman células

haploides llamadas espermátidas redondas. Las espermátidas se transforman en espermatozoides, a través de un proceso conocido como espermiogénesis. Este es un proceso en donde la espermátida redonda pasa por una compleja metamorfosis que involucra modificaciones estructurales dramáticas del núcleo, la formación de nuevos organelos y adquisición de mecanismos que permiten la motilidad Fig 1B. (Leblond y Clermont, 1952; Oakberg, 1956).

Leblond y Clermont, (1952) y posteriormente Oakberg (1956) describieron por primera vez los cambios en las características morfológicas de los acrosomas en las espermátidas del testículo de la rata y del ratón respectivamente. Mediante un estudio detallado de los cambios estructurales que ocurren en las espermátidas en el curso de su desarrollo y formación a espermatozoides, describieron 14 estadios bien definidos en la rata y 12 en el ratón. Cada uno de estos estadios se encuentra conformados por una asociación específica de células germinales en distintos estados de diferenciación. Los diferentes estadios en la rata y el ratón se encuentran en regiones definidas a lo largo del túbulo seminífero en un orden secuencial. La aparición periódica de estos estadios permitió definir lo que se conoce como el ciclo del epitelio seminífero. La descripción de Oakberg del ciclo del epitelio seminífero en el ratón adulto (Fig. 4A) se mantiene prácticamente sin cambios hasta nuestros días (Enders y May II, 1994). Otros trabajos minuciosos realizado por Nebel et al., 1962 y Vergoween et al., 1993. permitieron describir el tiempo que le toma al testículo de ratón para formar la primera onda de la espermatogénesis. A partir de éstos, se sabe que se requiere de 35 días para la completa maduración de las células germinales, desde la aparición de las espermatogonias hasta la formación de los espermatozoides completamente maduros. En el ratón, las células inician la meiosis entre el día 8 y 12 dpp. Para el día 18 pueden ya observarse un gran porcentaje de espermatocitos en paquiteno tardío. Al día 21 es posible visualizar las espermátidas redondas de manera frecuente. Entre los días 28 al 31 dpp es posible presenciar las espermátidas elongadas. En el día 35 dpp, es factible localizar a lo largo del túbulo, todos los estadios del ciclo del epitelio seminífero. Estos aspectos están ilustrados en la Fig 4B modificada a partir del trabajo de Nebel et al., (1962).

3.2) Moléculas reguladoras de la proliferación y diferenciación de las células germinales durante el desarrollo del roedor

3.2.1) Periodo fetal, neonatal y prepuberal

a) hormonas gonadotrópicas

La mayor información sobre la regulación del desarrollo de las células germinales mediada por las gonadotropinas ha sido obtenida de estudios realizados durante la etapa prepuberal. Se cuenta con muy poca información sobre su participación en la etapa fetal, debido a la baja sensibilidad de los métodos para detectar la concentración de gonadotropinas en embriones de animales pequeños como los roedores. No

obstante, estos han mejorando y comienza a conseguirse información al respecto. Además, con el advenimiento de las técnicas moleculares y de ingeniería genética y con la generación de los animales transgénicos, un mayor conocimiento sobre estos temas comienza a obtenerse. Por ejemplo, por medio de estudios de biología molecular se sabe que el transcrito del receptor completo de la GnRh en la pituitaria fetal, comienza a expresarse al día 16 dpc en el ratón (Gore et al., 1999). La LH intrapituitaria del embrión de ratón se ha detectado al día 17 dpc y se ha determinado que sus niveles máximos se observan a termino (O'Shaughnessy et al., 1998).

Zhou y Hutson (1995) fueron los primeros en proponer que en el ratón la diferenciación inicial de los gonocitos no requiere de gonadotropinas. Esta hipótesis fue propuesta a partir de la observación de que los gonocitos no se diferenciaron a espermatogonias *in vitro* cuando los testículos de ratón recién nacido son mantenidos en cultivo en presencia de la hCG. Baker y O'Shaughnessy (2001), profundizan en la investigación de este aspecto realizando estudios en ratones transgénicos hipogonádicos (hpg), los cuales carecen del gen que codifica para la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), por lo cual no tienen concentraciones detectables de FSH ni LH en la circulación. Ellos encontraron que el número total de gonocitos y de células de Sertoli entre el día 16 dpc y el fin de la gestación, es semejante tanto en los ratones hpg como en los ratones silvestres. Sin embargo, después del nacimiento en el testículo del ratón hpg, ambas células sufren una disminución de hasta en un 50% en su número absoluto entre el día 1 y 5 dpp al comparárseles con el encontrado en el animal normal o silvestre. Adicionalmente, observaron que en el testículo del animal hpg, no se afecta la diferenciación de los gonocitos a espermatogonias, pues para el día 5 dpp ya hay células de este tipo que se han migrado a la región periférica del cordón, tal como sucede en el animal normal. Resumiendo, estos resultados indican que después del nacimiento, las gonadotropinas son críticas para la proliferación de las células germinales y las células de Sertoli pero no así para la diferenciación de las células germinales. Puesto que se tiene numerosa evidencia de que las células de Sertoli son las únicas células blanco que presentan el receptor a FSH (Manuela-Simoni et al., 1997) se sugiere de este estudio, que probablemente después del nacimiento la falta de la hormona afecta directamente a las células de Sertoli, lo que indirectamente también repercute sobre la proliferación de las células germinales.

b) Modulación parácrina de la proliferación y diferenciación de las células germinales

Existen en la literatura estudios en los cuales señalan la importancia de los factores parácrinos en el desarrollo y proliferación de las células germinales. En experimentos *in vitro*, se ha reportado cambios en la proliferación de las células germinales y de Sertoli inducidas por diferentes factores de crecimiento (tabla I) aunque en la mayoría de los casos se desconoce su mecanismo de acción. *In vivo* se desconoce que combinación particular es requerida para ejercer su influencia en la maduración de las células

germinales en cada etapa específica de desarrollo. En algunos casos estos factores actúan de manera independiente y en otros en forma sinérgica incrementando la respuesta predominante de la FSH (Meehan et al., 2000). Algunos ejemplo son:

i) La activina y la folistatina

La activina es una proteína que forma parte de la familia de los factores transformantes de crecimiento β (TGF- β por sus siglas en ingles.) La folistatina es una proteína reguladora que se une a la activina, también recibe el nombre de proteína inhibidora de la activina. Se ha observado en varios tejidos embrionarios que la folistatina neutraliza la acción de la activina, evitando que se una a su receptor. Se sabe que el patrón temporal de expresión de la activina y folistatina se regula en una forma que depende del tipo celular y de la edad, así como el que los cambios en su expresión se correlacionan con cambios en el desarrollo de las células del testículo de la rata. Meehan et al., (2000) encontraron que la activina se expresa en los gonocitos al ser observadas secciones de testículo de 18.5 dpc, tanto por inmunofluorescencia como por hibridación *in situ*. Al día 21.5 dpc la expresión del transcrito y la proteína se reduce significativamente siendo prácticamente nula al día 3dpp. También encuentran que la diferenciación de los gonocitos a espermatogonias ocurre asociada a la disminución de los niveles de expresión de la activina y al inicio de la expresión en estas células de la folistatina. Como ya se mencionó, en la rata y en el ratón, entre el día 3 y 5 del nacimiento se lleva a cabo la diferenciación de los gonocitos a espermatogonias. También durante estos días inician su proliferación y migración de la región central del túbulo a la región basal. Meehan et al., (2000) también investigaron si la activina y la folistatina son capaces de regular la proliferación, migración y diferenciación de los gonocitos. Para esto realizaron estudios inmunocitoquímicos en secciones de fragmentos de testículo de 1 y 3 dpp preincubadas con bromodeoxiuridina (BrdU) y mantenidos en cultivo por 72 horas en presencia de la hormona FSH o folistatina (Fs) o activina (Act) o una combinación de estos (Act /Fs, Act/FSH, Fs/FSH ó Act/Fs /FSH). Meehan et al., (2000) mostraron que, en fragmentos de testículo de rata neonatal mantenidos por tres días en medio de cultivo, los gonocitos incrementan su actividad proliferativa únicamente en presencia de activina. Con esta misma estrategia, los autores describen además que las primeras espermatogonias observadas solamente incrementan su actividad proliferativa en presencia de la combinación FSH/Folistatina. Adicionalmente, observan que esta combinación en particular incrementa *in vitro* la relocalización de las espermatogonias de una porción central a la región periférica del túbulo. Otro grupo de investigación reportó que la FSH sin ninguna combinación, induce la proliferación de las espermatogonias entre el día 9-18 dpp en la rata (Boitani et al., 1995). Consistentemente con estos resultados, en el ratón, se ha observado que el incremento progresivo en la síntesis de FSH se correlaciona con el incremento de las espermatogonias (Selmanoff et al., 1976; Vergoween et al., 1993) ver Fig 5B.

ii) Hormona inhibidora muleriana (MIH)

Otro factor parácrino recientemente implicado en el desarrollo de las células germinales antes de la pubertad, es la hormona inhibidora antimuleriana (MIH). Attar et al., (1997) midieron los niveles séricos de la hormona durante el desarrollo posnatal encontrando que los valores de ésta son altos al primer día de nacimiento y posteriormente decaen de manera gradual a sus niveles más bajos entre los días 9 y 15 dpp. En otros experimentos realizados en criosecciones de testículo de ratones de 9 dpp y 15 dpp, se analizó la relación entre la expresión de la marca para MIH y el inicio de la meiosis. En éstos se incubaron los túbulos con anticuerpos contra la MIH. Encontraron que la marca desaparece en los túbulos de secciones de testículo de 9 dpp que han entrado al proceso meiotico, es decir, que presentan espermátocitos en leptoteno, mientras que es intensa en aquellos túbulos que presentan espermátocitos premeióticos. A partir de estas observaciones, Attar et al., (1995) proponen que, posiblemente, la MIH frena por algún mecanismo no conocido la entrada a la meiosis.

c) Posible efecto del número de células de Sertoli en la proliferación de las células germinales

Aun no se tienen aclarados los mecanismos moleculares que regulan los fenómenos de proliferación y diferenciación en las células germinales durante la ontogenia de los mamíferos. Las evidencias iniciales obtenidas principalmente en el periodo posnatal, han permitido sugerir la existencia de una estrecha asociación estructural y funcional entre las células germinales y las células de Sertoli durante el desarrollo. Por ejemplo, Orth et al., (1988) han sugerido que el número de células de Sertoli establecido en la edad perinatal define el número de células germinales en la etapa adulta. En este trabajo, modifican por medio de una droga antimitotica exclusivamente la proliferación de las células de Sertoli desde la etapa neonatal, observándose a través de un conteo de las células de Sertoli y de las espermátidas redondas en el animal adulto, que no solamente se encuentra reducido el número de las células de Sertoli, sino también el de las células germinales. En el mismo estudio, como dato relevante, observan que tanto en la rata tratada como en la intacta, la relación numérica obtenida al dividir el número de espermátidas redondas entre el número de células de Sertoli siempre es de 6. En el mismo sentido Singh y Handelsman (1996) han observado en los ratones denominados hpg, una disminución en el número de células de Sertoli y de todos los tipos de células germinales en la edad prepuberal, advirtiéndose que la relación numérica es semejante a la observada en el animal silvestre. Estos ratones, además de tener una disminución en su talla y peso, presentan un decremento en los niveles de gonadotropinas. Cuando administran FSH desde el periodo neonatal observan en la etapa adulta que se incrementa significativamente el número de células de Sertoli y de células germinales manteniéndose la proporción entre ambas. (Singh y Handelsman, 1996). Por lo tanto, estos estudios enfatizan la estrecha relación que debe existir entre las células de Sertoli y las células

germinales, pues aquellas condiciones que reducen la población de células de Sertoli también merman el número de células germinales y sostienen la hipótesis de que el número de células de Sertoli establecido en la etapa fetal ó en la temprana etapa prepuberal, modifican en forma definitiva el número de células germinales en la edad adulta. De lo observado en los ratones hpg, se sugiere que las gonadotropinas son primordiales para el desarrollo de los dos tipos de células tubulares. Cabe señalar que desde tiempo atrás, se ha considerado que una gonadotropina en particular, la hormona folículo estimulante (FSH) es el modulador esencial en el desarrollo de las células de Sertoli y consecuentemente de las células germinales. Más recientemente se ha venido involucrando a la hormona luteinizante (LH). Así, algunos grupos de investigación sostienen al momento que la hormona folículo estimulante (FSH) tiene como único blanco a las células de Sertoli, mientras que la hormona luteinizante tiene como blanco principal en el testículo a las células de Leydig. Las hormonas FSH y LH, a su vez, inducen la liberación de factores proteicos cuyas acciones autócrino/parácrinas aun incomprendidas, potencialmente pueden tener una considerable cantidad de funciones. De lo anterior puede deducirse que existe una compleja interacción entre los distintos tipos testiculares para regular los procesos de desarrollo.

3.2.2) Inicio y mantenimiento de la espermatogénesis

De acuerdo a las revisiones de Zirkin, (1993) y Plant y Marshall (2001), el inicio de la espermatogénesis se define como la formación de la primera onda de la espermatogénesis, es decir, la primera generación de espermatozoides maduros que son detectados al día 35 pospartum en el ratón y al día 56 pospartum en la rata. Por otro lado, el mantenimiento de la espermatogénesis, se refiere exclusivamente a los requerimientos para sostener la producción de espermatozoides en el estado adulto. Los requerimientos hormonales en estas dos etapas son distintos y se resumen a continuación.

A) Inicio de la espermatogénesis

i) Regulación por la acción sinérgica de la FSH, LH y testosterona

Se tienen evidencias de que la testosterona inducida por LH es fundamental para inducir el desarrollo de la primera onda de la espermatogénesis, tanto en roedores como en humanos durante la pubertad (Rev. Plant y Marshall, 2001; Zirkin, 1993). También de que la acción sinérgica de la FSH con la LH y la testosterona, optimizan este proceso de desarrollo en los roedores. Chemes et al., (1979) observaron que las ratas tratadas con un antisuero dirigido contra la FSH desde el día de nacimiento hasta el día 32 dpp, presentaban a partir del 33 dpp, una disminución importante en el número de las espermátidas de los pasos 7 y 8 de la espermiogénesis. Adicionalmente, midieron los niveles de testosterona intratesticular en ratones tratados con anti-FSH. Estos se reducen en un 20% en comparación con el grupo control. No obstante, los efectos más dramáticos se observaron cuando aplicaron un antisuero contra la LH. El

tratamiento con la administración del antisuero contra la LH por 32 días induce severas alteraciones en el epitelio germinal, el diámetro del túbulo reveló una marcada reducción. Más aun no pudo detectarse ninguna espermátida. Los tipos más maduros de células germinales después de este tratamiento, fueron los de espermátocitos en paquíteno. Los niveles de testosterona intratesticular de los ratones tratados con anti-LH mostraron una dramática reducción hasta del 87% con respecto al grupo control.

Años más tarde Zhang et al., (2001) obtuvieron un ratón con delección total del gen que codifica para el receptor a la LH en ratón (ratones LURKO) y corroboraron que la inactivación de la acción de la LH produce un efecto extremadamente negativo en el desarrollo de la espermatogénesis. La examinación histológica en el testículo del animal adulto mostró que la célula germinal más desarrollada en estos mutantes era la de espermátida redonda. Adicionalmente midieron la testosterona sérica e intratesticular en el animal adulto reportando que ambas se encontraban muy disminuidas. No discuten porque la célula más madura de la espermatogénesis que ellos encuentran en el ratón mutante difiere de la encontrada por Chemes et al., (1979).

Con una estrategia similar se ha observado la importancia de la FSH en el desarrollo de la espermatogénesis. Sairam et al., (2001) lograron obtener ratones con una mutación para el receptor a la FSH (ratones FORKO). En estos ratones, si bien muestran todas las etapas de la espermatogénesis, las espermátidas avanzadas se encuentran reducidas en un 30-50%. Esto es, la ausencia de la acción de la FSH sobre su receptor no parece dañar cualitativamente la espermatogénesis, pero si la afecta cuantitativamente. Adicionalmente reportaron que la síntesis de testosterona en el ratón mutante adulto se encuentra disminuida en un 60-70 %. No obstante que los niveles séricos de LH son normales, es importante señalar que estos ratones son infértiles, subrayando la importancia de la acción sinérgica de la FSH con la de la LH.

B) Mantenimiento de la espermatogénesis

a) Regulación ejercida por la testosterona

Un experimento que demuestra la importancia fundamental de la concentración de testosterona en la producción óptima de espermatozoides en el estado adulto, fue realizado por Santulli et al., (1990). En estos estudios utilizaron ratas adultas hipofisectomizadas a las cuales se les administraron distintas concentraciones de testosterona por medio de implantes subdérmicos de polidimetilsiloxano (PDS) de diferentes tamaños. Estos implantes liberan de manera sostenida la testosterona a la circulación sanguínea. Así, se encontró que el incremento en la concentración de testosterona liberada es proporcional al tamaño del implante de PDS. Posteriormente disectaron los testículos y contaron el número total de espermatozoides para más tarde establecer la relación que hay entre el tamaño del implante, la concentración de testosterona y la

recuperación del número de espermias. Con esta estrategia, mostraron que el incremento exponencial en el número de espermátidas depende del aumento en longitud del implante y por lo tanto de la concentración de testosterona. Por ahora no es posible precisar si la acción de los andrógenos es directa sobre las células germinales o si es indirecta a través de su acción sobre las células de Sertoli. Aun son ambiguos los reportes que tratan de localizar el receptor a los andrógenos en las células testiculares. Hay quienes describen, por experimentos inmunocitoquímicos, que el receptor a los andrógenos no se expresa en las células germinales de ratón y rata en ningún periodo de desarrollo (Zhou-Q et al., 2002). Sin embargo, otros estudios realizados en ratón indican que éste se expresa en los gonocitos y en las espermatogonias (Zhou-X et al., 1996).

b) Posible efecto regulatorio indirecto ejercido por la hormona FSH

En el estado adulto, la participación de la FSH para el mantenimiento de la espermatogénesis ha merecido poca atención experimental para el caso de los roedores. Sin embargo, algunos reportes iniciales han sugerido que para el mantenimiento de la espermatogénesis en la rata, se requiere de la acción de la hormona FSH y sobre todo en el estadio VII de la espermatogénesis (Dym et al., 1979; Parvinen et al., 1987). Durante el estadio VII en el túbulo seminífero de los roedores ocurren importantes procesos fisiológicos celulares: a) En este estadio se lleva a cabo el inicio de la meiosis al diferenciarse los espermatocitos en preleptoteno; b) Entre el estadio VII y el VIII se lleva a cabo la translocación de los espermatocitos en preleptoteno de la región basal a la región adluminal en la barrera hematotesticular, y en ratón se ha dado evidencia de que el receptor a los andrógenos se encuentra en las células de Sertoli primordialmente e el estadio VII (Zhou et al., 2002), por ello se ha propuesto que los andrógenos pueden estar regulando la translocación de las células germinales a nivel de la barrera hematotesticular: c) En este estadio se observa la aparición de grandes cantidades de retículo endoplásmico rugoso en las células de Sertoli; d) En los túbulos de los estadios VII y VIII se presentan los máximos niveles en la secreción de proteínas (Shan et al., 1996). Las siguientes observaciones sugieren que la alteración en el desarrollo del estadio VII, posiblemente tenga repercusiones en la actividad de las células de Leydig, ya que: a) La población de las células de Leydig es mayor en áreas del testículo que circundan a los túbulos en estadio VII en el ratón (Berg et al., 1982), b) En la rata, Parvinen et al., (1987) han mostrado que la secreción de testosterona se incrementa *in vitro* cuando las células de Leydig purificadas son cocultivadas con porciones de túbulos seminíferos del mismo animal que se encuentran en el estadio VII, y c) En el mono se ha encontrado un incremento del retículo endoplásmico liso en las células de Leydig agrupadas en torno a los túbulos seminíferos del estadio VII (Fouquet et al., 1987).

3.3 ANTECEDENTES SOBRE EL DESARROLLO DE LAS CÉLULAS SOMÁTICAS DEL TESTÍCULO

3.3.1.-Antecedentes generales sobre la topología, proliferación y diferenciación de las células de Sertoli en el ratón

Los precursores de las células somáticas se diferencian hacia células de Sertoli al día 12.5 dpc cuando ocurre la diferenciación sexual en el ratón (Merchant-Larios y Moreno Mendoza, 1996). En el ratón, entre el día 12.5 y 14.5 dpc, las células de Sertoli muestran núcleos redondos variables en tamaño y forma aunque de menor tamaño al de los gonocitos. En estos días las células somáticas se encuentran mezcladas con las células germinales en los ya formados cordones seminíferos. Entre los días 16 y 20 dpc, las células de Sertoli se organizan y re-localizan en la parte basal del cordón seminífero.

En el testículo del ratón las células de Sertoli proliferan a partir del 14 dpc alcanzando su máximo pico al día 16 dpc Fig. 3 (Vergoween et al., 1991). A partir del nacimiento, el índice de proliferación comienza a decrecer y alcanza su nivel estacionario alrededor del día 14 dpp cuando dejan de proliferar. A esta última fecha ya presenta su morfología adulta totalmente diferenciada. Esto es, son un epitelio polarizado con una membrana apical y basolateral claramente diferenciada y separada por el complejo de unión, ver fig. 3 (Vergoween et al., 1991, 1993).

i) Moduladores de la proliferación y diferenciación de las células de Sertoli

Vida fetal. A la fecha se desconoce el factor inductor de la diferenciación y proliferación de las células de Sertoli en el periodo embrionario. Se ha observado que la proliferación de las células de Sertoli ocurre correlacionada con la producción de andrógenos durante la vida fetal (Orth et al., 1993). Recientemente, Jhonsthor et al., (2003) han descrito que al nacimiento, hay una reducción significativa en el número de células de Sertoli en ratones Tfm, los cuales presentan inactivado el receptor a los andrógenos. Esto indica que los andrógenos regulan su proliferación desde antes del nacimiento. Sin embargo, con respecto al receptor de los andrógenos, por ahora su detección en las células de Sertoli fetales es debatible (Orth et al., 1993, Zhou-Q et al., 2002; Zhou-X et al., 1996).

Periodo prepuberal. Existen evidencias de que la proliferación de las células de Sertoli es regulada principalmente por la hormona FSH en esta etapa ya que: a) La proliferación de las células de Sertoli de rata *in vitro*, se incrementa durante su incubación con la FSH, ya sea sola (Orth, 1990) así como en presencia de la activina (Meehan et al., 2000). La activina y la FSH dejan de tener su efecto proliferativo sobre las células de Sertoli al día 18 dpp (Orth, 1993; Meehan et al., 2000) fecha en la cual las células de Sertoli toman su patrón diferenciado definitivo en rata. b) Los ratones transgénicos que tienen inactivado

el receptor a FSH ó la subunidad β de la hormona, presentan en la etapa prepuberal y adulta una disminución de hasta el 60 % en el número de estas células de Sertoli (Jhonston et al., 2003; Rev: Sairam et al., 2001). También se han descrito otras diferentes moléculas que tienen efectos sobre la proliferación y diferenciación de las células de Sertoli (ver tabla 1).

3.3.2 Antecedentes generales sobre el desarrollo de las células intersticiales de Leydig

En el caso del testículo cabe recordar que existen dos periodos funcionales en estas células, que son el periodo fetal y el periodo posnatal. La producción de andrógenos por parte de las células de Leydig fetales es la responsable de la masculinización y de las características primarias sexuales durante la vida fetal y a los primeros días del nacimiento. La síntesis de testosterona por parte de las células de Leydig de la población adulta, es la responsable de la generación de las características sexuales secundarias durante la pubertad y del mantenimiento de los niveles adecuados de testosterona requeridos para la espermatogénesis (Rev: Ewing y Keene, 1993; Rev: Lejeune et al., 1998; Rev: Saez, 1994).

Se ha propuesto que existen dos linajes de las células de Leydig en los mamíferos: las células de Leydig fetales, que se encuentran principalmente durante el periodo fetal y decrecen en número después del nacimiento, y el linaje de las células de Leydig de la población adulta las cuales emergen incipientemente durante el periodo prepuberal y se incrementan progresivamente a principios de la pubertad. Esta hipótesis emerge de la caracterización de las diferentes respuestas funcionales de las células de Leydig fetales y adultas (Tabla II) así, como del periodo de involución de las células de Leydig fetales que ocurre durante al prepubertad (Hardy et al., 1989, Kuopio et al., 1989).

A) Desarrollo de las células de Leydig durante el periodo fetal

Por estudios de microscopía de luz, las primeras células de Leydig fetales se han descrito en el ratón alrededor del día 12.5 dpc. Al término de la gestación adquieren las características ultraestructurales de una célula totalmente diferenciada (Merchant-Larios y Moreno-Mendoza, 1996). Existen escasas investigaciones sobre la proliferación de las células de Leydig fetales. Vergoween et al., (1991) no reportaron cambios importantes en el índice de proliferación de estas células entre el día 14.5 y 18.5 dpc, en estudios donde la mitosis fue cuantificada utilizando un método autorradiográfico de incorporación de uridina radioactiva en conjunción con el método de tinción con hematoxilina. (Fig. 3). Estos investigadores indican sin embargo, que al final de la vida embrionaria en el ratón, el tamaño de los agregados aumenta y puede llegar a un número de hasta 40 células (Vergoween et al., 1991). Nuestro estudio sobre la expresión de la enzima esteroidogénica 3- β HSD, que es un marcador de células de Leydig en el ratón, es consistente con la idea de que esta población celular aumenta durante la vida fetal (Resultados, sección I). Descripciones semejantes se han documentado en el testículo de la rata. (Rev: Lejeune et al., 1998).

B) Etapas del desarrollo de las células de Leydig durante el periodo postnatal

Dentro del periodo posnatal podemos hablar de tres etapas en el testículo. Así, para el caso específico del ratón tenemos: a) la etapa neonatal y prepuberal (0- 21 dpp), b) la etapa de la pubertad, cuando inicia la síntesis de gonadotropinas (21-35 dpp) y c) y la etapa adulta (> 35 dpp) (Ogasawara et al., 1984; Ramaley 1979; Rey, 1999; Selmanoff et al., 1977).

i) Periodo neonatal y prepuberal

A partir del día de nacimiento se ha descrito un decremento en la población de las células de Leydig. En el caso del ratón, Vergoween et al., (1991) encuentran por estudios de microscopia de luz, que ésta ocurre entre los días 3 y 11 pospartum (fig.6). La disminución de esta población nosotros también la detectamos al día 3 dpp (ver resultados sección I) cuando se utiliza un anticuerpo contra la 3β -HSD combinado con estudios de inmunocitoquímica. Este cambio está correlacionado con una declinación en la secreción de testosterona por estas fechas (Fig. 7A, 7B). Existen dos hipótesis respecto a la procedencia de las células de Leydig en la etapa adulta. La primera, propone que las células de Leydig fetales disminuyen en su funcionalidad y en su volumen para luego volver a diferenciarse hacia células de Leydig de la población adulta. La segunda es que las células de Leydig fetales involucionan a una población mínima que persiste a través de todo el desarrollo posnatal y que será rebasada por la otra población de células de Leydig adultas las cuales se diferencian a partir de las células mesenquimatosas precursoras posnatales (Fig. 6). Hoy por hoy, siguen desconociéndose los mecanismos celulares que regulan la regresión de las células fetales a partir del nacimiento (Rev: Huhtaniemi, 1996; Rev: Lejeune et al., 1998, Rev: Saez, 1994).

Consistentemente con la distinta respuesta funcional descrita para la población de células de Leydig fetales y adultas, se ha reportado recientemente que existe una expresión diferencial de las isoformas de dos enzimas esteroidogénicas. En el ratón, Sha et al., (1996) han encontrado dos isoformas de la enzima 17β -HSD/KSR (ver adelante), la tipo I y la tipo III. La isoforma tipo I, que predomina en las etapas fetales y en el recién nacido, pero descienden sus niveles alcanzando su nadir durante la etapa prepuberal. A partir de la etapa prepuber, la isoforma tipo III comienza a predominar sobre la tipo I. En el caso de la enzima 3β -HSD, Baker et al., (1999) reportaron que durante los periodos fetal y la etapa prepuber se expresan las isoformas tipo I y VI, siendo la isoforma tipo I la que predomina en este periodo. Más tarde, entre el día 9 y 11 dpp la isoforma tipo VI se incrementa progresivamente predominando a partir del día 21 dpp, cuando la población de las células de Leydig inician un periodo de alta tasa de proliferación que concluye alrededor del día 35 dpp, véase la figura 3 (Verwoegen et al., 1993).

i).- Periodo púberal v adulto

En la etapa púber (21- 30 dpp) ocurren cambios funcionales muy importantes. Entre el día 25 y 28 en el ratón, también acontece el descendimiento de los testículos con el consecuente descenso en la temperatura del testículo por debajo de la del cuerpo a 34°C. En el ratón, Selmanoff et al., (1977) describieron que al día 21 dpp se incrementan los niveles de LH sérico, los cuales alcanzan sus niveles máximos al día 35 dpp (Fig 7A). Esto se correlaciona con un incremento gradual en los niveles de expresión de la enzima 17β-HSD/KSR que ocurre a partir del día 25 dpp y que llegan a su máximos entre los días 30 y 35 dpp (Sha et al., 1996; Sheffield y O'Shaughnessy, 1988). Este cambio permite el predominio de la testosterona sobre la androstendiona como el andrógeno principal (Fig 7B). También entre el día 21 y 35 dpp hay una alta tasa de proliferación de las células de Leydig (figura 5).

3.3.3 Regulacion de la proliferación y diferenciación de las células de Leydig

3.3.3.1. Periodo fetal

En las etapas más tempranas del desarrollo de las células de Leydig no se ha descrito la presencia del receptor a LH (O'Shaughnessy et al., 1998). Más aún, las siguientes evidencias indican que la LH y FSH no inducen la diferenciación de las células de Leydig fetales en los roedores: a) En el ratón la diferenciación de las células de Leydig ocurre antes de que el transcripto de la hormona GnRH en el hipotálamo (Gore et al., 1999) y del receptor a LH (R-LH) en ellas se haya expresado (O'Shaughnessy et al 1998). Estos se expresan al día 16 dpc, b) Las células de Leydig de los ratones KO para el gen GnRH (hpg) y KO para el receptor para la LH (LURKO) no muestran ninguna diferencia fenotípica a nivel de microscopia de luz al termino de la gestación con respecto a las células de Leydig de los ratones normales (Baker y O'Shaughnessy, 2000; Zhang et al, 2001). Sin embargo, en estos últimos experimentos queda por demostrarse el que estas células presentan las características fisiológicas y ultraestructurales normales de una célula de Leydig diferenciada al término de la edad fetal.

No obstante lo anterior, otros grupos de investigación han postulado que la diferenciación de las células de Leydig en el roedor se encuentra bajo el control de la LH en la parte tardía de la vida fetal con base a las siguientes evidencias: a) Se ha detectado la secreción de la testosterona de las células de Leydig del testículo fetal del ratón en respuesta a la estimulación con hCG a partir del día 16 dpc (Pointis y Mahoudeau, 1977), b) El transcripto completo del receptor a LH, considerado como funcional, se expresa en las células de Leydig a partir del día 16 dpc y se hace máximo a termino en el ratón (O'Shaughnessy et al., 1998); y, c) la LH intrapituitárica se hace máxima al día 18 dpc en el ratón (O'Shaughnessy, 1998) y

d), La máxima síntesis de testosterona testicular fetal ocurre durante los días previos del final de la vida fetal en la rata (Warren et al., 1984) o a término en el ratón (O'Shaughnessy et al., 1998).

Resumiendo, en roedores como la rata y el ratón, la síntesis de testosterona es detectada unos días antes de que aumente la síntesis de la hormona LH, por lo que es posible que la esteroidogénesis sea inducida por factores parácrinos, aun no precisados. No obstante el máximo incremento en la síntesis de testosterona que se observa hacia el final de la vida fetal puede estar determinado por la acción de la LH.

3.3.3.2 Periodo posnatal

A partir de estudios funcionales y estructurales en la rata, el grupo de Hardy et al., (1989) han propuesto la existencia de tres etapas en la diferenciación de las células de Leydig adultas: a) Las células de Leydig progenitoras (14 dpp), b) las células de Leydig inmaduras (28 dpp) y c) las células de Leydig adultas (56 dpp). Cada una tiene características morfológicas y funcionales distintas que se resumen en la tabla III.

i) La hormona luteinizante (LH) regula la diferenciación de las células de Leydig postnatales

Existe una correlación temporal estrecha entre los cambios en los niveles de LH séricos y los cambios en la secreción de testosterona durante la vida postnatal (Fig.7 A y B). Esto permitió el considerar el posible papel regulador de la LH en la proliferación y/o diferenciación de las células de Leydig (Ogasawara et al., 1984). Se ha observado que la proliferación de las células progenitoras se mantiene en ratas inmaduras de 21 dpp hipofisectomizadas y tratadas con EDS, sustancia que induce la destrucción específicamente de las células de Leydig. Así, no obstante que se observan células que proliferan en los intersticios, no es posible detectar la actividad de la enzima 3β -HSD. La inyección de LH en las ratas tratadas, induce en las células mitóticas intersticiales la expresión de la enzima (Benton et al., 1995; Ge et al., 1996). Estos resultados sugieren el que la acción principal de la LH en este periodo, es inducir la diferenciación de estas células. Otra información reporta que las células de Leydig entre los días 20 y 35 dpp se duplica en los ratones silvestres, mientras que solo se incrementa un 10 % en los testículos de los ratones hpg deficientes en el gen que codifica para la GnRH (Baker y O'Shaughnessy, 2001). Adicionalmente, en el ratón homocigoto deficiente en el receptor a LH (LURKO), se ha observado que en cortes histológicos de testículo de la etapa prepubera) y adulta, hay una clara disminución en el tamaño de las áreas de los intersticios, lo cual se correlaciona con una disminución clara en la síntesis de testosterona (Zhang et al., 2001). Estos resultados soportan datos previos que indican que durante esta etapa y sobre todo a partir del día 21 pospartum, en el ratón, es indispensable la LH para la adecuado desarrollo de las células de Leydig adultas, e indican que aunque la LH no es indispensable para la proliferación de las células precursoras si lo es para su diferenciación en este periodo.

ii) Efecto regulador de la FSH en el control del desarrollo de las células de Leydig posnatales

No obstante, además de la LH se requiere de otras hormonas y factores (ver adelante) para inducir el máximo de proliferación y diferenciación de las células de Leydig. Una de estas hormonas es la FSH. Se ha observado en ratas inmaduras hipofisectomizadas que el número de células de Leydig se recupera parcialmente al suministrarse la LH exógenamente. No obstante este número nunca alcanza su máximo a menos que se administren conjuntamente las hormonas LH y FSH (Verhoeven y Cailleau, 1985; Perrard-Sapori et al., 1987). Esto indica que en el estado posnatal inmaduro el desarrollo de las células progenitoras de Leydig requiere de la acción sinérgica de las dos hormonas gonadotrópicas. Se desconoce el mecanismo de acción mediante el cual la FSH lleva a cabo estas acciones. Dado que las células de Leydig no tiene receptores a la FSH (Rev: Manuela-Simoni et al., 1997), es posible que su acción sea mediada través de un péptido producido por las células de Sertoli al ser estimuladas por la FSH.

ii).-Efecto regulador autócrino de los andrógenos en las células de Leydig y su sinergismo con la LH

Se ha sugerido que las células progenitoras se diferencian bajo el efecto de los andrógenos. *In vitro*, se ha observado en rata, que la diferenciación citológica y la capacidad de producir testosterona de las células progenitoras cultivadas en presencia de LH, aumenta en presencia de dehidrotestosterona. Es probable que la testosterona tenga una acción autócrina directa puesto que los niveles del receptor a los andrógenos en las células de Leydig progenitoras e inmaduras son muy altos en la rata (Bremner et al., 1994; Ge et al., 1996). Otras investigaciones han mostrado que en los ratones deficientes en el gen que codifica para el receptor a los andrógenos (ratones *tfm*), las células de Leydig no se diferencian correctamente. Se ha observado que estos animales, son deficientes en la actividad de las enzimas P450c17 y 17 β -HSD/KSR (ver adelante), además de que no responden a la estimulación a la LH. Estos problemas funcionales resultan de la carencia de acción autócrina de los andrógenos sobre todo en la etapa de las células de Leydig inmaduras (Murphy et al., 1994). En las células de Leydig del ratón, el receptor a andrógenos solo se ha descrito en el periodo posnatal. Attar et al., (1997) describen que se detecta a partir del día 7 dpp y Zhou et al., (1996) hasta el día 14 dpp. También es posible el que la testosterona tenga efectos indirectos sobre las propias células de Leydig a través de un mediador parácrino, aunque por ahora no hay evidencias de que esto ocurra.

iv) Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I)

El Factor de crecimiento similar a la insulina, (IGF-I) por sus siglas en inglés, es un péptido que se ha considerado indispensable para el desarrollo de las células en diferentes tejidos de mamíferos. El IGF-I se considera que actúa localmente en los tejidos como un factor parácrino y/o autócrino (Rev: Ge et al., 1996). En las células testiculares, se ha encontrado que se expresa prácticamente en todas las células del testículo. En el intersticio se ha reportado su expresión en las células mesenquimatosas y en las células de

Leydig. Estas células lo expresan fundamentalmente en la pubertad. *In vitro* el IGF-I induce la proliferación de las células de Leydig y potencia la esteroidogénesis inducida por LH. Se ha reportado que las células de Leydig liberan el IGF-I, *in vitro*, en respuesta a la estimulación por LH y el AMPc. De lo anterior, se ha propuesto que el IGF-I es un factor regulador del desarrollo de las células de Leydig progenitoras e inmaduras (Rev Lin et al., 1996). Se sabe que la hormona de crecimiento también puede potenciar la esteroidogénesis. En los ratones dwarf, los cuales son deficientes en hormona del crecimiento, se han observado bajos niveles de testosterona. No obstante, para que la HG tenga este efecto parece requerir del IGF-I ya que si se aplica en su ausencia, *in vitro*, no se observa su efecto estimulador (Ge et al., 1996)

En el túbulo se expresa en las células peritubulares, en las células de Sertoli y en las células germinales. Se considera que las células de Sertoli y las células germinales expresan niveles bajos de la proteína. Al momento, se ha detectado el receptor al Factor IGF-1 en las células de Leydig y en las células de Sertoli mediante estudios de unión específica (Rev: Lamb, 1993; Lin et al., 1996).

v) TGF α e Interleucina

En el periodo de inmadurez, las células de Leydig también requieren de otros factores paracrinós/autócrinos para su proliferación. Se han realizado experimentos en los cuales se compara el efecto proliferativo de varios factores mitóticos en células de Leydig de ratas de 21 dpp. En estos estudios se compararon los efectos de la LH vs el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), el factor de crecimiento transformante (TGF α) y la interleucina-I. Lo que se observa en experimentos de incorporación de timidina es que si bien, la LH induce una ligera actividad mitótica en esta etapa, la inducción mitótica de los factores IGF-1, TGF α y la interleucina-I, es mucho mayor (Rev: Benton et al., 1995, Ge et al., 1996, Saez et al., 1994).

Resumiendo, los experimentos anteriores indican que durante la pubertad, la LH es esencial para el desarrollo de las células de Leydig, no obstante otros factores son requeridos para su inducir su máxima y adecuada proliferación.

4.0) LOS ELEMENTOS NEUROENDOCRINOS DE LA REPRODUCCIÓN

El sistema nervioso central gobierna el sistema reproductor a través de dos elementos neuroendocrinos el hipotálamo y la pituitaria también llamada hipófisis. La pituitaria constituye la glándula endocrina más importante de todo el cuerpo. Ello es debido a que sintetiza también hormonas que controlan el comportamiento del tiroides, corteza adrenal, ovarios y testículos. A su vez, la pituitaria es controlada por la porción encefálica denominada hipotálamo, por lo que, es el encéfalo el que está íntimamente involucrado en el control del funcionamiento del sistema endocrino Fig 8 (Rev: Steiner y Cameron, 1988).

El hipotálamo consiste de dos distintas poblaciones neuronales: las neuronas de la región magnocelular y de la región parvicelular. La región parvicelular contiene los somas de neuronas cuyos axones liberan péptidos conocidos como factores de liberación. Los factores de liberación son transportados hacia la pituitaria anterior a través de un complejo sistema de vasos sanguíneos que reciben el nombre de sistema portapituitario, estos interconectan el hipotálamo con la adenohipófisis. El factor que induce la liberación de la hormonas FSH o LH recibe el nombre de hormona liberadora de las gonadotropinas, GnRH por sus siglas en inglés (Acampora et al., 1998; Rev: Matsumara et al., 2000).

La pituitaria tiene dos lóbulos diferentes, anterior y posterior, a veces llamados adenohipófisis y neurohipófisis. Ambos lóbulos se desarrollan durante el periodo fetal a partir de células que provienen del hipotálamo. La pituitaria anterior parece no tener inervación alguna, pero en cambio está íntimamente conectada al hipotálamo por el sistema portapituitario (Acampora et al., 1998; Rev: Matsumara et al., 2000). La pituitaria madura consiste de cinco distintos tipos celulares, cada uno definido por la hormona que produce. Así en el lóbulo anterior se encuentran los tirotropos (producen la hormona estimulante de la tiroides), los somatotropos (que liberan la hormona del crecimiento), Los corticotropos (producen la hormona adrenocorticotrópica ACTH) y los gonadotropos, los cuales liberan las hormonas LH y FSH y estimulan a las gónadas (Acampora et al., 1998).

La hormona GnRH es sintetizada en el hipotálamo como parte de un precursor inactivo más grande conocido como prehormona, el cual consta de 92 aminoácidos. Una adicional digestión enzimática permite la separación de un péptido de 23 aminoácidos y otro de 56 para generar finalmente un péptido activo de 10 aminoácidos. Este último es la hormona activa que induce la liberación de LH y de FSH (Rev: Steiner y Cameron, 1990).

4.1. - Definición y descripción general de las principales gonadotropinas

La hormona LH y FSH son glicoproteínas sintetizadas por los gonadotropos de la pituitaria anterior. La gonadotropina coriónica humana (hCG) se sintetiza y libera de la placenta. Cada glicoproteína está conformada por la asociación no covalente de las cadenas proteicas alfa y beta. La subunidad alfa es

común para la LH, la hCG y la FSH, mientras que la subunidad beta es única para cada hormona. Las subunidades combinadas y su estructura terciaria específica son necesarias para la unión al receptor originándose con ello la consecuente promoción de la respuesta biológica (Steiner y Cameron, 1991). Antes de ser secretadas, las gonadotropinas necesitan estar glicosiladas, la extensión de la glicosilación es importante para el control de la función gonadal. Los azúcares unidos a las gonadotropinas incluyen el ácido siálico, la galactosa, la N-acetilglucosamina y la manosa. El grado de glicosilación, que es muy diverso entre las gonadotropinas, parece conferirles diferente potencialidad biológica. Por ejemplo, se tiene evidencia que tras la remoción de las gónadas en ratas, se incrementan las formas de FSH que tienen abundante ácido siálico unido, lo que parece conferirles una vida media alta pero una reducida potencia biológica. El tratamiento con esteroides gonadales revierte este fenómeno, permitiendo que la pituitaria secrete FSH con menos cantidad de ácido siálico (Rev: Matsumara et al., 2001 ; Rev: Steiner y Cameron, 1990). Así, la pituitaria secreta una compleja familia de gonadotropinas cuya vida media y potencialidad biológica puede variar bajo diferentes condiciones fisiológicas y esto parece estar en función de la composición de carbohidratos (Rev: Matsumara et al., 2001; Rev: Steiner y Cameron, 1990).

4.2.- Descripción general de las células hipofisarias productoras de gonadotropinas

Los gonadotropos comprenden una población heterogénea, estas difieren en tamaño y cantidad relativa de LH y FSH liberada en respuesta al GnRH. Algunas células secretan cantidades relativamente equimolares de ambas gonadotropinas, mientras que otras secretan ya sea LH o FSH. Las subpoblaciones de células gonadotrópicas tienen diferente respuesta al GnRH. Esto resulta en parte secundariamente a una diferente densidad de receptores en cada gonadotropo. En cultivo, los gonadotropos son capaces de liberar LH y FSH en la ausencia de estimulación por GnRH, sin embargo, *in vivo*, los gonadotropos dependen de la estimulación por GnRH para mantener su capacidad secretoria (Smith et al., 1984). La LH y la FSH después de ser modificadas en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, son empaquetadas en forma de gránulos secretorios. Cuando la GnRH se une a su receptor, induce cambios intracelulares de segundos mensajeros que concluyen en la fusión de los gránulos secretorios que contienen la FSH y LH con la membrana plasmática y su liberación por exocitosis (Conn et al., 1987).

4.3 Ontogenia de la expresión de LH

El curso temporal de la LH sérica en la rata (Ketezger et al., 1978) y el ratón (Selmanoff et al., 1977) presenta un comportamiento bifásico. En el caso particular del ratón, en la vida intrauterina, el nivel de LH ha podido ser detectado de manera intrapituitaria, alcanzando su valor máximo al término de la gestación (O'Shaughnessy et al., 1998). Otro trabajo monitorea sus valores cuando alcanza su nadir en el

periodo posnatal (Ogasawara et al., 1988), observándose que sus valores descienden después de la primera semana del nacimiento (Ogasawara et al., 1998). No se conocen todavía los mecanismos que regulan el decremento de la LH durante la prepubertad. Más tarde, los valores de LH intrapituitaria son nuevamente detectados entre los días 9-15 dpp (Fig 7A). Posteriormente, comienzan a incrementarse nuevamente alrededor del día 21 dpp alcanzando sus máximos entre los días 30-35 dpp (Berkowitz et al., 1979; Selmanoff et al., 1977).

4.4 Ontogenia de la expresión de FSH

Los niveles séricos de FSH han podido ser detectados al final del periodo fetal en la rata (Ackland y Schwartz, 1991), en esta, son relativamente altos al final del periodo embrionario (Ketelslegers et al., 1977), se mantienen a niveles bajos y estacionarios hasta la entrada a la pubertad. No se conocen los niveles en la etapa fetal en otros roedores como es el caso del conejo (Veyssiere et al., 1982) y el ratón (Selmanoff et al., 1977). Sin embargo es posible que en todos los casos su liberación sea de tipo bifásica, incrementándose importantemente al final de la vida intrauterina y al principio de la pubertad. En el caso del ratón, la FSH se detecta al día 10-15 dpp, incrementándose alrededor del día 21 dpp, alcanzando sus máximos niveles entre los días 30-35, para posteriormente decrecer y mantenerse a niveles estacionarios alrededor del día 60 dpp (véase fig.5 y 7). De acuerdo a estos datos, es posible observar que su liberación ocurre coordinada con la de LH desde el periodo prepúber y adulto (Selmanoff et al., 1977).

4.5 Retroalimentación negativa en el control de la secreción de gonadotropina

El trabajo de Moore y Price en la época de los 30's estableció la existencia de una retroalimentación negativa entre el testículo y la pituitaria en el macho. Diferentes evidencias indican que la testosterona y el estradiol son las principales señales que llevan a cabo esta regulación. Actualmente, se sabe que la testosterona y sus metabolitos ejercen su efecto a nivel del hipotálamo predominantemente al enlentecer la frecuencia de la descarga pulsátil de las células productoras de GnRH, lo que a su vez enlentece la secreción pulsátil de las células hipofisarias que secretan la LH. La inhibina, que es secretada por las células de Sertoli, también regula en forma negativa la descarga del GnRH. Su mecanismo de acción se desconoce (Rev: Steiner y Cameron, 1990). Otro enlentecedor de la frecuencia de los pulsos de secreción de GnRH es el opioide endógeno β -endorfina. Las beta endorfinas son liberadas de la pituitaria anterior junto con la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) durante situaciones de stress, y se tiene conocimiento de que ambas regulan negativamente la secreción de gonadotropinas (Del Socorro-Retana et al., 2001). El efecto negativo de las β -endorfinas, es revertido cuando se aplica con antagonistas de los receptores a opioides como es la naloxona (Rev: Steiner y Cameron, 1990).

5.0.- VIAS METABOLICAS DE LOS ANDROGENOS EN LAS CELULAS DE LEYDIG

En todas las especies la primera tasa límite en el metabolismo de los andrógenos es la conversión de colesterol a pregnenolona, y es catalizada por la enzima citocromo P450 liberadora de la cadena lateral del colesterol (P450sccc) la cual se encuentra en las mitocondrias. Subsecuentemente, y dependiendo de la especie, la pregnenolona puede ser metabolizada a progesterona por las enzimas 3β hidroxisteroide deshidrogenasa / Δ^4 - Δ^5 isomerasa (3β -HSD). La progesterona a su vez es convertida a 17α -hidroxiprogesterona y androstenediona en dos etapas, por medio de la citocromo P450 17α -hidroxilasa (P450c17), y finalmente, la enzima 17 cetoesteroide reductasa (17β -HSD/KSR), lleva a cabo la conversión de la androstenediona a testosterona (ver fig. 9). Estas últimas enzimas se expresan en el retículo endoplásmico liso. Dependiendo de la especie, la pregnenolona puede tomar dos vías posibles para la síntesis de andrógenos, estas pueden ser la vía de los Δ^4 hidroxisteroideos o la de los- Δ^5 cetosteroideos. Las distintas especies de mamíferos utilizan una o ambas vías. Por ejemplo, la vía Δ^4 que tiene la siguiente secuencia: pregnenolona \Rightarrow progesterona \Rightarrow androstendiona \Rightarrow testosterona, fue la primera en ser identificada en ratas. Estudios subsecuentes han mostrado que la conversión de intermediarios Δ^5 es de pequeña significancia en esta especie. En contraste, el perro utiliza principalmente la vía Δ^5 siendo la dehidroepiandrosterona el principal androgeno secretado. La vía Δ^5 tiene la siguiente secuencias: pregnenolona \Rightarrow 17α -hidroxipregnelonona \Rightarrow dehidroepiandrosterona \Rightarrow androstendiona \Rightarrow testosterona. De manera similar la vía Δ^5 ha mostrado ser predominante en conejos, cerdos, humanos y primates superiores : En el ratón la vía Δ^4 domina antes de la pubertad pero en el animal adulto la vía Δ^5 contribuye también a la producción de testosterona (véase fig 9) (Rev: Payne y O'Shaughnessy, 1996; Rev: Saez, 1994; Sheffield y O'Shaughnessy, 1988).

5.1.- Citocromo P450 sccc (liberadora de la cadena lateral de colesterol)

La citocromo P450 sccc regula la conversión de colesterol a pregnenolona y es esencial para la biosíntesis de todos los esteroides gonadales. Durante los periodos de estimulación aguda de las hormonas tróficas, el transporte de colesterol citosólico hacia la membrana interna de la mitocondria es el paso limite en la producción de pregnenolona y consecuentemente en la producción de hormonas esteroideas, no se conoce el mecanismo que transporta al colesterol hacia la mitocondria (Payne y O'Shaughnessy, 1996 ; Saez, 1994).

5.2 -3 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa/ Δ^4 - Δ^5 Isomerasa (3 β -HSD)

La enzima 3 β -HSD cataliza la conversión de Δ^4 - Δ^5 -3 β -hidroxiesteroides a Δ^4 -cetoesteroides. Este paso es esencial para la biosíntesis de todos los esteroides. La reacción requiere NADH como cofactor e involucra la deshidrogenación de los grupos 3 β -hidroxilo seguido de la isomerización que implica el cambio del doble enlace de los carbonos 5 y 6 a los carbonos 4 y 5 (Fig 9). La 3 β -HSD se expresa en todos los tejidos esteroideogénicos tales como las adrenales, placenta gonadas y próstata. También se ha reportado mediante técnicas histoquímicas en otros tejidos tales como las glándulas sebáceas e hígado fetal. Se han aislado varias formas de ADNc de la 3 β -HSD. Los diferentes ADNc's han sido identificados por números romanos en el orden en el cual han sido encontrados en diferentes tejidos y especies. Estas han sido numeradas de la I a la VI. En el testículo de ratón han sido encontradas las isoformas tipo I y la isoforma tipo IV, su patrón de expresión cambia durante el desarrollo. Como ya se mencionó, la isoforma tipo I se expresa durante el periodo fetal, neonatal y prepuberal, mientras que la isoforma tipo VI se expresa de manera predominante a partir de los días 9-11 (Payne y O'Shaughnessy, 1996).

5.3 . - Citocromo P450 17

La enzima P450c17, lleva a cabo la 17 α hidroxilación y la liberación de la cadena de carbonos C17-C20. Permite la conversión de los esteroides C21 pregnolenona y progesterona a dehidroepiandrosterona y androstenediona respectivamente (Fig. 9). En esta reacción de dos pasos, se forman como intermediarios la 17 α - pregnolenona y la 17 α -hydroxiprogesterona. Las actividades de 17 α - hidroxilasa y de C17-C21 liasa son llevadas a cabo por la misma enzima. La P450 c17 se expresa en todos los tejidos esteroideogénicos, aunque su actividad esteroideogénica no se ha puesto en evidencia en las glándulas adrenales de la rata y del ratón. En el testículo su actividad se encuentra confinada exclusivamente a las células de Leydig. Dentro de éstas se localiza en el retículo endoplásmico liso (Payne y Oshaughnessy, 1996 ; Saez, 1994).

5.4 - 17 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa /cetoesteroide reductasa (17 β -HSD/17KSR)

El paso final en la biosíntesis de testosterona es la reducción de androstenediona a testosterona a través de la actividad de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ 17-cetoesteroide reductasa (17 β -HSD). El paso es reversible dependiendo de la concentración del producto y el sustrato, esto regula la dirección de la reacción. Algunos ejemplos de su ubicación intracelular son: la placenta, las células de la granulosa, las células adrenocorticales y naturalmente los testículos (Rev:Ewing y Kane, 1993). A la fecha se han descrito ocho isoformas (O'Shaughnessy et al., 2000). En el testículo se conocen dos isoformas, la tipo I y III (Rev: Payne y O'Shaughnessy, 1996; Saez, 1994). En las células de Leydig se han detectado la expresión de las dos isoformas dependiendo de la etapa del desarrollo (Sha et al., 1996). A diferencia de

las otras enzimas esteroideas, la 17β -HSD se expresa en las células de Leydig (Payne y O'Shaughnessy, 1996; Saez, 1994) y en las células de Sertoli (O'Shaughnessy et al., 2000). En las células de Leydig, la enzima se localiza en la membrana del retículo endoplásmico, sin embargo, en las células de Sertoli se desconoce su ubicación intramembranal, tampoco se conoce la isoforma que expresa, solo se sabe muy recientemente que estas presentan actividad de 17-cetoesteroide reductasa (O'Shaughnessy et al., 2000).

5.5 - 5α -reductasa

La enzima 5α -reductasa convierte esteroides con una estructura oxo- $\Delta^{4,5}$ a su correspondiente 5α -reducido. En el caso de la testosterona esto permite su conversión a dihidrotestosterona (Figura 9). Esta conversión ocurre en el tejido blanco, aunque también ocurre en el testículo. El análisis de su secuencia de aminoácidos obtenida a partir de su DNAC, permite inferir que se trata de una proteína intrínseca de membrana. Sólo se ha reportado la actividad de la enzima en las células esteroideas como las células de la corteza adrenal, las células de Leydig y las células de la granulosa. Para el caso de las células adrenales y las células de Leydig, su localización se ha ubicado dentro de la membrana nuclear y en el retículo endoplásmico (Rev: Payne y O'Shaughnessy, 1996).

5.6 Localización de las enzimas esteroideas

Existe escasa información respecto a la compartimentalización de las enzimas y de los esteroides en las células de Leydig. No obstante, ésta ha sido estudiada en otras células esteroideas tales como las células de la corteza adrenal. En estas últimas, se sabe que en el retículo endoplásmico liso las enzimas se encuentran compartimentalizadas en un microambiente que les permite estar en tandem como un sistema multienzimático. Es decir, una reacción se sucede una tras otra en un orden tal que les permite llevar a cabo las reacciones esteroideas a gran velocidad sin pérdidas por difusión de sustratos y productos (Rev: Ewing y Keene, 1993). Por ejemplo, Chubb y Ewing (1991) han propuesto que el sitio activo de la P450_{sc} se encuentra en la membrana interna de la mitocondria, y los sitios activos de la P450_{c17}, 3β -HSD y 17 KSR se encuentran del lado citoplasmático de la membrana del retículo endoplásmico. Los esteroides con grupos C-3 hidroxilo se encuentran intercalados en las cabezas polares de los fosfolípidos membranales y el resto de la molécula penetra en las cadenas no polares. La hidrofobicidad esteroidea decrece con la adición de grupos hidroxilo en el carbono C-17 ó en el C-3, así como por la reducción del núcleo esteroideo en el C-19. Estas evidencias permiten inferir que los esteroides se hacen más hidrofílicos durante la conversión de pregnenolona a testosterona (Rev: Ewing y Keene, 1993). El arreglo en tandem de las enzimas esteroideas en el retículo endoplásmico se encuentran en un arreglo secuencial que asegura la rápida conversión de pregnenolona a testosterona (Rev: Ewing y Keene, 1993).

Dado que su concentración es más alta en el citoplasma que en el intersticio, existe un gradiente de concentración que favorece su salida hacia el espacio intersticial en donde es ligado rápidamente a la albúmina.

5.7.- Regulación de las enzimas esteroidogénicas, del receptor a LH y FSH en las células de Leydig y de Sertoli inducido por las gonadotropinas

a) Regulación del receptor a LH

La acción de la LH sobre las células de Leydig inicia cuando se une a un receptor específico que se encuentra en la superficie de la membrana plasmática. El análisis de la secuencia del ADNc del receptor revela que contiene siete dominios transmembranales. El receptor contiene una región rica en serinas y treoninas en la región carboxilo terminal, lo cual indica que pueden ser sitios favorables para la fosforilación. Su estructura es similar a la de los receptores acoplados a las proteínas G (Rev: Steiner y Cameron, 1990).

El RNAm del receptor a LH/hCG no solo se expresa en el testículo sino también en el útero no preñado, la placenta humana, los conductos de falopio y en la próstata de la rata. Existen diferentes formas del transcripto que se producen por cortes y empalmes del RNAm recién transcrito (“splicing” alternativo) hasta obtener el tamaño que le es funcional. En el caso del ratón, el transcripto corto del receptor a LH se detecta al día 13 dpc, siendo este de 650 pb, mientras que el transcripto completo se forma a partir del día 16 dpc y contiene 1034 pb (O’Shaughnessy et al., 1998).

El receptor para LH es regulado por la propia LH. Una dosis moderada suministrada en varias etapas, incrementa y mantiene los niveles numéricos adecuados. Si se mantienen las células de Leydig en cultivo sin suministro de LH, disminuye la población de receptores para la LH. El suministro de una dosis alta causa un decremento en el número de receptores y su degradación, es decir, se induce una desregulación (Rev: Saez, 1994 ; Steiner y Cameron, 1990) La desregulación de los receptores por una alta dosis de LH o hCG ha sido demostrado in vivo y in vitro (Rev: Saez, 1994).

Existe la idea de que la liberación pulsátil de la LH es un medio que en condiciones fisiológicas evita la desregulación del receptor (Rev. Steiner y Cameron, 1990). Por ahora, los experimentos realizados in vitro, tanto con animales silvestres como con deficientes en el gen de la GnRH (hpg), no parecen soportar esta hipótesis ya que la administración continua o pulsátil de la hormona LH no se ha reportado que tenga efecto sobre la actividad total esteroidogénica (Sheffield y O’Shaughnessy 1989; Verhoeven et al., 1986).

b) Regulación del receptor a FSH

La hormona FSH es la hormona central en la reproducción de los mamíferos, es necesaria para el desarrollo y maduración de la producción de gametos en las gónadas, y quizás durante la vida fértil. El FSH actúa uniéndose a receptores específicos localizados exclusivamente en las gónadas. El receptor de FSH pertenece a la familia de proteínas G. En este caso, la hormona se une al dominio extracelular del receptor lo que inicia la cascada de eventos que finalmente permiten su acción efectora. Con anticuerpos específicos para FSH, se ha indicado que la marca se localiza en la parte basal de las células de Sertoli (Rev: Manuela-Simoni et al., 1997). A pesar de la información reciente que indica que el receptor a la FSH también se expresa en las células germinales (Baccetti et al., 1998), algunos autores consideran que el receptor a FSH es estrictamente gonadal y que se expresa específicamente en las células de Sertoli, estudios adicionales se requieren para demostrar de manera categórica su expresión en las células germinales. Se tiene evidencia, en el caso de la rata, de que el receptor se regula de acuerdo a los cambios observados para su agonista, y al igual que éste, fluctúa observando un comportamiento bifásico (Ketelselgers et al., 1977; Warren et al., 1984).

b) Regulación de las enzimas esteroideogénicas inducido por LH

La unión de la LH sobre el receptor, estimula la producción de testosterona por las células de Leydig. La unión de la LH a su receptor en la membrana, forma un complejo que activa a la adenilato ciclasa para producir un incremento en los niveles del AMPc. La elevación del AMPc, disocia la fracción catalítica de la proteína cinasa A, la cual fosforila múltiples proteínas (Rev: Payne y O'Shaughnessy, 1996; Rev: Stocco, 1996). Se desconocen los mecanismos precisos que vinculan la fosforilación de proteínas y el incremento en la esteroideogénesis (Chaurdany y Stocco, 1991 ; Stocco, 1996). Se considera que el AMPc es el principal segundo mensajero inducido por la LH que desencadena la síntesis de esteroides debido a que, el solo efecto del AMPc mimetiza la acción de la LH, es decir la producción de andrógenos (Rev: Payne y O'Shaughnessy; Rev: 1996; Rev: Saez, 1994; Rev: Steiner y Cameron, 1990).

En la rata y en el ratón, las células de Leydig requieren del LH/hCG, por lo menos desde la etapa prepuberal y adulta para mantener totalmente diferenciada su estructura y función (Rev: Payne y O'Shaughnessy, 1996 ; Saez, 1994; Stocco, 1996). La exposición de las células de Leydig al LH o al hCG causa dos tipos de respuesta: a) La primera o respuesta aguda que es observada entre los primeros 60 o 90 minutos de iniciado el estímulo. En ésta, el incremento en los niveles del AMPc involucra el desplazamiento (translocation) del colesterol desde el citosol a las mitocondrias. La respuesta aguda depende del estado de diferenciación de la célula, del número de receptores, la cantidad de colesterol disponible y la actividad de las enzimas esteroideogénicas. b) La respuesta a largo término, en la cual el incremento del AMPc aumenta

el RNAm y la síntesis de proteínas. Se tiene una evidencia de que este efecto ocurre después de hora y media de iniciado el estímulo (Rev: Stocco, 1991).

La estimulación tanto *in vivo* como *in vitro*, con LH o la hCG son fundamentales para mantener los niveles adecuados de la esteroidogénesis Fig 5 (Payne y O'Shaughnessy, 1996; Saez, 1994). La supresión de gonadotropinas, ya sea inducida por la administración de esteroides, por su neutralización con anticuerpos, o quirúrgica por hipofisectomía en la etapa adulta, *in vivo*, causa a largo plazo: a) atrofia de la función de las células de Leydig, b) pérdida del volumen del retículo endoplásmico liso y c) la pérdida de receptores a LH. Sin embargo, el número de células de Leydig por testículo no se ve aparentemente modificado por este efecto (Rev: Payne y O'Shaughnessy, 1996 ; Rev: Saez, 1994). También por estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, se sabe que la supresión de la LH afecta la expresión de las enzimas esteroidogénicas. *In vivo*, usando implantes de testosterona-estradiol en rata para reducir los niveles de LH, se observa que si bien, se detiene la capacidad de las células de Leydig para producir testosterona, no se mengua la capacidad de estas para convertir pregnolenona a progesterona, b) Aunque la LH puede modular discretamente la expresión de la 3β -HSD a largo plazo (Muroño y Payne, 1979), se sabe que la síntesis de progesterona se mantiene en ratones con delección del gen que codifica para la hormona liberadora de las gonadotropinas (ratones hpg) (Sheffield y O'Shaughnessy, 1988). Este hallazgo indica que la LH no es crítica para la actividad de las enzimas P450_{scc} y 3β -HSD. En contraste, sin estimulación gonadotrópica por LH, los niveles de la enzima P450_{c17} caen a valores prácticamente nulos. El tratamiento con LH restaura la respuesta esteroidogénica e incrementa los niveles de la enzima P450_{c17} y la producción de testosterona (Rev: Payne y O'Shaughnessy, 1996). *In vitro*, se ha observado que en ausencia del estímulo producido por la LH o AMPc, las células de Leydig en cultivo continúan sintetizando la P450_{scc} por lo menos hasta el día 11 del tiempo de cultivo. En contraste, la ausencia de LH o AMPc después de 48 horas en el medio de cultivo en ausencia de estimulación, interrumpe por completo la síntesis de la enzima P450_{c17}, mientras que su reposición restaura la síntesis *de novo* de la enzima. Otros experimentos demuestran que con el estímulo de LH o hCG se incrementan a largo plazo los niveles del RNAm de la P450_{c17}. Las regiones reguladoras de esta enzima que responden al estímulo inducido por el AMPc en esta enzima se desconocen (Rev: Payne y Youngblood, 1995.) Estos datos permiten inferir que *in vivo*, la LH no es crítica para la actividad de las enzimas P450_{scc} y la 3β -HSD, pero si es esencial para la P450_{c17} (Rev: Payne y O'Shaughnessy, 1996 ; Saez, 1994).

c) Posible regulación de algunas enzimas esteroidogénicas inducido por la acción de la FSH

Existen escasos estudios sobre los efectos de la hormona FSH en las enzimas esteroidogénicas. Uno de estos fue el realizado por Muroño y Payne (1979). En éste se llevó a cabo la hipofisectomía en ratas adultas, resultando con ello un decremento del 72% en la actividad de la enzima 3β -HSD después de 14

días de realizada la hipofisectomía. El tratamiento con LH, iniciado seis horas después de la remoción de la pituitaria, permite mantener la actividad de la enzima a valores idénticos a los encontrados en la rata normal. Por otro lado, con la misma estrategia, pero usando únicamente la FSH, se observa que no se tiene efectos significativos para revertir la actividad de la 3β -HSD a sus valores control. Sin embargo, cuando las ratas fueron tratadas con LH más FSH, se observó un efecto sinérgico de esta combinación sobre la actividad de la 3β -HSD. Es decir la combinación de la FSH y la LH incrementan la actividad de la enzima respecto a lo observado en los niveles control. Dado que las células de Leydig no expresan receptores a la FSH, estos datos sugieren que la FSH estimula la síntesis o la secreción de un factor de las células de Sertoli, el cual modula el efecto de la LH sobre la actividad de la enzima 3β -HSD (Murono y Payne, 1979). Otro estudio ha documentado que la capacidad esteroidogénica de las células de Leydig se incrementa en cocultivos con células de Sertoli y esto viene asociado a un incremento en los niveles del RNAm de las enzimas P-450_{scc}, P450_{c17} y 3β -HSD (Lejeune et al., 1998). Finalmente, en otro experimento, en ratas prepuberales hipofisectomizadas, se observó que la actividad de la enzima 17β -HSD decae en un 60 % después de seis días de iniciada la hipofisectomía. El tratamiento con LH durante cinco días, evita el decremento y si se continúa el tratamiento por 10 días, solo se observa un ligero incremento en la actividad de la enzima. Con esta misma estrategia, pero usando únicamente FSH, se observó que la hormona induce un incremento en la actividad de la enzima del 111 % con respecto al valor encontrado en el animal hipofisectomizado no tratado y en ausencia de LH. Estos estudios fueron ejecutados haciendo uso de homogenados del testículo, por lo tanto no es posible discernir, por un lado, si la FSH indujo la expresión de un factor de las células de Sertoli que actuó a su vez sobre las Leydig, o si más bien el efecto es debido a la acción de la FSH sobre la enzima que se localiza en las células de Sertoli (Murono y Payne, 1979).

6.0.- UNIONES COMUNICANTES O SINAPSIS ELECTRICAS

Definición

Las uniones comunicantes son especializaciones de la membrana plasmática formada entre dos células adyacentes que contienen conglomerados de canales intercelulares que permiten el paso directo de iones y moléculas de hasta 1kDa de tamaño entre dos células adyacentes. Estas uniones permiten el paso de mensajeros como el AMPc, el IP3 y Ca^{2+} . En estas áreas de membrana formadas por las uniones comunicantes, el espacio intercelular se angosta a 2 nm en cortes perpendiculares, esto es un orden de magnitud con respecto al espacio intercelular normal que es de cerca de 25 nm. Los canales intercelulares están formados por una familia de proteínas homólogas llamadas conexinas, Fig 10A. La Fig. 10B muestra que seis conexinas se ensamblan para formar un hemicanal llamado conexón el cual interacciona en el espacio extracitoplasmático con otro conexón provisto por una célula vecina para formar un canal intercelular o de unión comunicante (Rev: Bennet, 1991; Rev : Kumar y Gilula, 1996).

6.1. - Antecedentes generales sobre la estructura de las uniones comunicantes

Las primeras imágenes de las uniones comunicantes fueron descritas por Robertson en 1962 y 1963, en las dendritas de las neuronas del bulbo raquídeo del pez dorado, quien analizando cortes finos teñidos positivamente para microscopía electrónica, observó en cortes perpendiculares arreglos pentalaminares en las zonas de aposición membranal. Estos se encuentran formados por un arreglo de tres bandas electrodensas (obscuras) separadas por dos bandas de menor electrodensidad (claras), ver Fig. 11B. Adicionalmente, en cortes paralelos, reportó que las zonas que presentan uniones comunicantes están formadas por múltiples estructuras hexagonales que parecen mostrar un poro central. El poro central entre las partículas distaba de centro a centro 8-9 nm. Robertson sugirió que estos poros podían formar puentes proteicos o canales intercelulares entre las células. No obstante, la proposición formal de este aspecto fue hecha por Revel y Karnovski en 1967. Para esto, utilizaron el hidróxido de lantano, el cual por ser hidrosoluble es un marcador de los espacios extracelulares. Con esta técnica distinguieron en cortes perpendiculares de hígado, que en las zonas de las uniones comunicantes entre las dos membranas de las células adyacentes, el lantano permeaba en un pequeño espacio de 2-3 nm (Fig 11 C) lo cual lo diferenció de las uniones estrechas en las cuales no pasaba el lantano. Los estudios de lantano también permitieron observar placas con arreglos hexagonales con un centro en el cual penetraba el lantano indicando que estos centros eran poros. El análisis de las micrografías electrónicas de las secciones transversales y perpendiculares les permitió hacer modelos iniciales en los cuales mostraron a las placas de unión comunicante como zonas de múltiples canales que se extienden entre dos zonas de aposición membranal (Revel y Karnovski, 1962). Adicionalmente, los estudios en réplicas de criofractura realizados en el

hígado, mostraron que existían cientos de partículas en la cara protoplasmática (P) que eran complementarias a las depresiones observadas en la cara extracelular (E). Estas partículas y depresiones equidistaban entre sí de centro a centro 8-9 nm. Tales resultados apoyaron la hipótesis de que estas estructuras se trataban de puentes formados por proteínas transmembranales. El conjunto de estudios dieron evidencias de que las estructuras vistas en secciones finas, así como en criofractura, eran las unidades anatómicas de las uniones comunicantes conocidas en ese entonces como sinapsis eléctricas (Chalcroft y Bullivant, 1970; Mac Nutt y Weinstein, 1967; Revel y Karnovski, 1967). Datos obtenidos con estudios de difracción de rayos X permitieron definir mejor la estructura de las conexinas (Unwin y Zampighy, 1980). Por medio de estos estudios fue posible estimar con alta precisión las dimensiones del canal intercelular y hacer modelos más precisos de las placas de uniones comunicantes. así como proponer por primera vez que éstas estaban formadas por dos hexameros de subunidades proteicas o conexones provistos por los hemicanales de dos células adyacentes. Dado que se sabía que el peso molecular de una proteína de unión comunicante en hígado era de 27 kDa, y que se sabía por los estudios de difracción de rayos X las dimensiones del cilindro que forma el canal intercelular, fue posible estimar que se requería de 12 conexinas para formar un canal intercelular. Se sabe que el número de los canales por placa puede variar desde una decenas hasta varios cientos de miles dependiendo del tejido.

6.2.- Antecedentes moleculares generales de las uniones comunicantes

En un inicio el análisis bioquímico realizado en fracciones celulares de hígado ricas en uniones comunicantes. permitió determinar por la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida. que las estructuras tenían un peso molecular entre 27 kDa. Más tarde se generaron anticuerpos contra aminoácidos específicos de la proteína de 27 kDa. Utilizando estos anticuerpos y oligonucleótidos sintéticos que correspondían a la región amino-terminal de la proteína secuenciada parcialmente, se rastrearón bibliotecas del ADNc del hígado de rata y pudo aislarse el ADNc que codifica para esta proteína. Una vez clonada la primera conexina. a ésta se le denominó conexina 32 (Cx32) ya que su ADNc codificaba para una proteína de 32 kDa. Utilizando la sonda del ADNc obtenida de la Cx32 fue posible clonar nuevas conexinas. Con esta técnica se realizaron hibridizaciones en condiciones de baja astringencia, con lo cual se clonaron las proteínas de unión de 43 kDa y 26 kDa. El análisis de la secuencia de estas dos proteínas de unión permitió inferir que había una alta homología y que por lo tanto se trataba de una familia de proteínas homólogas. La nomenclatura original utilizó el peso molecular que se determina por el peso molecular obtenido a partir de geles de poliacrilamida y la nomenclatura actual utiliza el prefijo Cx por la abreviación de conexina y el peso molecular deducido de la secuencia predicha a partir de su ADNc (Rev: Bruzzone et al., 1996). Actualmente se han clonado 20 tipos de conexinas en el ratón (Rev. Herve et al., 2004).

El análisis de los gráficos de hidrofobicidad de las diferentes conexinas, permitieron proponer un modelo de cómo es su arreglo en la membrana (Fig 12.) Estos indican que corresponde a un segmento con cuatro dominios transmembranales (M1-M4) con dos asas extracelulares (E1-E2) y un asa citoplasmática (CL) y una región carboxilo terminal. Los mayores sitios de divergencia entre las conexinas se presentan en las regiones carboxilo terminal y el asa citoplasmática. Las regiones más conservadas entre las conexinas son los dominios transmembranales. Experimentos de mutagénesis dirigida, han mostrado que el asa citoplasmática y la región carboxilo terminal juegan un papel crítico en la regulación de la apertura y cierre de los canales de unión comunicante inducida por cambios en la concentración de hidrogeniones intercelulares. Las fosforilaciones que se llevan a cabo en los residuos de serina y treonina de la región carboxilo terminal, están implicados en la regulación de la conductancia del canal. Las asas extracelulares participan en el reconocimiento y compatibilidad con otra conexina (Rev: Bruzzone et al., 1995; Rev: White y Bruzzone, 1996).

6.3- Antecedentes generales sobre biofísica de los canales de unión comunicantes

Se sabe que una sola placa de unión comunicante puede expresar más de un solo tipo de conexina. Esto se ha demostrado mediante el uso de doble marcaje de secciones de tejidos con anticuerpos contra dos conexinas y análisis confocal, algunos ejemplos son: los hepatocitos, las fibras del cristalino y los keratinocitos (Jiang et al., 1995; Nicholson et al., 1987; Traub et al., 1989). Ahora, dado que más de una conexina puede estar presente en una placa de unión comunicante y dado que el canal de unión comunicante está formado por un dodecámero de conexinas, teóricamente es posible el que existan muchos subtipos de canales de unión comunicante. Esto es, un conexon puede ser homomérico si contiene únicamente una especie de conexina o puede ser heteromérico si contiene diferentes conexinas. Ahora bien, la asociación de dos conexones homoméricos que tienen un mismo tipo de conexina produce un canal homotípico. La alineación de dos conexones homoméricos, cada uno compuesto por diferente conexina, genera un canal heterotípico. Finalmente una amplia variedad de canales heteroméricos pueden producirse de la interacción de un conexón heteromérico con otro conexon heteromérico (Rev: White y Bruzzone, 1996).

Los canales de unión comunicante tienen características funcionales específicas en una célula dependiendo de la composición molecular. Esto se ha estudiado midiendo la corriente de unión entre pares aislados de células acopladas sometidas a doble fijación de voltaje. En esta técnica, como su nombre lo dice, se hace la fijación de voltaje en cada una de las dos células aisladas adyacentes. Se colocan dos micropipetas de vidrio sobre las membranas de cada una de las células de un par. Cada pipeta contiene solución salina y esta conectada a través de un electrodo de plata clorurada a un amplificador de fijación de voltaje. Mediante la aplicación de presión negativa se forma un gigasello entre la pipeta y la membrana

plasmática, la cual se rompe mediante la aplicación de una segunda presión negativa con lo cual se accede al citoplasma de la célula. Posteriormente, utilizando el modo de registro de configuración de célula completa, ambas células son fijadas al mismo voltaje lo cual da como resultado una corriente de unión $I_j = 0$. A una de las células se le mantendrá fijo el voltaje, mientras que a la otra, se le aplican pulsos de voltaje de diferente amplitud, esto generará una corriente que, en el caso de la célula en donde se ha mantenido el voltaje constante, será igual a la corriente de transunión, es decir, la corriente que pasa a través de él o los canales de unión comunicante. Con esta metodología es posible registrar los cambios en la magnitud y curso temporal de las corrientes macroscópicas o unitarias de los canales de unión comunicante al variar la diferencia de voltaje que se aplica entre las dos células. Los valores de conductancia instantánea o estacionaria obtenida durante el paso de pulsos de amplitud creciente y polaridad positiva y negativa, son graficadas con respecto a los cambios en los potenciales aplicados a las células para así generara curvas conductancia-voltaje. Las curvas de conductancia-voltaje varían dependiendo de la conexina que esté formando el canal. Esto demuestra que los canales homotípicos formados por conexinas distintas son funcionalmente diferentes (ver abajo). También a partir del análisis de las curvas conductancia-voltaje puede definirse si un canal es heterotípico u homotípico (Rev: Bruzzone et al., 1995).

Con este tipo de metodología de estudio, el tipo de canales de unión comunicante que han sido más estudiados són los canales homotípicos. Estos han sido estudiados en sistemas convencionales de expresión *in vitro* tales como: a) pares de oocitos de *Xenopus* previamente inyectados con el mensajero que codifica para una conexina específica y que son puestos en aposición membranal y sometidos a doble fijación de voltaje, y b) pares aislados de líneas celulares tumorales deficientemente acopladas y que previamente son transfectadas con el ADN complementario de conexinas específicas, también han sido sometidas a doble fijación de voltaje. Estos sistemas han permitido elucidar las propiedades biofísicas fundamentales de los canales intercelulares formados con conexinas específicas (Rev: Goodenough et al., 1996; Rev: White y Bruzzone, 1996). En un estudio que evalúa los experimentos sobre la compatibilidad de 13 subtipos de conexinas para formar canales heterotípicos utilizando el registro de corriente de unión en pares de ovocitos sometidos a doble fijación de voltaje, se ha encontrado que no todas las combinaciones posibles son funcionales. En general, un tipo de conexina puede formar canales funcionales con otros cuatro subtipos de conexinas. Por estudios de quimeras se sabe que el dominio formado por las asas extracelulares interviene en este proceso (Rev: Bruzzone et al., 1995; Rev: White y Bruzzone, 1996).

El refinamiento de la técnica de doble fijación de voltaje que utiliza micropipetas de patch clamp en pares aislados de células de mamífero de tamaño pequeño, también ha permitido la medición directa de las corrientes unitarias de un solo canal de unión comunicante. Este tipo de estudios, combinado con la transfección del DNAC de conexinas específicas en líneas celulares deficientemente acopladas, ha permitido identificar las propiedades unitarias de los canales de unión formados por conexinas específicas.

Estos estudios han permitido concluir que cada conexina forma canales con una conductancia unitaria específica (Rev: Bennett et al., 1991; Bruzzone et al., 1995; White y Bruzzone, 1996).

6.4 Regulación de las conexinas

En el caso de los canales intercelulares no se han descrito sustancias que incrementen el estado de apertura del canal, sin embargo, algunos tratamientos pueden inducir su cierre. Los primeros inhibidores químicos del acople de los canales de unión fueron descritos para el calcio (Rose y Lowenstein, 1976) y la acidificación del pH intracelular (Turín y Warner, 1977.) El aumento en la concentración intracelular del calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) entre 5 a 10 μ M, induce rápidamente el cierre de las uniones comunicantes debido a que estas concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$ no estaban dentro del rangos fisiológico. No obstante estos estudios sugirieron que incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ en este rango pueden desempeñar un papel importante en la regulación de las uniones comunicantes en condiciones patológicas como el infarto. Actualmente se sabe que concentraciones fisiológicas de calcio son capaces de transferir entre las células adyacentes (ver adelante). La acidificación del medio intracelular puede provocar el cierre de las uniones comunicantes, aunque la sensibilidad al pH depende del tipo de conexina que esté formando el canal intercelular. En ovocitos de *Xenopus* que expresan distintas conexinas, se ha medido la corriente de transunión en condiciones que inducen la acidificación. En estos experimentos se ha observado, por ejemplo, que la Cx43 y la Cx38 son más sensibles a la acidificación que la Cx32 (Rev: Bruzzone et al., 1995). Un grupo de fármacos que se sabe reducen la conductancia de unión (gj) rápida y reversiblemente, son los anestésicos como el halotano y el heptanol (Rev: Bennett et al., 1988, Takens-Kwak et al., 1992).

La regulación de las conexinas también puede darse a nivel de modificaciones postraduccionales. Un ejemplo claro es el cambio en la conductancia del canal de unión inducida por la fosforilación de la Cx43 ejercida por la fracción catalítica de la cinasa C en los residuos de serina y treonina que se encuentran en la región carboxilo terminal de esta conexina (Moreno et al., 1994). La regulación a mediano o largo plazo puede darse a nivel de la transcripción, en este caso hay factores proteicos que actúan a través de regiones regulatorias del gen, lo que permite modificar la velocidad de la transcripción (Rev: Stagg y Fletcher, 1990.) Respecto a la formación de los canales de unión comunicante, se forman en el retículo endoplásmico y hay evidencia de que se ensamblan en el trans-Golgi (Musil y Goodenough, 1993).

Su expresión también puede ser modulada por otras proteínas de adhesión. Por ejemplo, en los epitelios, la Cx43 se encuentran colocalizada con otras moléculas de adhesión intercelular como es las proteína de la uniones estrecha ZO-1 (Giespmans y Mollenar, 1988). La línea celular S180, la cual carece del gene de la caderina L-CAM, que es una proteína requerida en la formación de uniones adherentes, expresa la forma defosforilada de la Cx43 (41 kDa). En estas condiciones, las células no transfieren colorantes fluorescentes. Estos investigadores encontraron que la transfección del gen de la caderina, L-CAM en esta células,

restablece la comunicación intercelular y favorece la expresión de la forma fosforilada de la Cx43 (43 kDa). El mecanismo celular mediante el cual las moléculas de adhesión modulan la expresión de la Cx43 se desconoce.

6.5 Transferencia de segundos mensajeros a través de uniones comunicantes

Como se mencionó, concentraciones no fisiológicas de $[Ca^{2+}]_i$ pueden cerrar los canales de unión. No obstante, estudios posteriores mostraron que cuando se inducen cambios de $[Ca^{2+}]_i$ dentro de rangos fisiológicos, éstos pueden transferir en la unión comunicante. Particularmente, la transferencia intercelular del Ca^{2+} y el IP_3 fue demostrada en células hepáticas y en células HEK293. En estos estudios se utilizaron células marcadas con indicadores de calcio fluorescentes en las cuales se monitorea el curso temporal de la transferencia del incremento en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ de una célula estimulada a sus vecinas (Saéz et al., 1995, Toyofuju et al., 1998). En el caso particular de Saez et al., (1995), la estimulación celular fue inducida por la microinyección de Ca^{2+} o de IP_3 a una célula del conglomerado.

En cuanto al AMPc, se sabe que éste permea a través de los canales de unión comunicante. Tsien y Weingart, (1976) en experimentos dirigidos a demostrar la relevancia del AMPc para la fisiología del músculo cardíaco bovino, aportaron también las primeras evidencias de que este segundo mensajero difundía a través de uniones comunicantes. En esos estudios, cortaron un extremo del fascículo del músculo cardíaco para exponer el ambiente extracelular, luego, a éste se le colocaba una gota de AMPc. Encontraron que con la exposición del AMPc al extremo cortado, era posible medir la sacudida simple en células vecinas del fascículo. Dado que las uniones comunicantes se encuentran en los discos intercalares de los fascículos musculares cardíacos, estos resultados indicaron que el AMPc difundía de una célula a otra en el músculo cardíaco. También en este trabajo, expusieron el extremo cortado del fascículo al AMPc radioactivo. Después de un tiempo, el fascículo se cortó en pequeños segmentos y se encontró que los metabolitos radioactivos derivados del AMPc difundían a lo largo del fascículo.

Murray y Fletcher (1984) utilizando cultivos de células de mamífero heterocelulares también aportaron evidencias de que el AMPc permea a través de uniones comunicantes. Para esto utilizaron la línea adrenal Y-1 y las células de la granulosa del ovario que en cultivo, se sabe, forman uniones comunicantes heterocelulares. Para ese entonces se sabía que las células Y-1 tienen receptores a la adrenocorticotropina (ACTH) los cuales están acoplados a una adenilato ciclasa, quien genera la AMPc a partir del ATP. También se sabía que las células de la granulosa no expresan receptores a la ACTH pero tienen receptores a la FSH. Ambos tipos de células activan a la proteína cinasa A (PKA) que es dependiente de la concentración del AMPc. A fin de saber si la estimulación con los agonistas respectivos inducía la activación de PKA, se utilizó a la proteína inhibidora de la fracción catalítica de la PKA conjugada a una

sonda fluorescente De esta forma cuando ocurría la unión del agonista al receptor, la presencia de la sonda unida a la fracción catalítica era detectada por fluorescencia, tanto en el citoplasma de la célula estimulada como en el de la célula que se encontraba acoplada a ésta. Así, con esta estrategia en cultivos heterocelulares, las células Y-1 solo respondieron a la ACTH pero no a la FSH. A la inversa, las células de la granulosa sólo respondieron a la FSH y no a la ACTH.

Fletcher y Greenan (1985) ampliaron la información obtenida de los hallazgos previos, poniendo a prueba estas observaciones en una población heterogénea de células de la granulosa. Se sabía previamente que las células de la granulosa son heterogéneas en cuanto a la expresión de receptores a la hCG. La activación del receptor a hCG en estas células induce la elevación del AMPc, permitiendo así la disociación de la fracción catalítica de la proteína cinasa, lo que inicia la respuesta esteroideogénica. Estos investigadores realizaron estudios de doble marcaje, por un lado utilizaron la proteína ligadora de la fracción catalítica acoplada al FITC, y por otro lado utilizaron un anticuerpo rodaminado específico dirigido al agonista hCG. Cuando analizaron los agregados celulares, encontraron que podían detectar la subunidad catalítica de la proteína cinasa, tanto en las células que presentaban el receptor a la hCG como en aquellas que no lo presentaban pero que estaban inter-comunicadas a la célula que si los expresaba a través de uniones comunicantes. No así en células de la granulosa desprovistas del receptor a hCG que no establecían contacto intercelular con células que si lo expresaban (Fletcher y Greenan, 1985). A partir de estos trabajos, estos autores propusieron que las uniones comunicantes sirven como un mecanismo de amplificación de la señal fisiológica.

6.6. - Antecedentes generales sobre la función de las uniones comunicantes

Desde su descubrimiento se ha propuesto que las uniones comunicantes participan en diferentes funciones tales como el acople eléctrico y/o metabólico, en la diferenciación y crecimiento. Mas recientemente también se han propuesto su participación en la regulación de la secreción de las glándulas. Estas hipótesis han sido propuestas con base en estudios que correlacionan cambios estructurales con cambios en el desarrollo o función celular (Rev: Meda, 1996). Recientemente, muchas de las funciones atribuidas a las uniones comunicantes se han puesto a prueba utilizando animales deficientes en los genes que codifican para conexinas específicas, también llamados knock-out (KO.) Por ejemplo, se sabe que las conexinas son críticas en la morfogénesis del corazón. Los ratones homocigotos deficientes en el gen que codifica para la Cx43 mueren por asfixia debido a anomalías que se presentan durante la formación del corazón. Lo que se observa en los corazones de estos ratones, es que el ventrículo derecho forma anormalmente varios septos generándose numerosas cavidades interconectadas lo que no permite su correcta función. Este es el

órgano que mayormente expresa la Cx43 (Reaume et al., 1994). La pérdida de la Cx37 induce falta de ovulación y esterilidad (Rev: White y Paul, 1999). Otros ejemplos relevantes para los fines de esta tesis se verán adelante.

6.7.- Regulación de la secreción mediada por uniones comunicantes

La observación de que la eficiencia en la capacidad secretora de las células beta del páncreas disgregadas es menor con respecto a la detectada en el mismo número de células cuando éstas se han reagregado y reformado en sus contactos intercelulares, permitió proponer que estos mecanismos de secreción dependen de los contactos célula a célula (Fig. 13). Entre estos, posiblemente las uniones comunicantes (Pipeleers et al., 1982, Meda 1996).

En general existen pocos estudios que hayan investigado la participación de las uniones comunicantes en la secreción glandular. No obstante, existen evidencias de su posible participación en varios sistemas celulares secretores, en los cuales se ha encontrado que la estimulación sostenida con los secretágonos está asociada a un incremento en el acople celular y/o en un aumento en la expresión de las conexinas. Por ejemplo, en varias glándulas se ha encontrado que sus principales secretágonos o sus segundos mensajeros regulan positivamente la expresión de conexinas. Este es el caso de la glándula tiroides, en la cual la incubación con la hormona tirotrópica aumenta la expresión de la Cx43 (Munari-Silem et al., 1991) y el de las células de Leydig, en las cuales la LH aumenta la expresión de la Cx43 (ver adelante Pérez-Armendariz et al., 1996), además del de las células epiteliales alveolares mamarias que incrementan la expresión de la Cx26 y la Cx32 durante la lactancia (Pérez-Armendariz et al., 1995).

El acople por uniones comunicantes puede ser un mecanismo que permite equilibrar los gradientes iónicos o metabólicos para así generar una respuesta coordinada de un grupo de células. Como ya se mencionó, el Ca^{2+} , el IP₃ y el AMPc pasan a través de las uniones comunicantes. La transferencia intercelular del Ca^{2+} y el IP₃ ha sido demostrado en las células hepáticas (Saez et al., 1995) y en células HEK293 (Toyofuku et al., 1998) y la del AMPc entre las células del músculo estriado cardíaco y entre las células de la granulosa (Tsien y Weingart, 1976).

El acople puede amplificar la respuesta hormonal mediante la transición de segundos mensajeros entre las células vecinas. Particularmente cuando este grupo de células secretoras no sea homogéneo, por ejemplo entre otros aspectos, en la expresión de sus receptores a secretágonos. A este respecto, en diferentes sistemas glandulares existe evidencia de heterogeneidad en un mismo tipo celular.

7.0 ANTECEDENTES SOBRE LAS UNIONES COMUNICANTES EN EL TESTICULO

7.1- Identificación de uniones comunicantes en las células del testículo

a) Testículo fetal

En la gónada indiferenciada, por estudios de microscopía electrónica, se ha reportado la presencia de estrechamientos en el espacio intercelular sugiriendo la presencia de uniones comunicantes (Just et al., 1981). No obstante, no existe un estudio específico que demuestre contundentemente su existencia. En el testículo fetal, Nagano y Suzuki (1976) a los 14 y 16 dpc, observaron desmosomas y estructuras semejantes a las uniones estrechas. En contraste, sólo ocasionalmente estos investigadores observaron uniones comunicantes. Entre los 16 y 20 dpc encontraron uniones estrechas en diferentes regiones de las membranas de las células de Sertoli, así como placas de unión comunicante ovals relativamente grandes (1.5 μm), localizadas en las diferentes regiones de la membrana de las células de Sertoli.

b) Testículo neonatal y prepuberal

Después del nacimiento, a los 6 dpp, Nagano y Suzuki, (1976) observaron el que existían uniones estrechas en arreglos de líneas convergentes formando mallas. A estas fechas aun no presentan ninguna orientación en particular con respecto al plano de la membrana. Estas mallas pueden formar arreglos rectangulares o triangulares. Encerrados dentro de estas mallas, es posible observar ya de manera muy frecuente, placas ovoidales de uniones comunicantes. A partir del día 16 dpp se observan ya los típicos arreglos lineares de las filas múltiples de partículas que resultan de las uniones estrechas y que forman parte de la barrera hematotesticular. Estas se localizan en el tercio basal de la membrana lateral de las células de Sertoli del túbulo seminífero. Intercaladas entre las uniones estrechas se encuentran las uniones comunicantes en arreglos rectilíneos, a semejanza de lo observado en la rata adulta. A esta edad las células de Sertoli se encuentran en su etapa completamente diferenciada.

c) Testículo adulto

En el túbulo seminífero del animal adulto, las uniones comunicantes se localizan principalmente en los complejos de unión. Estos complejos de unión se encuentran en el tercio inferior de la membrana lateral de las células de Sertoli, separando al epitelio seminífero en una región basal y otra adluminal. Estas uniones, entre otros efectos, evitan el paso de sustancias de alto peso molecular a la región luminal donde se lleva a cabo la meiosis y la espermiogénesis. Gilula et al., (1976) observaron los complejos de unión en secciones finas transversales de testículo de rata adulta por microscopía electrónica. Los complejos de unión en sus micrografías muestran que hay bandas de alta densidad electrónica bordeando a las dos bicapas de las células de Sertoli en aposición. Corriendo paralelas a estas zonas electrodensas se

encuentran grupos lineares de filamentos llamados elementos fibrilares. Igualmente de manera paralela a estos, se pueden observar vesículas ovoide-alargadas que corresponden a membranas del retículo endoplásmico. Estos investigadores observaron, en cortes perpendiculares regiones en donde las membranas se estrechan aun más, arreglos heptalaminares ahora conocidos como característicos de las uniones comunicantes. Las uniones estrechas entre las células de Sertoli del túbulo seminífero del roedor adulto, son vistas en replicas de criofractura como filas de partículas pequeñas en la cara P que no se encuentran fusionadas entre sí. Estas filas de partículas corresponden espacialmente a las ranuras lineares (cara E) que son complementarias a las protusiones de la replica de la cara P. El número de líneas de uniones estrechas puede ser múltiple. De manera característica las uniones comunicantes se encuentran entre las filas de partículas que forman las uniones estrechas.

7-2.- Conexinas descritas en las células del testículo adulto

a) Tubulo seminífero

Diferentes conexinas han sido identificadas en el testículo de roedores. En el túbulo seminífero se han descrito la proteína de la Cx43, la Cx33, la Cx31, la Cx26, la Cx32 y la Cx37 por estudios de inmunofluorescencia en cortes de testículo y/o por inmunoblot. Estas conexinas en el túbulo, tienen una distribución celular específica. Así, la Cx43 y la Cx33 se localizan en las células de Sertoli que forman el epitelio seminífero, principalmente en la región del complejo de unión (Pelletier, 1995; Pérez-Armendariz et al., 1994; Risley et al., 1992; Tan et al., 1996). La Cx26 y la Cx32 se han localizado en el epitelio seminífero, luminalmente adelante del complejo de unión, pero no ha podido demostrarse su localización por microscopía electrónica en este compartimiento (Risley et al., 1992). La Cx37 se localiza en el endotelio de los vasos sanguíneos de los intersticios (Tan et al., 1996). La Cx31 se encuentra en las células espermatogoniales, las espermatidas redondas y las espermatidas elongadas. (Mok et al., 1999). La conexina que se expresa más abundantemente en el testículo es la Cx43. La expresión de la Cx43 en las células de Sertoli también ha sido corroborada por estudios de hibridación *in situ* (Batias et al., 1992).

La Cx43 en los complejos de unión Sertoli-Sertoli se modula en estadios específicos del ciclo del epitelio seminífero (Risley et al., 1992). La mayor expresión de la Cx43, se observa de manera global en los estadios que van del I-VIII del ciclo en la rata. Sin embargo, haciendo un análisis de estos estadios, estos investigadores observan que la mayor reactividad se observa en el grupo que conforma a los estadios VI-VIII. En el ratón, la mayor reactividad se encuentra exclusivamente en los estadios VI -VIII. Por el contrario, la señal es muy débil en las etapas que van del estadio IX en adelante. Esta expresión estadio específica es importante, pues los estadios que van del VII al VIII se correlacionan con la formación y reabsorción de los complejos de unión (vease sección 3), por lo que se considera que corresponden a las

fases en las cuales las espermatogonias se diferencian en espermatocitos y se translocan de la región basal a la región adluminal en rata y ratón (Risley et al., 1992). En las regiones cercanas al lumen, la Cx43 se detecta como una señal menor y difusa. Esta región se encuentra poblada por espermatidas elongadas prontas a liberarse. Su expresión en estas zonas no parece modularse en los diferentes estadios de la espermatogénesis. Colocalizada con la Cx43, en la región del complejo de unión, también se ha encontrado a la Cx33 en el testículo de rata. Esta se regula en forma semejante a la Cx43 durante la espermatogénesis.

Recientemente, se han estudiado ratones con mutaciones que generan animales infértiles denominados ebo/ebo y jun-d -/- (no se conoce la funcionalidad de las proteínas de estos genes, por lo tanto no se han tipificado), los cuales presentan anomalías anatómicas en los túbulos. El marcaje inmunofluorescente para la Cx43 en el epitelio seminífero de estos animales está muy disminuido en la región de la barrera hematotesticular en el estadio VIII, contrariamente a lo observado en las células de Sertoli de ratones silvestres. En estos mutantes, las espermatidas son anormales, por ejemplo, presentan flagelos cortos. Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que los estadios tardíos de las células germinales (las espermatidas) pueden secretar factores parácrinos que mantienen los niveles adecuados de la expresión de la Cx43 en las células de soporte (Batias et al., 1999).

Resumiendo, diferentes conexinas se expresan en el testículo adulto indicando la relevancia que tiene la comunicación intercelular directa para la función testicular. De éstas la más abundantemente expresada es la Cx43. Las evidencias hasta ahora disponibles indican que esta conexina regula en forma importante la espermatogénesis.

b) Conexinas descritas en las células intersticiales

A diferencia del tubo seminífero, en el intersticio sólo se ha descrito la expresión de la Cx43. En éstas se ha mostrado su localización en las células de Leydig. En las células de Leydig se ha encontrado en el ratón (Pérez Armendariz et al., 1994, 1996), rata (Risley et al., 1992) y cuyo (Pelletier et al., 1995). También se ha descrito en el humano (Steger et al., 1999). A diferencia de las uniones comunicantes del tubo seminífero, la expresión funcional de la comunicación intercelular entre las células de Leydig ha sido estudiada por métodos fisiológicos y biofísicos (Pérez Armendariz et al., 1994, 1996).

i) Evidencias moleculares de la expresión de la Cx43 en las células de Leydig adultas

Los experimentos inmunocitoquímicos y electrofisiológicos han permitido inferir que la principal conexina que se expresa en las membranas de las células de Leydig es la Cx43. Pérez-Armendariz et al., (1994) realizando ensayos de inmunofluorescencia indirecta para la Cx26, la Cx32 y la Cx43, en secciones de testículo de ratón, encontraron que sólo esta última se localizaba en las células de Leydig. Su expresión

se corroboró también en cultivos enriquecidos en estas células (Pérez Armendariz et al., 1996). La expresión de la Cx43 también se documentó por estudios de inmunoblots en los cuales se identificaron bandas de 41 y 43 kDa, tanto en homogenados de testículo como en preparaciones de células en cultivo enriquecidas en células de Leydig. Estas bandas son semejantes a las características observadas en los homogenados del corazón (Pérez-Armendariz et al., 1994 y 1996) que corresponden a la proteína de la Cx43 defosforilada y fosforilada respectivamente.

ii) Evidencias electrofisiológicas de la expresión de la Cx43 en las células de Leydig adultas

Pérez-Armendariz et al., (1994) utilizando la técnica de doble fijación de voltaje de pares aislados de células de Leydig recién dispersadas, registraron las propiedades biofísicas de las uniones comunicantes entre estas células. Estos autores encontraron que las corrientes macroscópicas muestran que las uniones comunicantes son dependientes al voltaje con un V_0 igual al registrado de pares de células transfectadas con la Cx43. El valor de la conductancia de unión promedio fue de 7.2 nS, el coeficiente de acople calculado a partir del cociente de $g_j / g_{nj} + g_j$ fue cercano a 1, lo cual indica que estas células están muy acopladas. La conductancia de unión estacionaria normalizada, registrada de pares celulares, fueron graficados con respecto al voltaje (Fig. 14).. Los parámetros de la ecuación de Boltzman utilizados para ajustar esta curva fueron semejantes a los obtenidos cuando se grafica la conductancia de unión de pares de células deficientemente acopladas SKHep-1 transfectadas con la Cx43. Mediante los registros de la corriente unitaria de un par de células de Leydig que han sido tratadas con halotano, se registraron corrientes unitarias principalmente de 110 y 30 pS. Estos valores también se registran de pares de células deficientemente acopladas transfectadas con la Cx43. Estos datos permitieron concluir a este grupo que las características macroscópicas y unitarias de las corrientes de unión entre las células de Leydig son similares a las registradas a las registradas de canales formados con la Cx43 (Pérez-Armendariz et al., 1994.) Por lo tanto, los estudios de corrientes de unión en pares aislados de células de Leydig, indican que estas células expresan mayoritariamente canales de unión comunicante formados con la Cx43.

iii)- Antecedentes sobre la regulación de la expresión de la Cx43 y de la comunicación intercelular en las células de Leydig adultas

A fin de obtener más información sobre si la Cx43 es la principal conexina que intercomunica a las células de Leydig, la Dra. Pérez Armendariz et al., (1996) estudiaron si la comunicación intercelular y la expresión de la Cx43 se modulan *in vitro*. En este estudio, este grupo investigó si la Cx43 en las células de Leydig es modulada por el principal estímulo fisiológico que regula la secreción de testosterona *in vivo*, específicamente la LH. Para ello se registró la expresión de la Cx43 por inmunofluorescencia y la comunicación intercelular mediante el monitoreo de la transferencia de amarillo de Lucifer microinyectado a

una célula de agregados de células de Leydig (8-10 células) mantenidos en cultivos en presencia o ausencia de la LH, hCG o AMPc. Se sabe que las células de Leydig son las únicas células en el intersticio que expresan receptores a la gonadotropina LH. También que la LH y la hCG actúan sobre un mismo receptor que está acoplado a la adenilato ciclasa. En estos estudios encontraron que la fracción del número de células de Leydig acopladas con el amarillo de Lucifer, decayó de un 93% a las 8 hrs, a un 21% a las 36 hrs de cultivo. Correlacionado con este cambio, la expresión de la Cx43 a las 8 horas fue abundante pero esta decayó importantemente en cultivos de 36 hrs (Fig. 15A y B). El decaimiento en estos dos parámetros se previno cuando los cultivos fueron mantenidos por 36 horas en presencia de sus principales secretágonos, la LH y la hCG o su análogo segundo mensajero, el db-AMPc. De este estudio se concluye que la principal hormona inductora de la esteroideogénesis y de la secreción de la testosterona, regula la expresión de la Cx43 y la comunicación intercelular en las células de Leydig. También indican que al menos un 70 % de la comunicación intercelular entre las células de Leydig, resulta de la expresión de canales formados con la Cx43. Estos datos, aunados a los obtenidos de corrientes de unión entre pares aislados de células de Leydig anteriormente mencionados, apoyan fuertemente que la Cx43 es la principal conexina que intercomunica a estas células. También sugieren la relevancia fisiológica de la Cx43 en la regulación de la secreción de testosterona, que como veremos es consistente con los resultados de esta tesis. En resumen, los trabajos de esta sección indican que las uniones comunicantes y en particular las formadas con la Cx43, pueden estar jugando un papel crítico en la función testicular, tanto exócrina (espermatogénesis) como endócrina (esteroideogénesis).

iv) Heterogeneidad de las células de Leydig

Los experimentos previos indican la posibilidad de que las conexinas se requieran para igualar la concentración de metabolitos entre las células de Leydig debido a que son funcional y estructuralmente heterogéneas. El análisis morfológico de las células de Leydig ha mostrado que existen poblaciones que exhiben diversidad en tamaño, composición de organelos y actividad metabólica (Bhalla et al., 1987; Hedger y Eddy, 1987). Más aun, los estudios de ensayo de placa también han dado evidencia de que hay heterogeneidad funcional en la secreción de testosterona que presentan las células de Leydig cultivadas cuando estas son estimuladas con la hormona gonadotropina coriónica humana hCG. Esto es, su capacidad y curso temporal de respuesta para secretar andrógenos en respuesta a una concentración con hCG es heterogénea (Pino & Valladares, 1992). Chase y Payne (1983) también han encontrado utilizando gradientes de metrizamida, que pueden aislarse dos diferentes poblaciones de células de Leydig que secretan tasas distintas de testosterona en respuesta a una misma dosis de hCG, ver Fig. 16 (Chase y Payne, 1983). Estas observaciones indican que *in vivo* existe esta heterogeneidad celular, por ejemplo en la

expresión de receptores a LH, proteínas u organelos que son importantes en la síntesis y secreción de la testosterona.

iv) La Conexina 43 en la función testicular

Recientemente, se ha descrito que el ratón homocigoto Knock-Out para la Cx43, sobrevive solo durante la etapa fetal ya que muere por asfixia al nacimiento debido a una malformación por falla ventricular derecha (Reaume et al., 1995). En estos animales, se encontró que el tamaño de las gónadas tanto en hembra como en el macho, fueron significativamente más pequeñas en comparación con las observadas en las gónadas de la cepa silvestre. Esta observación se encontró incluso en las etapas tempranas del desarrollo gonadal. Las diferencias de tamaño, en parte, resulta de una disminución en el número de las células germinales en las gónadas de ambos sexos. No obstante, se desconocen los mecanismos celulares que determinan estas alteraciones (Juneja et al., 1999) así como se ignoraba si la Cx43 se expresaba en las gónadas fetales. Dada su relevancia para el desarrollo gonadal este ultimo aspecto fue abordado en esta tesis (Ver resultados primera sección).

Con la finalidad de analizar la consecuencia de la pérdida de la Cx43 en el desarrollo testicular postnatal. Roscoe et al., (2001) analizaron testículos fetales deficientes en esta conexina de 17.5 dpc transplantados en la capsula del riñón de animales silvestres (Roscoe et al., 2001). En principio, esta técnica permite que el testículo implantado esté vascularizado permitiendo que pueda desarrollarse. Cuando compararon secciones de testículos transplantados de animales control con secciones de testículo *in situ*, no encontraron diferencias en su desarrollo a las 3 semanas del trasplante. En contraste, en secciones de testículos de ratones deficientes en la Cx43 trasplantados por 3 semanas, encuentran que los túbulos de los mutantes tienen una disminución en el número de células germinales en comparación con los de la cepa normal o silvestre. Estos resultados sugieren que la falta de la conexina es suficiente para alterar la proliferación posnatal de las células germinales. En este trabajo también se concluye que la falta de esta conexina no altera la esteroidogénesis ya que los niveles de testosterona inducidos por la estimulación con LH por 4 hrs, no fueron significativamente distintos a los de animales silvestres, en los testículos de transplandados por 3 semanas. Dado que las investigaciones que he realizado en esta tesis apuntan en otra dirección. Estos resultados serán discutidos adelante (ver discusión).

Figura 1.- En el siguiente esquema se muestran los elementos celulares que componen al testículo. En el túbulo seminífero se encuentran las células germinales en diferentes estados de diferenciación. Englobando a estas, se encuentran las células columnares de Sertoli. En los intersticios se encuentran mayoritariamente, en la etapa adulta, las células de Leydig, principal sistema celular productor de testosterona. Destacan en las zonas de aposición membranar de las células de Sertoli, los complejos de unión que componen a la barrera hematotesticular.

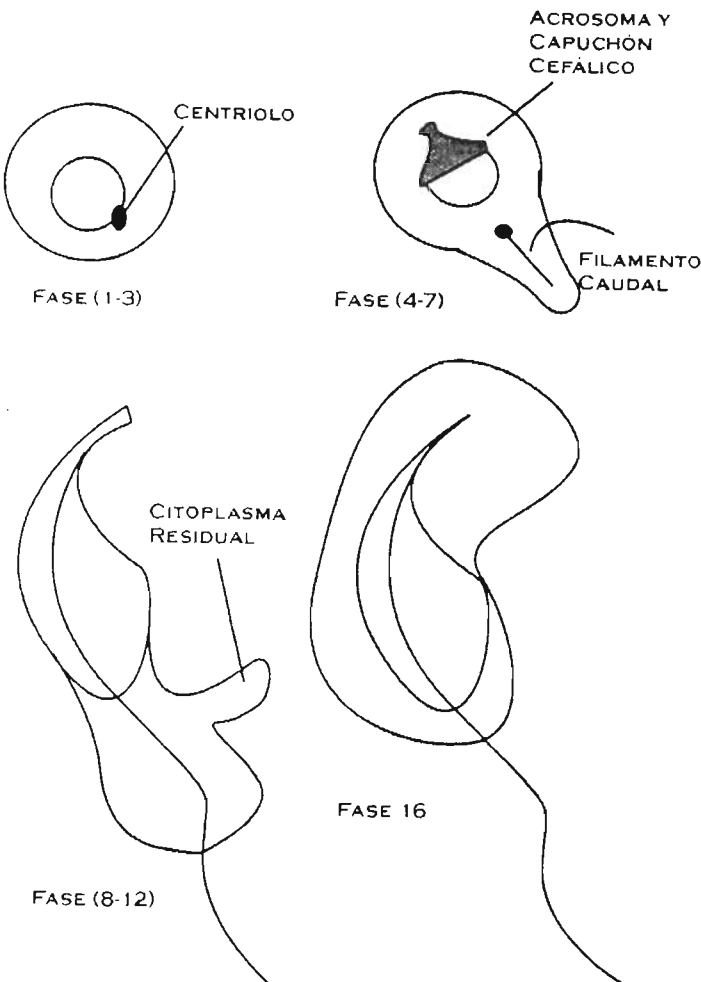
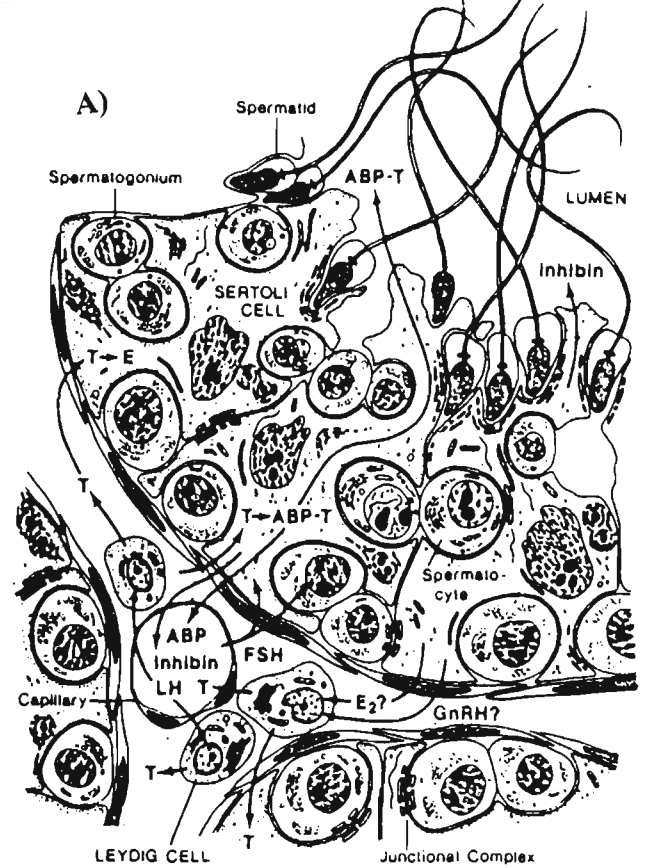


Figura 1B.- En el siguiente diagrama, se muestra un esquema simplificado de la forma en la que ocurre la espermatogénesis, desde la célula menos diferenciada en el periodo posnatal (la cual deriva de una célula germinal primordial ó gonocito), hasta la generación de los espermatozoides completamente maduros.

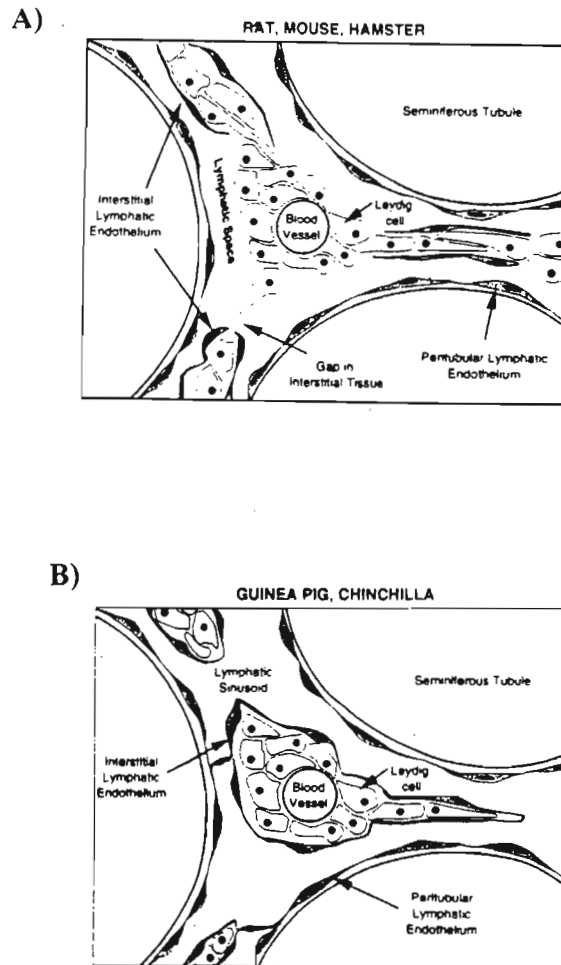
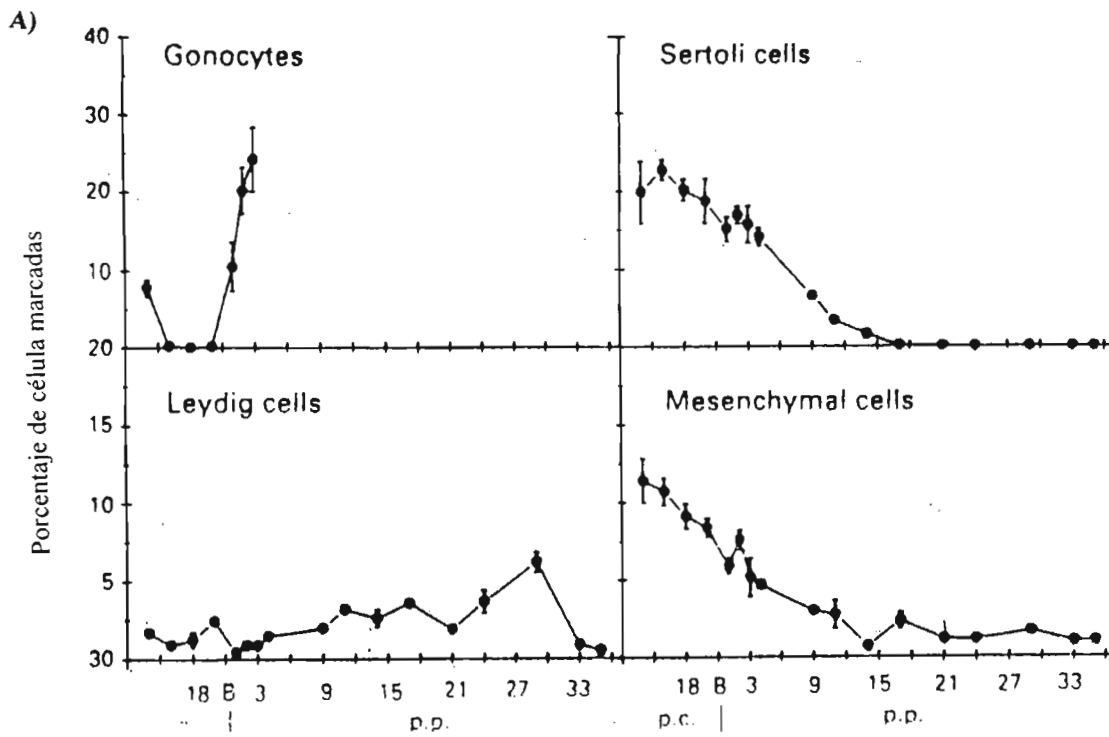
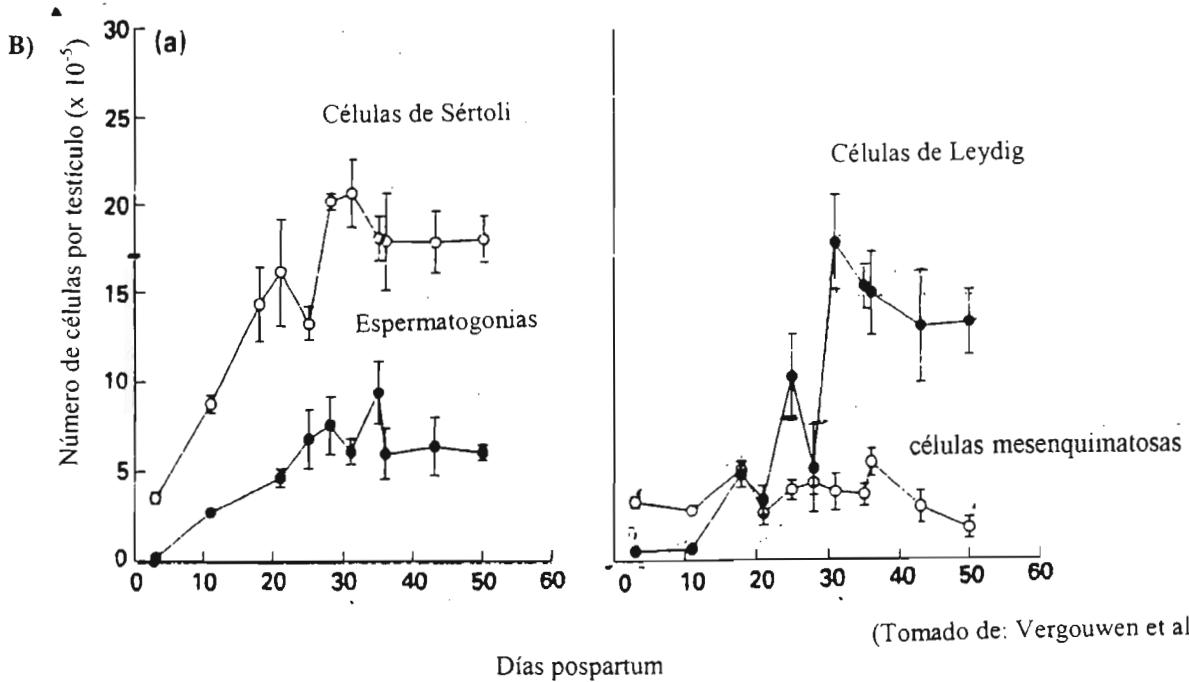


Figura 2.- En el diagrama esquemático, se muestra la organización intersticial celular para el ratón y la rata (2 A) y para el cuy y la chinchilla (2B). En el caso del ratón y la rata, los intersticios presentan un volumen pequeño y hay poco tejido conectivo. En el caso de la organización observada para el cuy y la chinchilla, la diferencia observada con respecto a los intersticios de rata y ratón, es que el endotelio linfático encierra completamente a las células de Leydig.

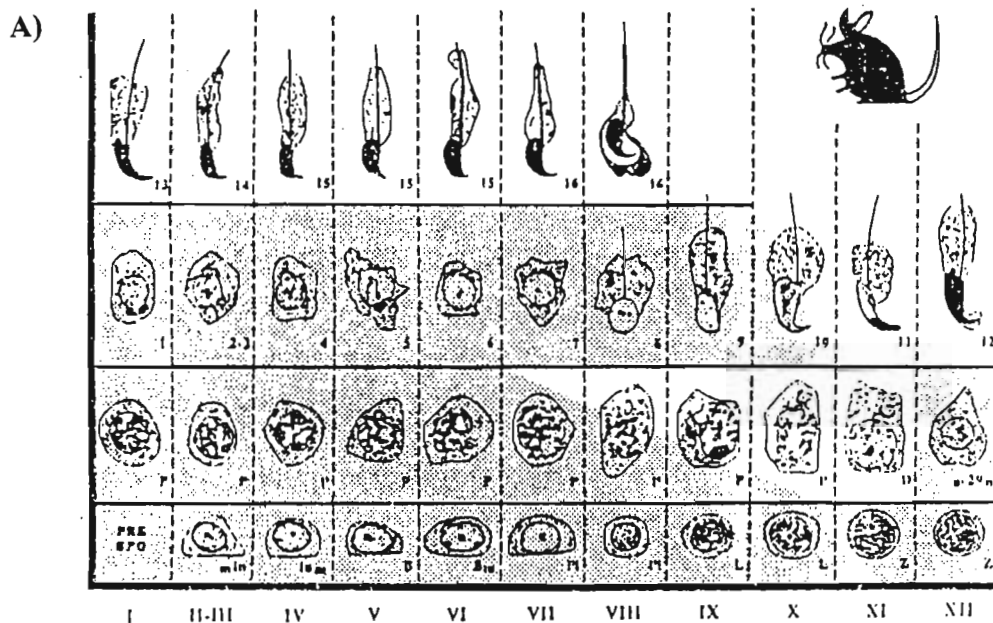


(Tomado de: Vergouwen et al., 1991)



(Tomado de: Vergouwen et al., 1993)

Figura 3.- En la gráfica 3 A, se muestra el curso temporal del porcentaje de células que incorporan la marca de ^3H -timidina durante la ontogenia del ratón. En la gráfica 3B, se indica el curso temporal del número total de células testiculares durante el desarrollo posnatal



(Según Oakberg, 1959 y Enders & Mayr, 1994)

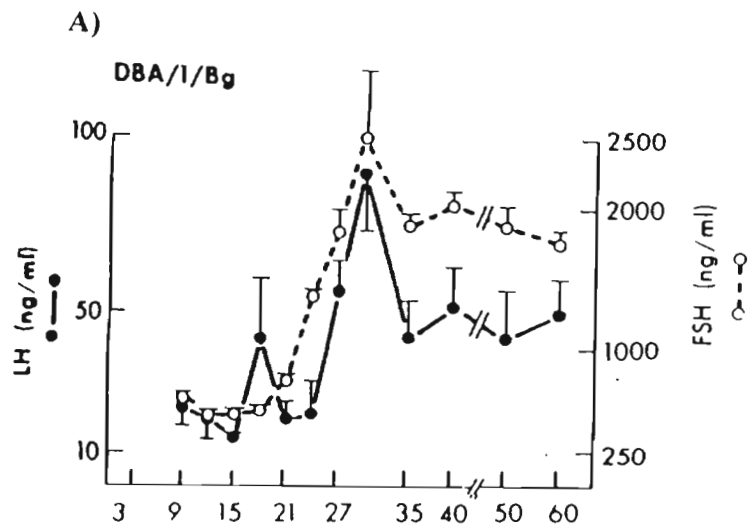
B)

Edad en días	gonias	citós	Lep	Zig	P. tem	P.Int	P.Tard	M-I Y MII	Espermat 1-8
8-10	80	7	13						
10-12	11.3	24.5	11.3	37.7	9.4	5.6	0		
15-17			3.9	13.7	22.9	28.5	30.8		
17-19		1	0	7	14.5	22	47	3.5	
22-24						2	30	12	36.6

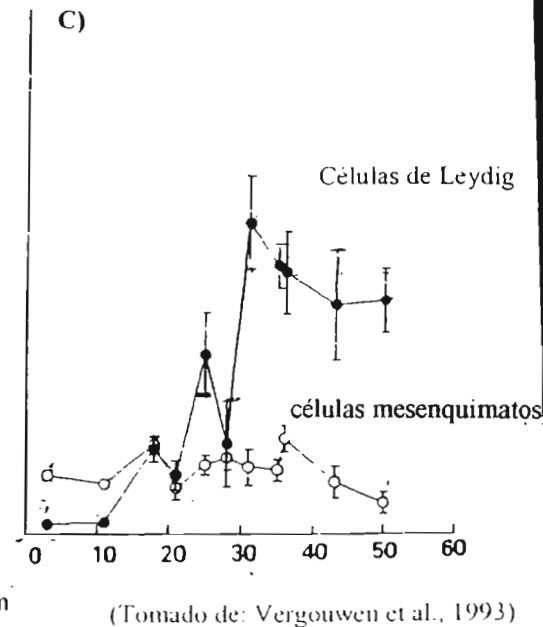
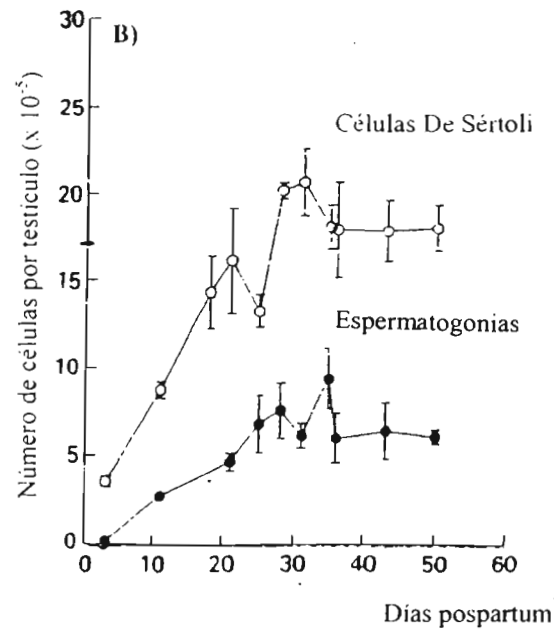
(Según Nebel, 1962)

Figura 4 A.- Asociaciones de células germinales que se presentan en el ciclo del epitelio seminífero en el ratón, según Oakberg (1956) y Enders & Mayr (1994). B= espermatogonia tipo B; PL = espermatocitos en preleptoteno; L = espermatocito en leptoteno; Z= espermatocito en cigoteno; PQ = espermatocito en paquitenio; D = diacinesis.

Figura 4 B.- Edad en la que son observados distintos tipos de células germinales durante el desarrollo posnatal. Los números indican el porcentaje obtenido al contar el tipo de células germinales observados en 108 túbulos seminíferos en los días del desarrollo posnatal especificados en la tabla. La meiosis no comienza sino hasta el día 8 dpp. MI = meiosis I; M II= meiosis II.



(Tomado de Selmanoff et al., 1977)



(Tomado de: Vergouwen et al., 1993)

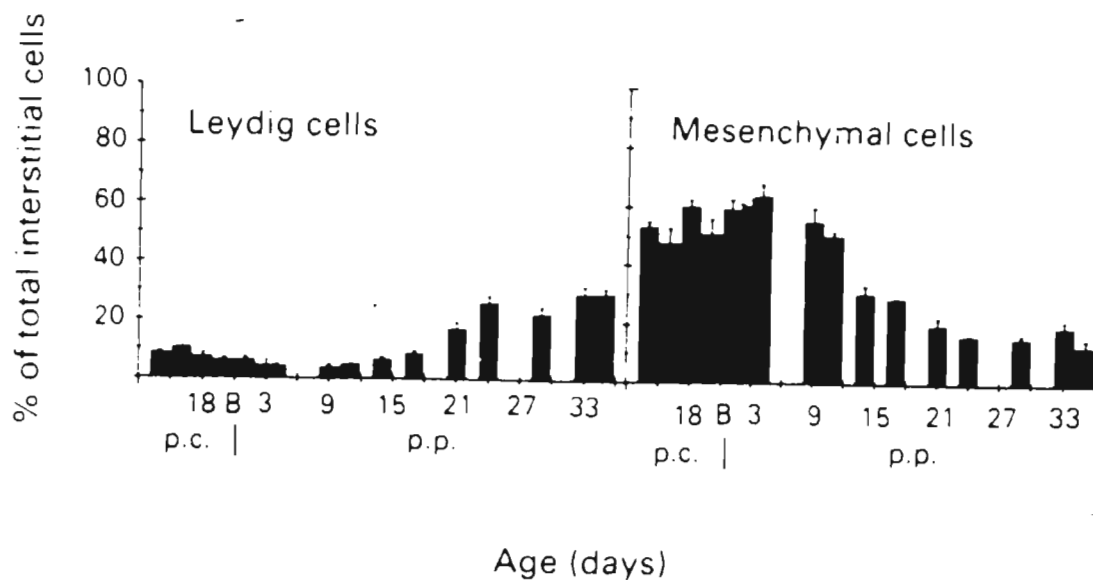
LH

- Es fundamental para la diferenciación de las células de Leydig.
- Regula a su propio receptor.
- Mantiene y regula la expresión óptima de las enzimas esteroidogénicas.
- Es el principal inductor de la síntesis de testosterona.
- Es un inductor fundamental del inicio de la espermatogénesis junto a la hormona FSH.

FSH

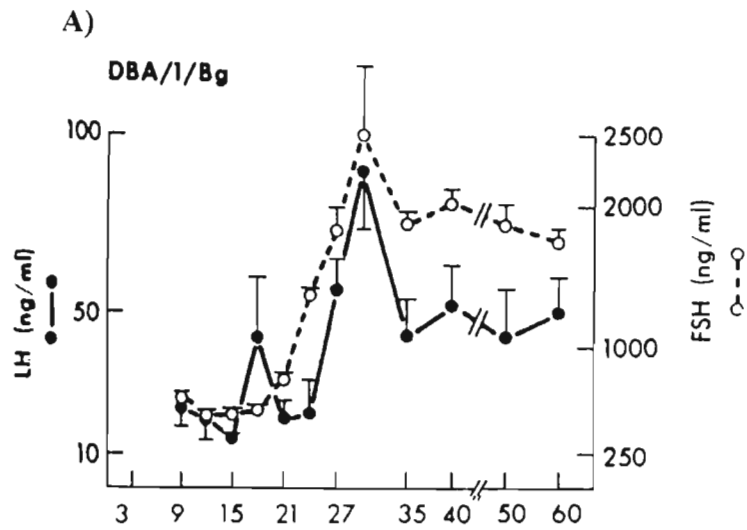
- Es fundamental para la diferenciación y proliferación de las células de Sertoli y de las células germinales durante el periodo posnatal.
- Regula a su propio receptor.
- Actúa de manera sinérgica junto a la hormona LH, para regular algunas enzimas esteroidogénicas.
- Es fundamental para el inicio de la espermatogénesis, junto a la hormona LH.
- Regulan la expresión de los componentes que forman la barrera hematotesticular.

Figura 5.- En el esquema, se muestran tres gráficas, en A se representa una gráfica de la liberación de las hormonas LH y FSH durante el desarrollo posnatal del ratón. En B y C, se indican las gráficas del número absoluto de células testiculares durante el desarrollo posnatal del ratón. Como puede observarse, los niveles de las hormonas LH y FSH antes del día 21 dpp, coinciden con el incremento del número absoluto de células de Sertoli y de células espermatogoniales. En el caso de las células de Leydig, un incremento en su número absoluto va asociado al principal incremento en los niveles de las hormonas LH y FSH, lo cual sucede a partir del día 21 dpp.

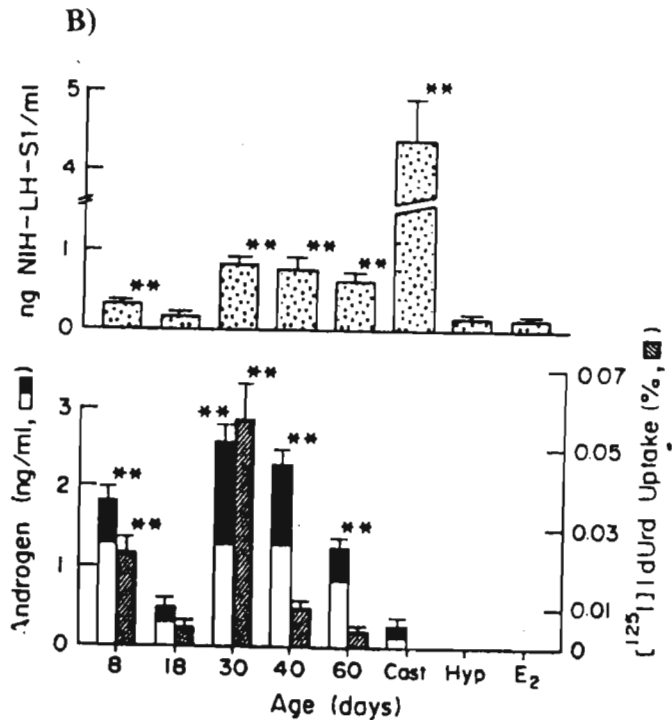


(Tomado de: Vergouwen et al., 1991)

Figura 6.- En las gráficas se muestra el porcentaje de células de Leydig respecto al total de células intersticiales en el desarrollo fetal y posnatal en el ratón (número relativo). Puede observarse que el número relativo de las células de Leydig observado en la etapa posnatal, decrece a un mínimo a partir del día 3 dpp y hasta el día 11, más tarde, a partir de los días 15- 21, ya hay un claro incremento en el número relativo de las células intersticiales y este incremento se correlaciona temporalmente y sobre todo a partir del día 21 dpp hacia adelante, con el decremento de las células mesenquimatosas.



(Tomado de Selmanoff et al., 1977)



(Tomado de Ogasawara et al., 1984)

Figura 7.- En la gráfica superior (a) puede observarse que la liberación de la LH se encuentra coordinada con la de FSH y que hay un periodo de inhibición de la liberación de estas gonadotropinas hasta antes del día 21 dpp en el ratón. En las gráficas en (b), puede observarse que el curso temporal de la liberación de LH sérico (gráfica superior) presenta fluctuaciones que son paralelas a las encontradas para los andrógenos totales en el periodo posnatal (gráfica inferior).

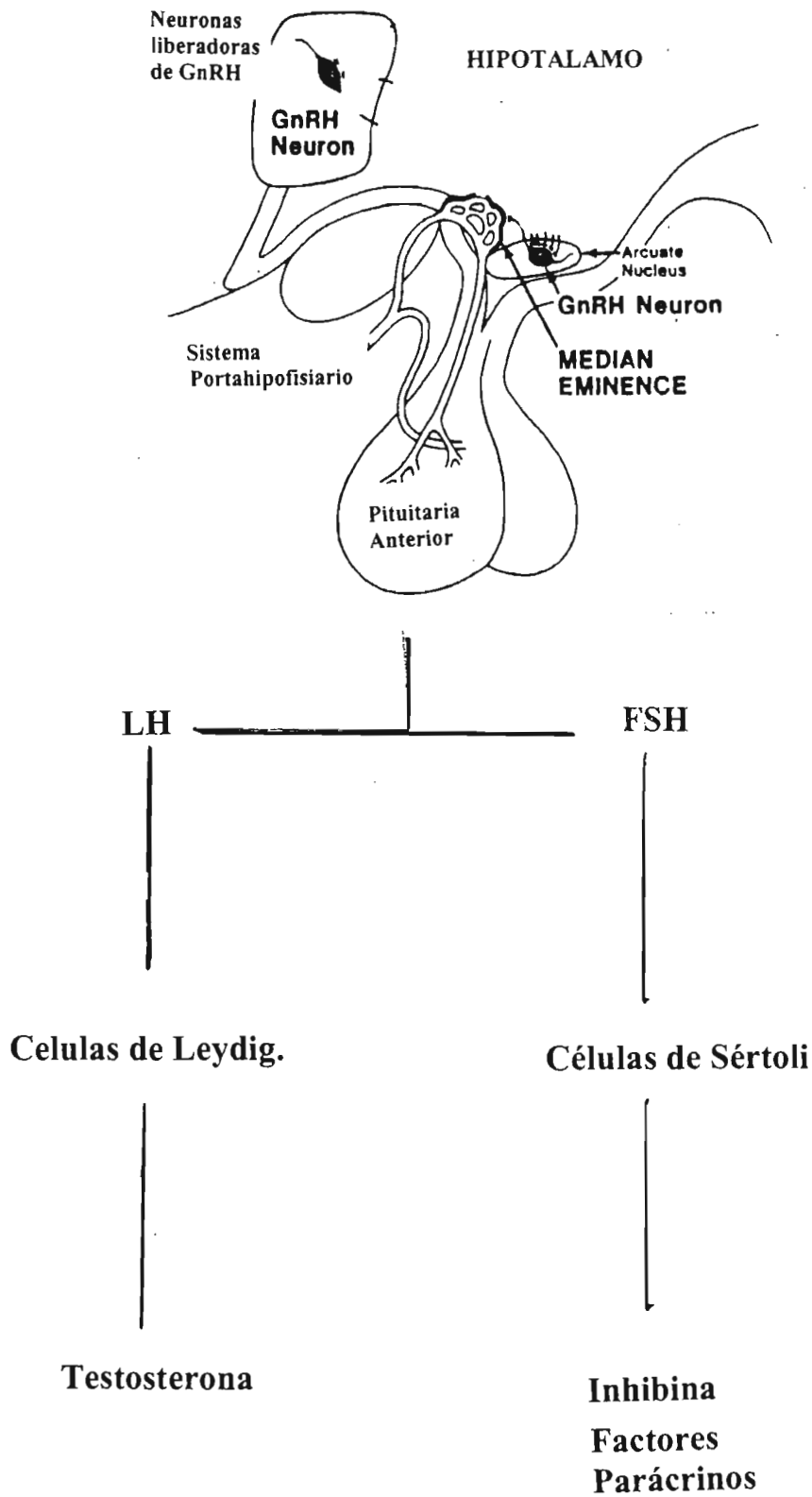


Figura 8.- Diagrama esquemático que muestra a las hormonas gonadotrópicas liberadas por la hipófisis anterior y sus células blanco, así como el tipo de respuesta que produce.

Δ^5 -3 β -HYDROXYSTEROIDS

Δ^4 -3-KETOSTEROIDS

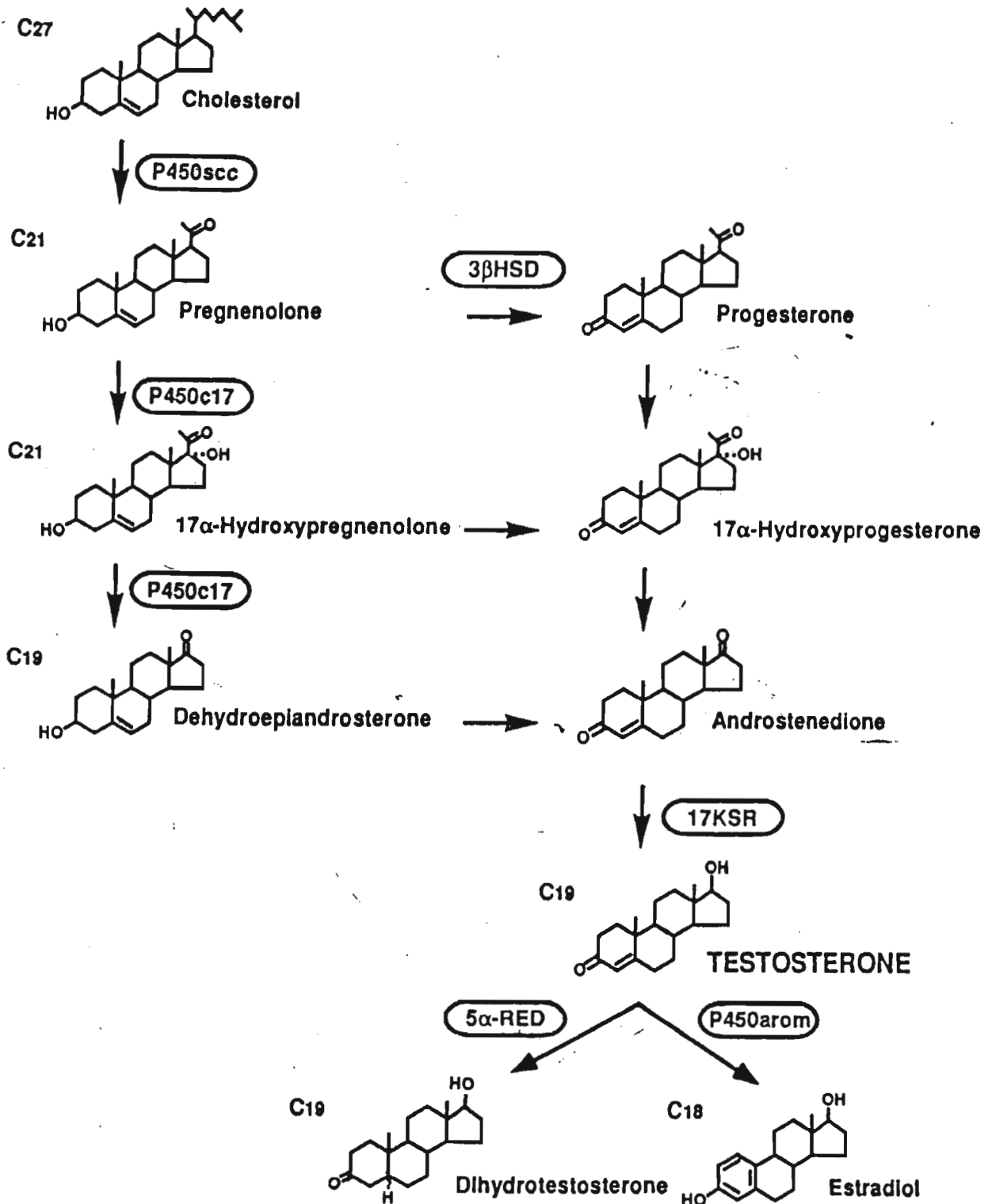
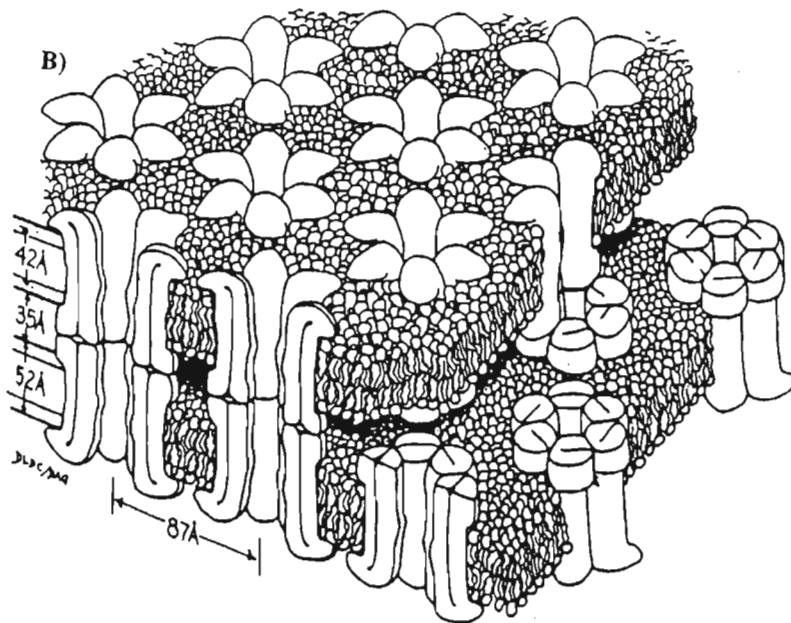


Figura 9.- Vías biosintéticas en las células de Leydig. P450 citocromo liberadora de la cadena lateral; P450_{c17} = Citocromo 17 α hidroxilasa/C₁₇₋₂₀ liasa; 3 β -HSD = 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa / Δ^{4-5} isomerasa; 17-KSR/ 17 β -HSD = 17 cetosteroide reductasa/ (17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa); P450 arom = citocromo P450 aromatasa; 5red = 5 α reductasa.

A

Cx33	Cx36	Cx45	Cx25
Cx43	Cx30	Cx31.1	Cx59
Cx40	Cx37	Cx39	
Cx50	Cx31	Cx57	
Cx46	Cx32	Cx31.3	
Cx26	Cx30.3	Cx62	



(Tomado de Unwin & Zamphigi, 1980)

Figura 10.- En la tabla A se muestran los tipos de conexas hasta el momento clonadas. En la figura B, se muestra la forma en que están dispuestas los componentes membranales y los conexones hexaméricos para formar los canales de unión comunicante, cada conexón está formado por seis subunidades proteicas de conexas.

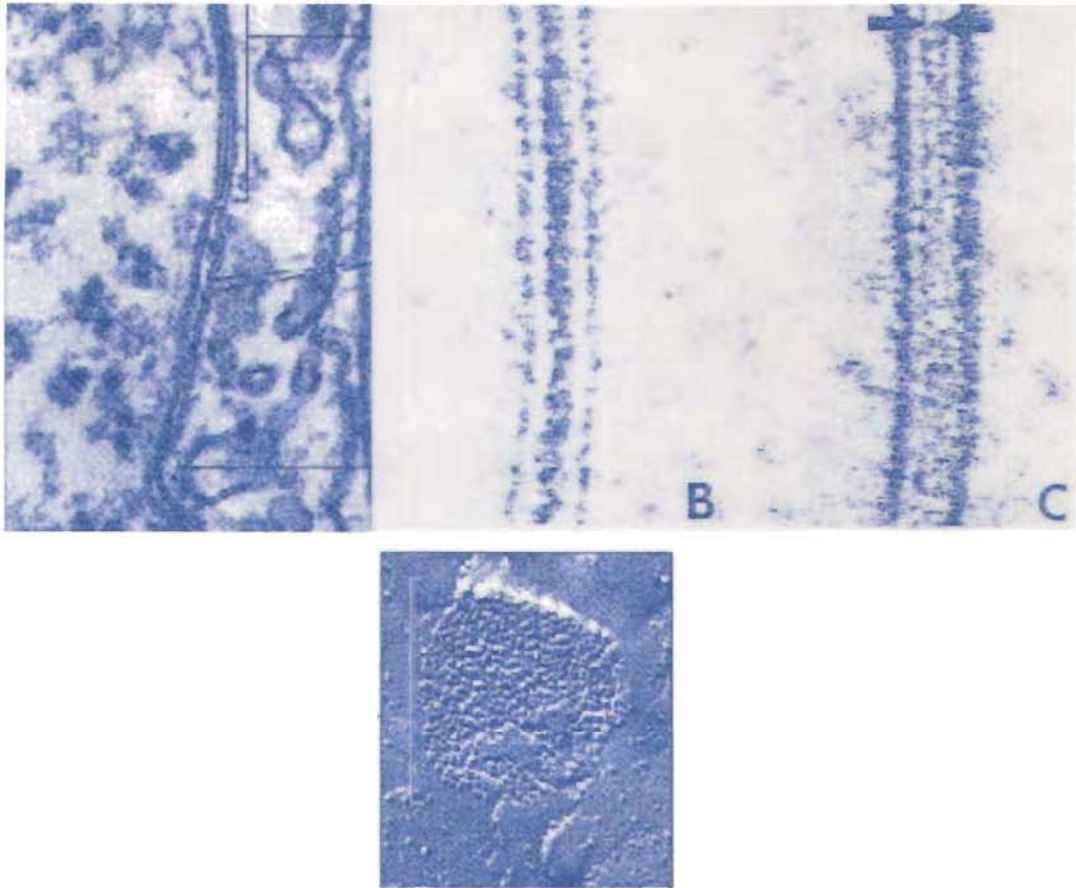


Figura 11.- En esta figura se muestran micrografías de secciones finas de cortes transversales de hígado. En A, puede observarse la extensión de las uniones comunicantes en dos células que se encuentran en estrecho contacto. En B, a una mayor amplificación, puede observarse que en la zona de aposición membranal hay una estructura pentalaminar, esto sucede cuando la preparación es procesada por tinción negativa. En C, puede observarse una fina sección y nuevamente un corte transversal que indica una zona de dos células en estrecho contacto, en donde puede apreciarse que con el método de tinción con uranil acetato se obtiene una estructura heptalaminar. En donde señalan las flechas se indica un espacio de 2-3 nm. En D, se observa una criofractura que muestra una placa de unión comunicante, la cual presenta las típicas prominencias que equidistan entre sí 9 nm.

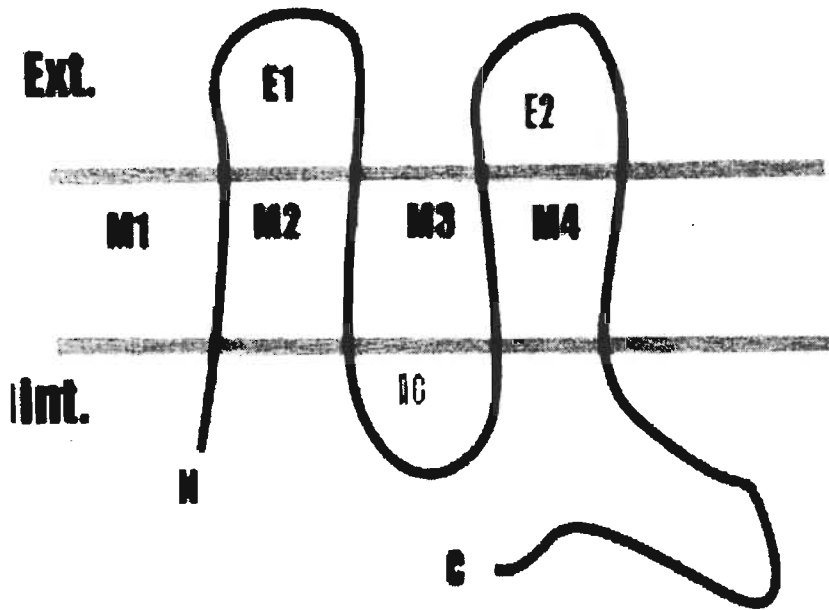
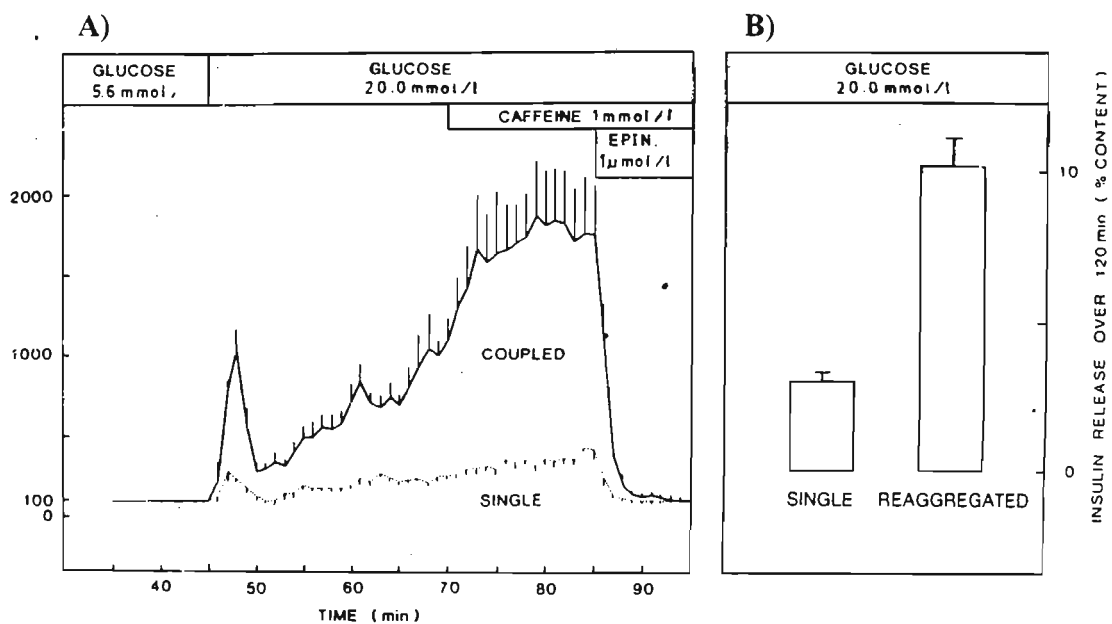
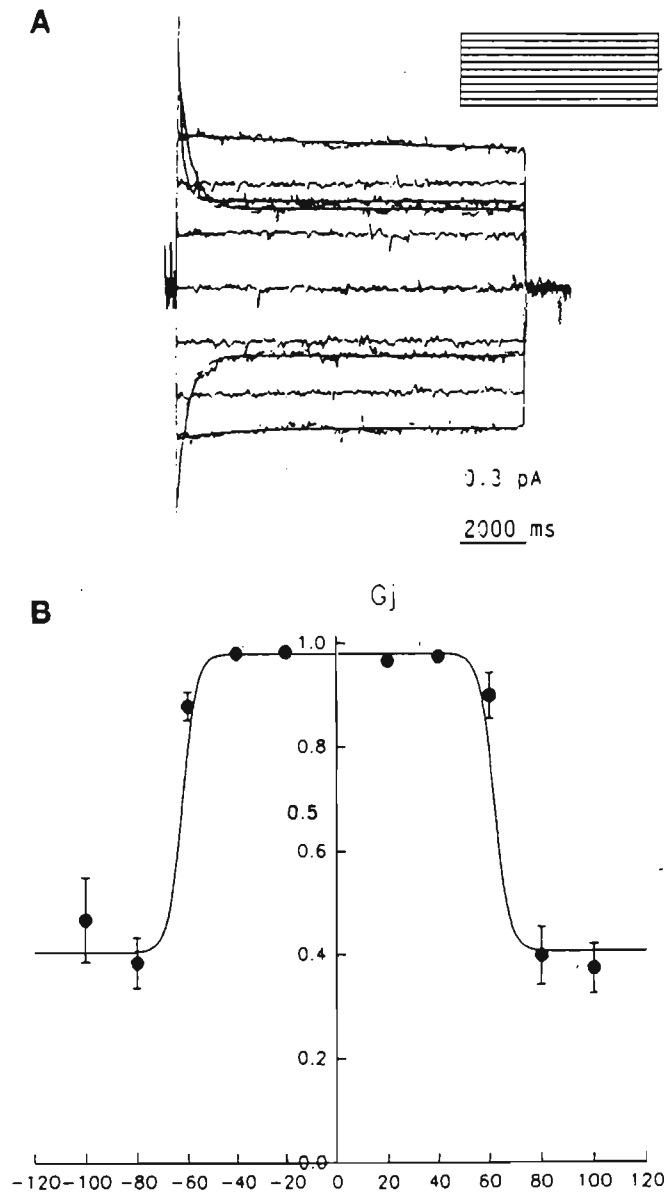


Figura 12.- Diagrama esquemático que muestra la forma en la que las subunidades proteicas llamadas conexinas se encuentran dispuestas en la membrana. De acuerdo a los datos obtenidos por distintos tipos de análisis de su secuencia de sus aminoácidos, se sabe que las conexinas atraviesan cuatro veces la membrana y presentan los sitios carboxilo y amino terminal en el citoplasma. Adicionalmente presentan una asa citoplasmática y dos asas extracelulares además de cuatro regiones transmembranales.



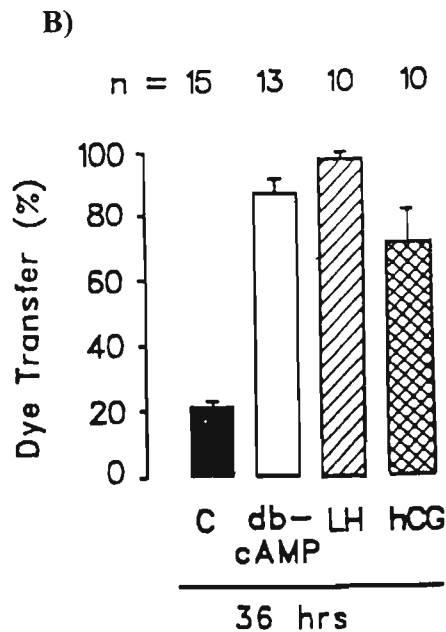
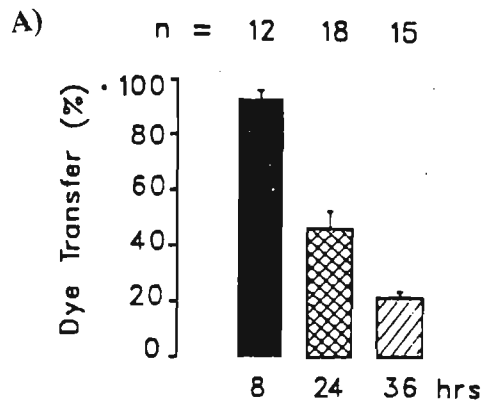
(Tomado de Peepelers et al., 198)

Figura 13.- En el presente diagrama se muestra una gráfica en (A), e indica la liberación de insulina en las células beta del páncreas, inducida por la estimulación con glucosa en células que han sido disociadas y aisladas (single) ó en las mismas células una vez que se han reagregado y re-establecido en sus contactos intercelulares (coupled). En (B) se muestra gráficos los cuales indican que el porcentaje de la eficiencia secretoria es mayor en células reagregadas en comparación con las células aisladas.



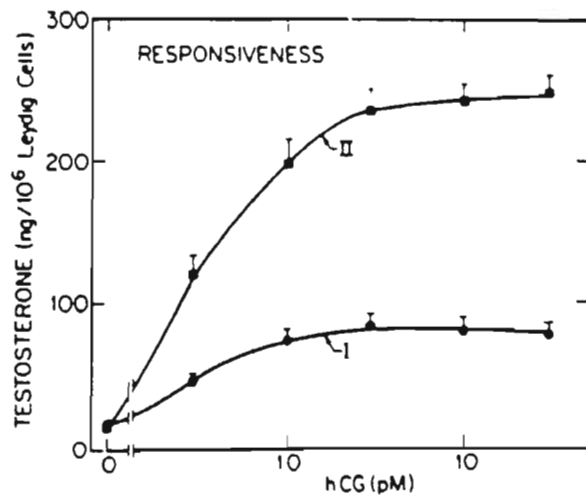
(Tomado de Pérez-Armendariz et al., 1994)

Figura 14.- En A se muestran los registros de las corrientes que pasan a través de los canales de unión comunicante, evocados al estimular dos células acopladas de Leydig con pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes obtenidos por el método de doble fijación de voltaje en células pares. En B, con los datos obtenidos a partir de estos registros, fue posible construir graficas de las conductancias estacionarias normalizadas vs el voltaje en mV, en donde se muestra que la conductancia se modula a estímulos que oscilan entre los ± 80 y ± 50 mV.



(Pérez-Armendariz et al., 1996)

Figura 15.- Las gráfica A muestra como el porcentaje de comunicación intercelular (CI) decrece en condiciones de no estímulo después de 24 y 36 horas de iniciado el tiempo de cultivo de las células de Leydig. En B se muestra el porcentaje de CI de cultivos células de Leydig en presencia de las hormonas LH/ hCG o del AMPc, después de 36 horas de iniciado el tiempo de cultivo. En ésta última puede observarse como la presencia de los principales agonistas de las células de Leydig o de sus segundos mensajeros, evitan el decremento de la comunicación intercelular.



(Payne et al., 1980)

Figura 16.- En la siguiente gráfica puede observarse que al purificar y separar dos poblaciones con diferente gradiente de densidad, éstas mantienen una funcionalidad distinta, pues responden de manera desigual a la máxima estimulación con hCG (ver texto).

Tabla I FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL TESTÍCULO EN DESARROLLO (Modificado de Lamb, 1993).

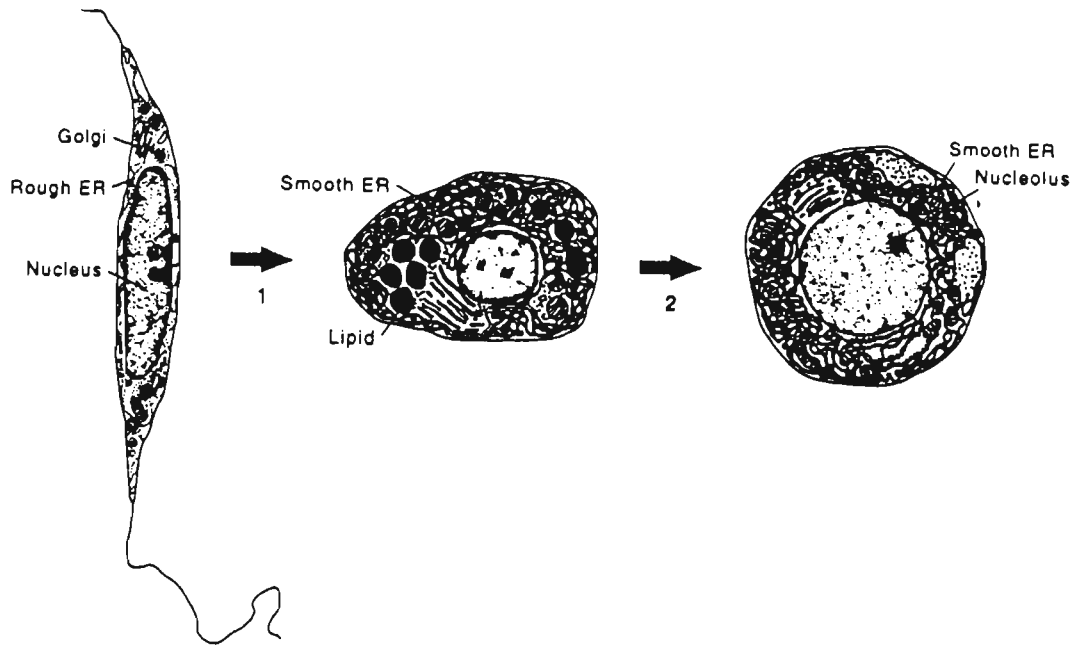
Factor de Crecimiento	Célula testicular que lo expresa	Célula testicular receptora	Función
Factor de crecimiento fibroblástico (Fibroblast growth factor)	homogenado de testículo de ratas inmaduras (prepúber). Espermatoцитos en paquiteno	No se conoce	Incrementa la proliferación de las células de Sertoli inmaduras in vivo y in vitro. Incrementa la síntesis de testosterona inducida por LH
Factor de crecimiento similar a la insulina. (IGF-1)	Células de Sertoli de 14 dpp. Células de Leydig de 14 dpp. Después de la tercera semana decrece la inmunoreactividad. Se expresa también en los espermatoцитos y espermatoцитos	Células de Leydig/células de Sertoli	Incrementa la síntesis de testosterona inducida por LH de células de Leydig inmaduras. Incrementan la proliferación de células de Sertoli inmaduras.
Factor de crecimiento neuronal β (Nerve growth factor β)	Espermatidas/espermatoцитos en preleptoteno	Células germinales	Posiblemente promueve la espermatogénesis/ puede ser un importante factor de proliferación en células premeióticas.
Activina	Células de Leydig/ Células de Sertoli	Células germinales	Ha sido implicada en eventos de proliferación y diferenciación de los gonocitos y espermatoгонias
Factor de crecimiento epidermal. (Epidermal Growth factor)	Células de Sertoli	No se conoce	La sialodectomía (lo cual remueve la fuente de este factor) induce un decremento del 50% en la producción de espermátidas. La administración de este factor restaura los niveles normales de la espermatogénesis.

Tabla 11.- Diferencias morfológicas y funcionales entre las células de Leydig fetales y de la población adulta en el ratón.

Pelliniemi et al., (1996); Huhtaniemi, (1994) Rusell, (1996)

Aspectos morfológicos y funcionales de las células de Leydig.	Células fetales	Células población adulta
Desregulación de los receptores de LH por estimulación crónica con LH/hCG	No se presenta	Se presenta
Producción de testosterona	Si ,5 veces mas producción que en el adulto	Durante la etapa neonatal y durante el estado adulto.
Forma corta o completa del receptor a LH	Predomina la forma corta entre el día E13 y E14	En el adulto predomina la forma completa.
Regulación por LH o hCG	Sólo al término del día de gestación	A partir del día 20 dpp
Mecanismo de retroalimentación entre la testosterona y la LH	No se tiene evidencia	Se tiene evidencia a partir del día 20 dpp
Receptor a los andrógenos	No se tiene evidencia	Se expresa a partir del día 21 dpp
Tipo de asociación	Se encuentran como grupos dispersos	En la etapa adulta predominan en el intersticio
Inclusiones lipídicas	Si	Si

TABLA III.- Caracterización morfológica y funcional del linaje de las células de Leydig adultas durante el desarrollo en rata. (Hardy et al., 1989; Rev: Benton et al., 1999)



Atributos celulares	Células de Leydig progenitoras	Células de Leydig Inmaduras	Células de Leydig Adultas
Actividad mitótica	Alta	Se divide solo una vez	Probablemente ninguna
Morfología	Fusiforame	Redonda con gotas de lípidos	Redonda sin gotas de lípidos
Reticulo endoplásmico liso	Baja	Alta	Más alta
Síntesis de testosterona	Baja	Intermedia	Alta
Edad a la que es típica	21 días	35 días	90 días
Número de receptores a LH	Bajo	Intermedio	Alto
Número de receptores a los andrógenos	Alto	Alto	bajo

(Tomado de Benton et al., 1995)

Resumiendo, los estudios anteriormente señalados demuestran la importancia de la Cx43 para el desarrollo del testículo durante el periodo fetal y prepuberal. No obstante, no existía información sobre la posible expresión de la Cx43 en el testículo de ratón, antes del periodo de la pubertad. De ahí que se desconocen los mecanismos moleculares específicos de cómo la falta de esta conexina induce estas alteraciones. Dada la falta de información al respecto, en la presente tesis nos planteamos el contestar sin ambigüedad las siguientes preguntas: ¿Cual es la etapa más temprana en el desarrollo testicular en la cual se expresa la Cx43? ¿Se expresa la Cx43 durante en el periodo fetal, neonatal y prepuberal? y en caso de que esto ocurra, ¿ En que tipos celulares testiculares se expresa esta conexina? ¿Se regula su expresión durante las etapas previas a la pubertad? si es así ¿en que tipos celulares ocurre esta regulación? y finalmente ¿Existe in vivo una correlación entre la expresión de la Cx43 con los cambios funcionales testiculares?

Hipótesis

1. Dado que el testículo fetal de los ratones deficientes en el gen que codifica para la Cx43 presentan alteraciones en su tamaño y en el número de células germinales, es posible que la Cx43 se exprese en las células del cordón testicular durante este periodo.
2. Dado que la Cx43 se expresa abundantemente entre las células de Leydig adultas funcionales y que las células de Leydig fetales también son funcionales, es posible que la Cx43 se exprese en ellas durante el periodo fetal.
3. La Cx43 se expresa en las células del túbulo seminífero durante la etapa prepuberal. Dado que existen evidencias de que la Cx43 se expresa entre las células de Sertoli adultas del ratón y que existen antecedentes de que la deficiencia de este gen previene la proliferación de las células germinales después del nacimiento en esta especie, es posible hipotetizar que esta conexina se expresa durante el periodo neonatal cuando inicia la proliferación germinal postnatal. La expresión de la Cx43 en el testículo neonatal no ha sido estudiada. En la presente tesis se aborda este aspecto.
4. Dado que la comunicación intercelular y la expresión de la Cx43 en las células de Leydig es reguladas *in vitro* por la LH y el que la expresión de esta hormona presenta fluctuaciones durante la ontogenia del ratón, es factible que la expresión de la Cx43 en las células de Leydig también sea regulada *in vivo* durante el desarrollo embrionario y postnatal.

OBJETIVOS:

- 1. Investigar la etapa más temprana en el desarrollo testicular en la cual se expresa la Cx43.**
- 2. Investigar el patrón de expresión de la Cx43 en el testículo en el periodo fetal, neonatal y prepuberal por el método de inmunofluorescencia indirecta en criosecciones de testículo.**
- 3. Investigar la distribución célula-específica de la Cx43 en el testículo durante los periodos de desarrollo mencionados en el punto anterior.**
- 4. Investigar la posible regulación de la expresión de la Cx43 en el cordón seminífero durante los periodos del desarrollo fetal, neonatal y pre-puberal.**
- 5. Investigar si la expresión de la Cx43 en las células de intersticiales de Leydig es regulada durante el desarrollo fetal, neonatal y prepuberal.**
- 6. Investigar si los cambios en la concentración de testosterona intratesticular que ocurren durante el desarrollo están asociados a los cambios en la expresión de la Cx43 en las células de Leydig.**

7. METODOS.

Ver descripción contenida en los artículos

Developmental Regulation of Connexin 43 Expression in Fetal Mouse Testicular Cells

E. MARTHA PÉREZ-ARMENDARIZ,^{1,5*} EDMUNDO LAMOYI,²
J. IAN MASON,³ DAVID CISNEROS-ARMAS,¹ VAN LUU-THE,⁴ AND
J. FRANCISCO BRAVO MORENO¹

¹Departamento de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, (UNAM) México, D. F., 04510

²Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D. F., 04510

³Department of Reproductive & Developmental Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland, United Kingdom

⁴Laboratory of Molecular Endocrinology, CHUL Research Center, Québec, Canada

⁵Unidad de Salud Reproductiva, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Hospital General de México, Mexico, D.F., 06726

ABSTRACT

Multiple connexins have been identified in testicular cells. Several lines of evidences indicate that, among them, connexin 43 (Cx43) may be unique for control of gonad development and spermatogenesis. To date, however, it is not known whether Cx43 is expressed in the fetal testis and what possible types of cellular interactions mediated by this connexin are critical to male fertility. In the present work, expression of Cx43 was investigated at various developmental ages in cryosections from mouse testis by using specific antibodies against Cx43. In serial or double-labeled sections, Cx43 localization was compared with immunocytochemical distribution of steroidogenic enzyme, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD), Mullerian inhibitory hormone (MIH), and germinal nuclear cell antigen (GCNA1), which are specific markers, respectively, of interstitial Leydig, Sertoli, and germinal cells. Sections were analyzed by fluorescence microscopy. We found that Cx43 immunofluorescence (IF) was uniformly distributed in the undifferentiated gonad at 11.5 days post coitus (dpc) and in cells of the mesonephric tubules. In the undifferentiated gonad, Cx43 was localized between primordial germ cells and somatic cells. At 12.5 dpc, when the gonad has undergone sexual differentiation, in the interstitium Cx43 was localized in Leydig cells and in the seminiferous cord it was localized between adjacent Sertoli cells. In Leydig and Sertoli cells, Cx43 labeling increased at 14.5, 16.5, and 18.5 dpc. From day 12.5 up to 18.5 dpc, Cx43 was also localized in cell borders between germinal and Sertoli cells. In conclusion, this study demonstrates that from the earliest stages of gonadal development, Cx43 is expressed in the principal cell types that participate in the control of male fertility. It also shows that Cx43 expression in Leydig and Sertoli cells increase during fetal life. Finally, it provides evidence that, throughout embryonic life, Cx43 forms gap junctions between Sertoli and germinal cells. *Anat Rec* 264:237–246, 2001. © 2001 Wiley-Liss, Inc.

Key words: gonad; development; Leydig; Sertoli; germinal; differentiation; proliferation; secretion; connexin43; fetal testis

Gap junctions are conglomerates of intercellular gap junction channels. Gap junction channels allow the transfer between adjacent cells of ions and second messengers such as Ca²⁺ (Saéz et al., 1989) and cAMP (Tsien and Wiengart, 1974; Murray and Fletcher, 1984), and possible morphogens. Connexins are the protein subunits of gap junction channels. In rodents, connexins are encoded by a family of at least 15 genes. Homomeric and heteromeric gap junction channels formed with this family of connexins show specific functional properties (Bukauskas et al., 1995; Oh et al., 1999; Elenes et al., 1999).

Grant sponsor: CONACYT; Grant number: 26789N; Grant sponsor: DGAPA-UNAM; Grant numbers: IN220197; IN231799 (México); Grant sponsor: MRC (UK); Grant number: G0000066.

*Correspondence to: Dr. E. Martha Pérez-Armendariz, Unidad de Salud Reproductiva, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Hospital General de México, Mexico, D.F., 06726. E-mail: eperez@servidor.unam.mx

Received 18 December 2000; Accepted 29 June 2001

Published online 4 October 2001; DOI 10.1002/ar.1164

Previous studies have documented the presence of gap junctions between fetal testicular cells (Nagano and Suzuki, 1978), but their molecular identity remains unknown. In adult rodent testis, 12 connexins (Cx) have been described by Northern blot (Zhang and Nicholson, 1989; Kadle et al., 1991; Haefliger et al., 1992; Hennemann et al., 1992; Dahl et al., 1996; Mok et al., 1999; Manthey et al., 1999) and by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) studies (Risley, 2000). Specific spatial distribution of Cx26, Cx31, Cx32, Cx33, Cx37 and Cx43 within the testis and the seminiferous tubule has been determined by immunofluorescence (IF) (Risley et al., 1992; Tan et al., 1996; Mok et al., 1999). Several lines of evidence indicate that, among these connexins, Cx43 may be critical for gonadal development and adequate control of fertility. Cx43 is the only connexin known to be expressed in adult Leydig cells, by using immunologic (Risley et al., 1992; Pérez-Armendariz et al., 1994; Tan et al., 1996; Mok et al., 1999; Steger et al., 1999; Batias et al., 1999) and electrophysiological studies (Pérez-Armendariz et al., 1994, 1996). In the mouse, its expression during postnatal development is modulated in a biphasic manner and is correlated with changes in intratesticular testosterone content (Bravo Moreno et al., 2001). Alterations in spermatogenesis in both human (Steger et al., 1999) and mouse have been found to be associated with a decrease in Cx43 expression in adult Sertoli cells (Batias et al., 1999). Transgenic knock out (KO) mice for Cx31, Cx32, Cx40, Cx46, and Cx50 show apparent normal fertility (Willecke et al., 1999), whereas Cx43-deficient mice (Reaume et al., 1995) show a severe decrease in germinal cell number during embryonic life (Juneja et al., 1999). Moreover, the substitution of the coding region of the Cx43 gene by coding sequences of Cx40 or Cx32 is not sufficient to prevent the decrease in germinal cells, and the remaining gonocytes detected after birth do not differentiate to secondary spermatogonia (Plum et al., 2000). Recently, we found that Cx43 forms intercellular contacts between mouse germinal and Sertoli cells in newborns and at the time of initiation of spermatogenesis (Bravo Moreno et al., 2001), which may explain, at least in part, the loss of spermatogenesis in Cx43-deficient mice. Here, we address whether Cx43 is expressed in mouse embryonic testicular cells. The results presented here demonstrate that Cx43 is expressed and modulated in the main cell types that participate in the control of male fertility during embryonic life. We also show that Cx43 forms heterocellular contacts between Sertoli and germinal cells throughout fetal life. The possible functional significance of these interactions and their changes during embryonic life is also discussed.

METHODS

Animals

CD1 mice were maintained and handled in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, as promulgated by the Society for the Study of Reproduction. Female breeders showing a vaginal plug the next day after mating were considered to be at day 0.5 of pregnancy. Animals were anesthetized with CO₂ and then killed by decapitation. Testes were microdissected, embedded in Tissue Tek, immersed in cryopreservative, and frozen in liquid nitrogen.

Antibodies

Two previously characterized rabbit polyclonal antisera against unique peptide sequences of Cx43 were used (Bravo Moreno et al., 2001). Briefly, one was an affinity purified antibody from Zymed (San Francisco, CA; catalog no. 71-0700). The second was antiserum F100, generated in our laboratory against a highly purified synthetic peptide corresponding to the specific sequence of amino acids (aa) 346 to 363 of mouse Cx43 carboxy terminus [Cx43 (346-363)]. A third antibody used was a monoclonal anti-Cx43 MAB3068, generated against another specific sequence (aa 252-270) of Cx43 (Chemicon, Temecula, CA). All three antibodies against Cx43 recognize characteristic bands of 40-45 kDa after Western immunoblotting of proteins from homogenates of testis and heart, and of HeLa cells transfected with Cx43 but not with Cx40 or the transfection vector itself (Bravo Moreno et al., 2001). Two different specific polyclonal antibodies against the steroidogenic enzyme 3 β HSD, a marker of Leydig cells, were used (Dupont et al., 1993; Keeney et al., 1993). A previously characterized polyclonal antibody against Mullerian inhibitory hormone (MIH), a marker of Sertoli cells (Rey et al., 1996), and a monoclonal IgM antibody against a mouse germ cell nuclear antigen (GCNA1) (Enders and May, 1994) were also used.

Immunocytochemical Localization of Cx43, 3 β HSD, MIH, and GCNA1 Antigens

Cryosections of 10–12 μ m were processed as previously described (Pérez-Armendariz et al., 1994). Briefly, sections were fixed in 70% ethanol at -20°C; rinsed with phosphate buffer saline (PBS), pH 7.3, 1 mM CaCl₂, and preincubated in 2% albumin IgG-free, 0.1% Triton X-100 in PBS. For single labeling, tissue sections were incubated with antibody 71-0700 (1:100), F100 (1:250), or anti-3 β HSD (1:100) for 1 hr at room temperature. After washing in PBS, tissue sections were incubated with FITC-goat anti-rabbit IgG for 1 hr at room temperature, washed, and mounted by using a fluorescence protector medium (Vecta Shield, Burlingame, CA), observed under phase contrast and fluorescence microscopy (Olympus-1X70) and photographed. For double-labeling experiments, tissue sections were incubated overnight at 4°C with polyclonal antibodies against 3 β HSD or MIH (1:100) or with undiluted supernatant containing monoclonal antibody against GCNA1. Sections were then washed and incubated for 1 hr with FITC-labeled goat anti-rabbit IgG or anti-mouse IgM (Zymed), respectively. Sections were washed again and incubated for 2 hr with MAB3068 against Cx43 (1:100). After washings, tissue sections were incubated with rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG (Pierce, Rockford, IL) for 1 hr. The same field of the section was analyzed sequentially under fluorescein and rhodamine excitation filters. Monochromatic digitized images at each excitation wavelength were obtained by using a Hamamatsu digital camera (ORCA) and Metamorph software (Universal Imaging, West Chester, PA). By using the same software, images were superimposed and color encoded automatically. Green was used to color fluorescence emitted by 3 β HSD- or MIH-labeled cells. Red was used to color fluorescence emitted by Cx43 and blue was used to color fluorescence emitted by GCNA1-labeled cells. Photomicrographs of images shown for each developmental

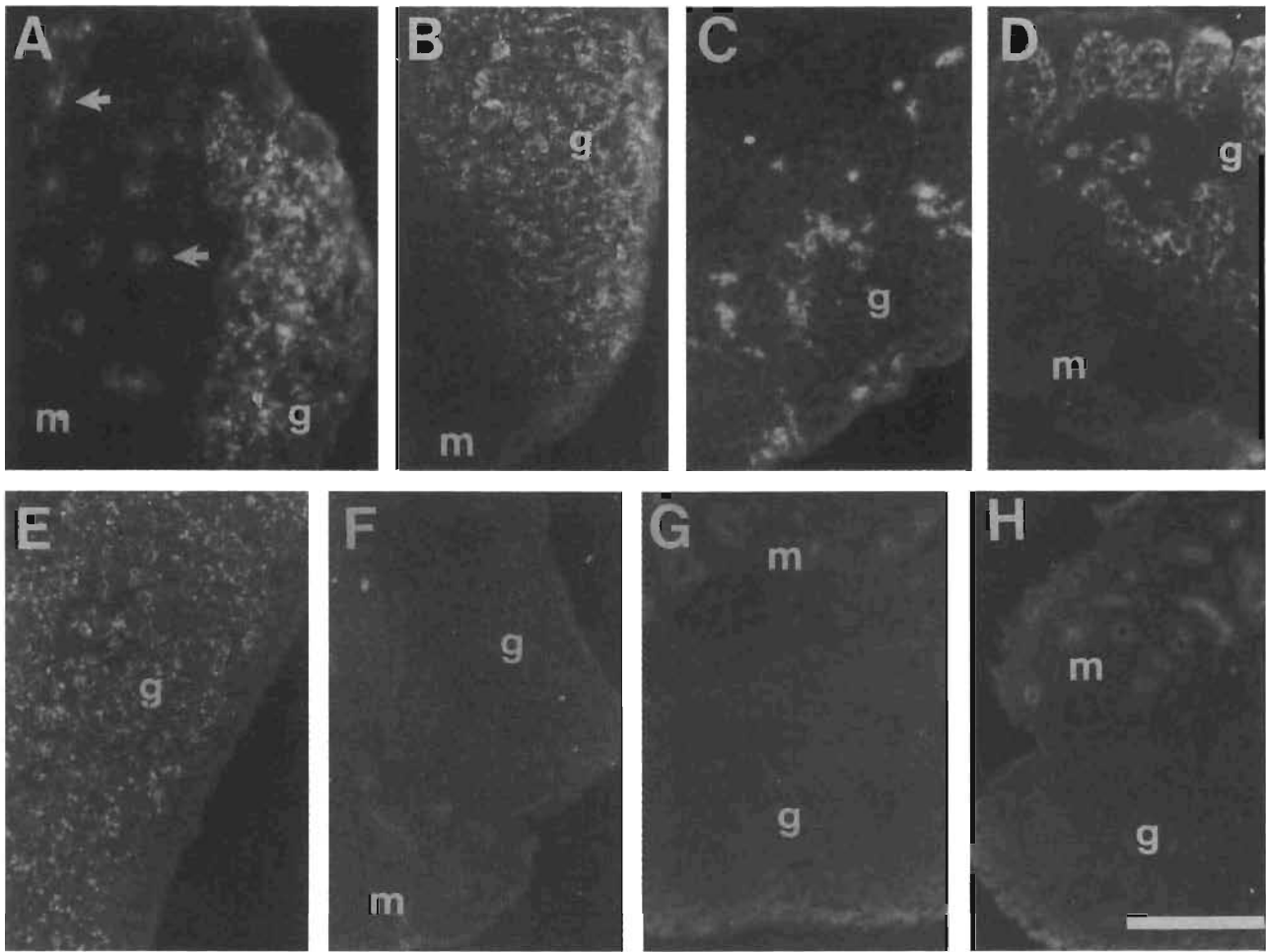


Fig. 1. Connexin43 (Cx43) is expressed in precursors and differentiated Sertoli and Leydig cells. Fluorescent photomicrographs of sections from fetal mouse testis obtained after incubation with two specific polyclonal antibodies against Cx43: (A,B) 71-0700, and (E) F100, with a (C) polyclonal antibody against 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD) (Dupont et al., 1993) and (D) with a polyclonal antibody against Mullerian inhibitory hormone (MIH) (Rey et al., 1996). A: At 11.5 days post coitum (dpc), Cx43 is uniformly distributed in the undifferentiated gonad (g). In the mesonephros (m), tiny Cx43-punctate immunofluorescent (IF) dots are also localized in cells from the mesonephric tubules (arrows). At

12.5 dpc, Cx43 labeling has a similar distribution and is found uniformly distributed in the gonad (g) after its incubation with 71-0700 (B) or F100 (E) anti-Cx43 antibodies. At 12.5 dpc, male differentiation was documented by identification of cells positive for (C) 3 β HSD, a marker of Leydig cells, and for (D) MIH, which is a marker of Sertoli cells. No punctate Cx43 labeling was detected in testicular sections incubated with (F) FITC-secondary antibodies alone, (G) preimmune serum F100, or (H) antiserum F100 preadsorbed with the antigenic peptide Cx43 (346-363). Scale bar = 75 μ m in A-H.

age are representative of observations obtained from at least six different animals.

RESULTS

To investigate whether Cx43 is expressed in fetal testis, we used three different antibodies directed against unique sequences of Cx43 carboxy terminus. These antibodies (polyclonal F100 and 71-0700, and monoclonal MAB3068) have been shown previously by immunoblotting and IF to be highly specific for Cx43 (Bravo Moreno et al., 2001).

Mouse gonad forms at 11.5 days post coitus (dpc) (reviewed in Merchant-Larios and Moreno Mendoza, 1996). Cx43 is expressed at the very earliest stages of gonadal development. As shown in Figure 1A at 11.5 dpc, small Cx43 IF dots were found in cells from the mesonephric tubules and were uniformly distributed throughout the

undifferentiated gonad. By using two polyclonal anti-Cx43 antibodies, the same Cx43 distribution was found in gonads from 16 different embryos, suggesting that, at this developmental stage, the pattern of Cx43 expression is independent of the animal's sex. At 12.5 dpc, male differentiation was evidenced by identification of 3 β HSD (Fig. 1C) and MIH (Fig. 1D), which are, respectively, markers of Leydig and Sertoli cells. In parallel sections marked with the antibodies 71-0700 (Fig. 1B) and F100 (Fig. 1E), Cx43 labeling was found to be uniformly distributed in the gonad. The specificity of Cx43 labeling was further confirmed, because no labeling was detected in testicular sections incubated with FITC-secondary antibodies alone (Fig. 1F), preimmune serum F100 (Fig. 1G), or with antiserum F100 preadsorbed with the antigenic peptide Cx43 (346-363) (Fig. 1H).

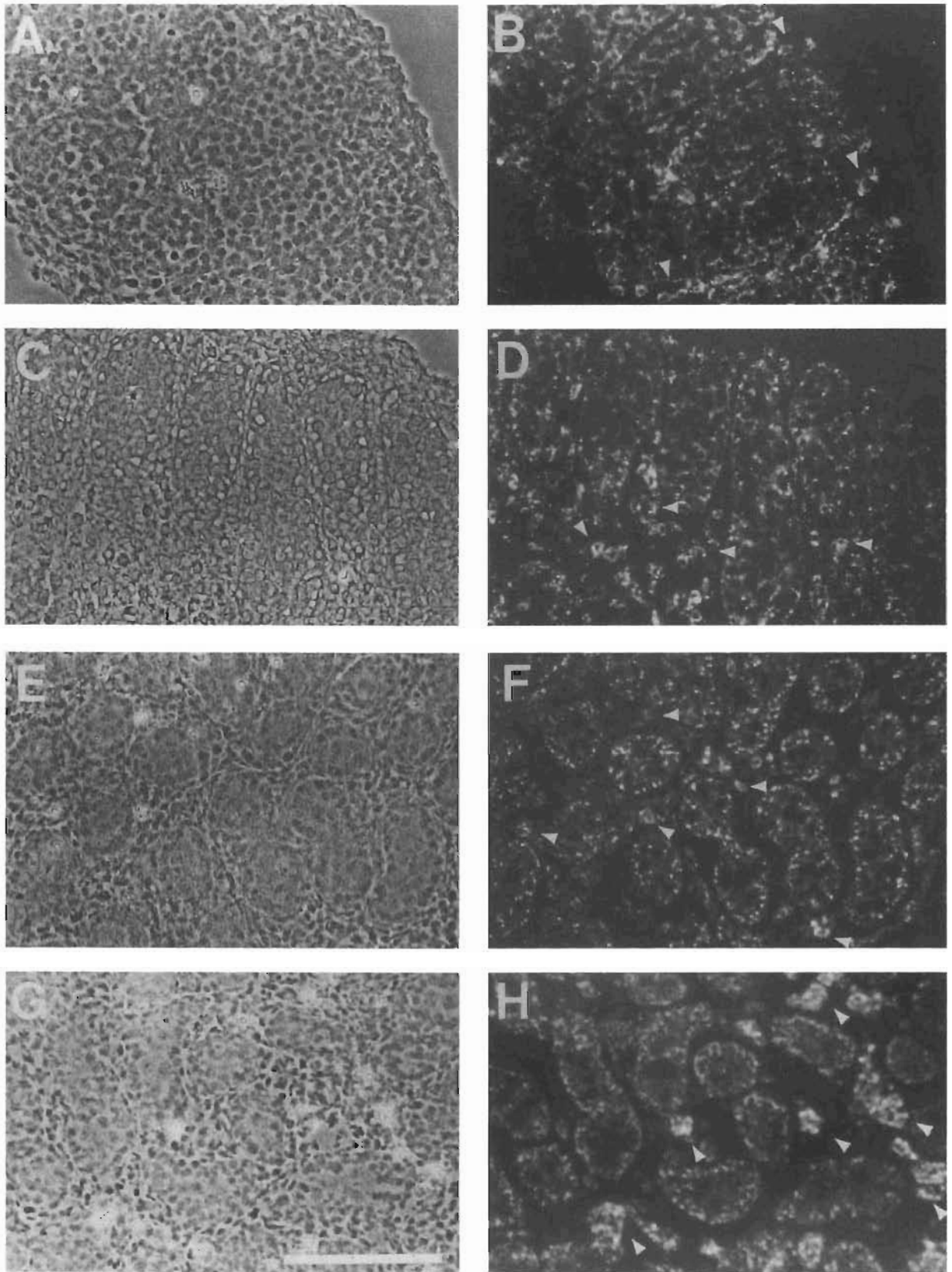


Fig. 2. Expression of connexin 43 (Cx43) in the interstitial space increases during fetal development. Phase contrast (A,C,E,G) and fluorescent (B,D,F,H) photomicrographs of testicular sections obtained after incubation with anti-Cx43 antibody 71-0700. *Interstitial*. **A,B:** At 13.5 dpc, Cx43 immunofluorescent (IF) labeling is found in spindle-shaped interstitial cell clumps that surround the seminiferous cords (arrowheads). **C,D:** At 14.5 and **(E,F)** 16.5 dpc, there is a progressive increase in the size of interstitial Cx43-positive cell aggregates (arrowheads),

reaching a maximum at **(G,H)** 18.5 dpc, at the end of embryonic life. **E,G:** Under phase contrast, Cx43-positive labeled clumps show lipid droplets. As the size of the cell clumps increases, lipid droplets become more apparent and Cx43-IF labeling becomes more intense. *Seminiferous cords*. **A,B:** At 13.5 dpc, **(C,D)** 14.5 dpc, **(E,F)** 16.5, and **(G,H)** 18.5 dpc, Cx43-IF dots are detected in the periphery as well as in the center of the seminiferous cords. Scale bar = 150 μm in A-H.

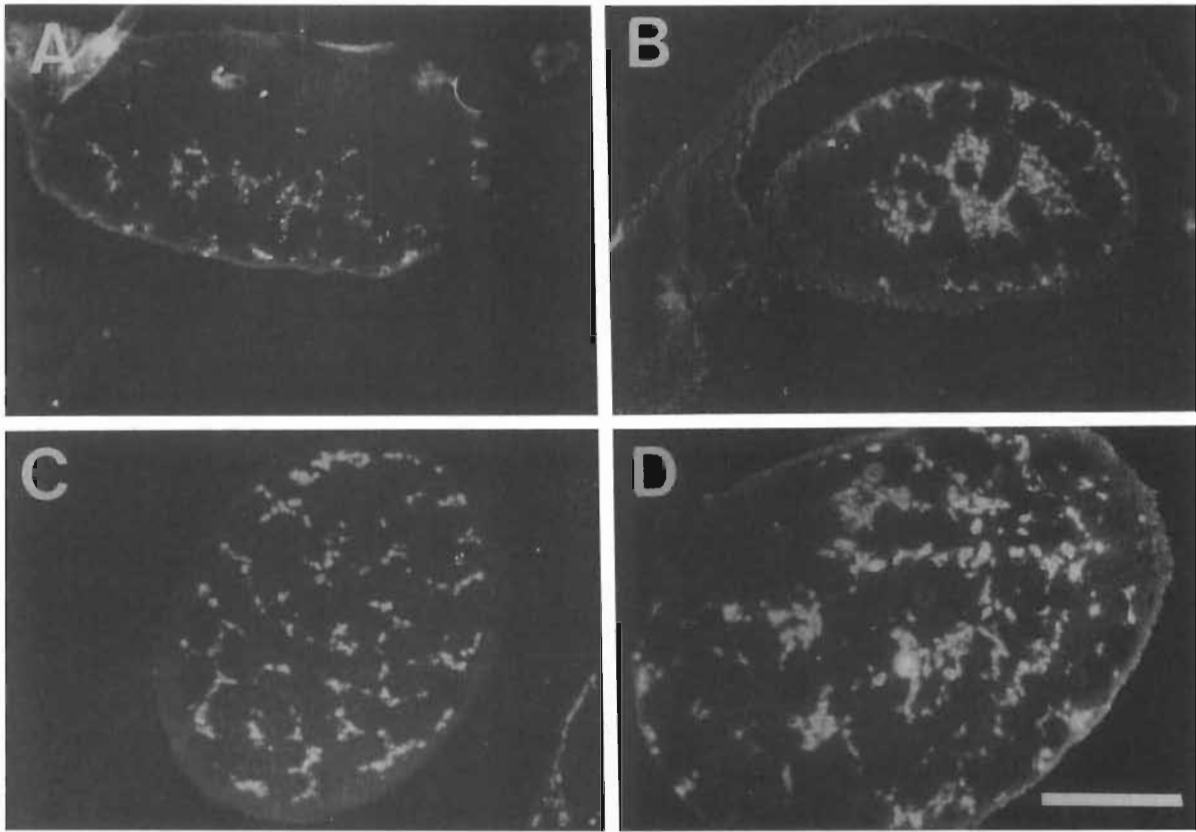


Fig. 3. Increase in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD) expression during fetal development. Fluorescent photomicrographs of testicular sections obtained with antibody against 3 β HSD (Dupont et al., 1993). **A:** At 12.5 days post coitum (dpc), cell clusters and isolated 3 β HSD-positive cells are already found. **B:** At 14.5 dpc, the number and

size of 3 β HSD-positive cell aggregates increase markedly, and particularly in the central part of the gonad. **C:** At 16.5 dpc, 3 β HSD-positive cells are uniformly distributed between the seminiferous cords of the gonad. **D:** At 18.5 dpc, the number and size of 3 β HSD-positive clumps reaches its maximum. Scale bar = 300 μ m in A–D.

Mouse Leydig cells contain abundant lipid droplets (Rev: Russell, 1996). Figure 2 shows that in the interstitium the number and size of Cx43-positive, spindle-shaped cell aggregates increased progressively from 13.5 (Fig. 2A,B) to 18.5 dpc (Fig. 2C–H). As the number of the cells in an aggregate increased, Cx43 labeling on them became more intense and, under phase contrast, cell lipid droplets became more apparent (Fig. 2C–H), suggesting that these cells correspond to Leydig cells. Consistent with this interpretation, Figure 3 shows that the number and size of 3 β HSD-positive cell aggregates were found to increase progressively from day 12.5 up to 18.5 dpc (Fig. 3A–D). Initially (12.5–14.5), a major increase in 3 β HSD-positive cells was found in the center of the gonad, and later (16.5–18.5) positive cells appeared to redistribute in the whole fetal testis. The temporal and spatial correlation between the number and size of cell clumps positive for Cx43 and 3 β HSD indicates that the increase in interstitial Cx43 results from its expression in Leydig cells. This finding was demonstrated in testicular sections by double labeling with anti-Cx43 MAB3068 and polyclonal anti-3 β HSD antibody. Figure 4 shows digitized images of testicular sections at 12.5 (A), 14.5 (B), 16.5 (C), and 18.5 dpc (D), where Cx43 was unambiguously localized in 3 β HSD-positive cells. Density of Cx43-IF dots in Leydig cells increased with age. Cx43 was not detected in other

neighboring cells (Fig. 4, asterisk). Nonetheless, in some sections, Cx43 was found at cell borders between 3 β HSD-positive and -negative cells (Fig. 4C arrow).

Gap junctions between Sertoli cells have been described at the end of embryonic life (Nagano and Susuki, 1978). Figure 2A–H shows that, from day 13.5 until 18.5 dpc, Cx43-IF dots were found at the periphery as well as in the center of the seminiferous cords. This distribution suggested that Cx43 is expressed between adjacent Sertoli cells as well as between Sertoli and adjacent germinal cells. This was further explored in testicular sections double labeled with MAB3068 against Cx43 and with polyclonal antibodies against MIH. Figure 5 shows testicular sections at 14.5 (A), 16.5 (B), and 18.5 dpc (C,D). At all ages, MIH-positive or Sertoli cells were found in the seminiferous cords. As age increases, a larger number of MIH-positive cells were localized at the periphery of the cords. Antibody against MIH also stained cytoplasmic projections that extend from Sertoli cells to the center of the seminiferous cord, surrounding MIH-negative cells, with large nuclei and prominent nucleoli characteristic of germinal cells (Fig. 5A,B,D). Cx43-IF-labeled cell borders between adjacent Sertoli cell bodies. Cx43-IF dot number increased with age (Fig. 5 arrows). Cx43-IF dots were also found in the Sertoli cell-cytoplasmic projections that surround central gonocytes or germinal cells (Fig. 5, arrow-

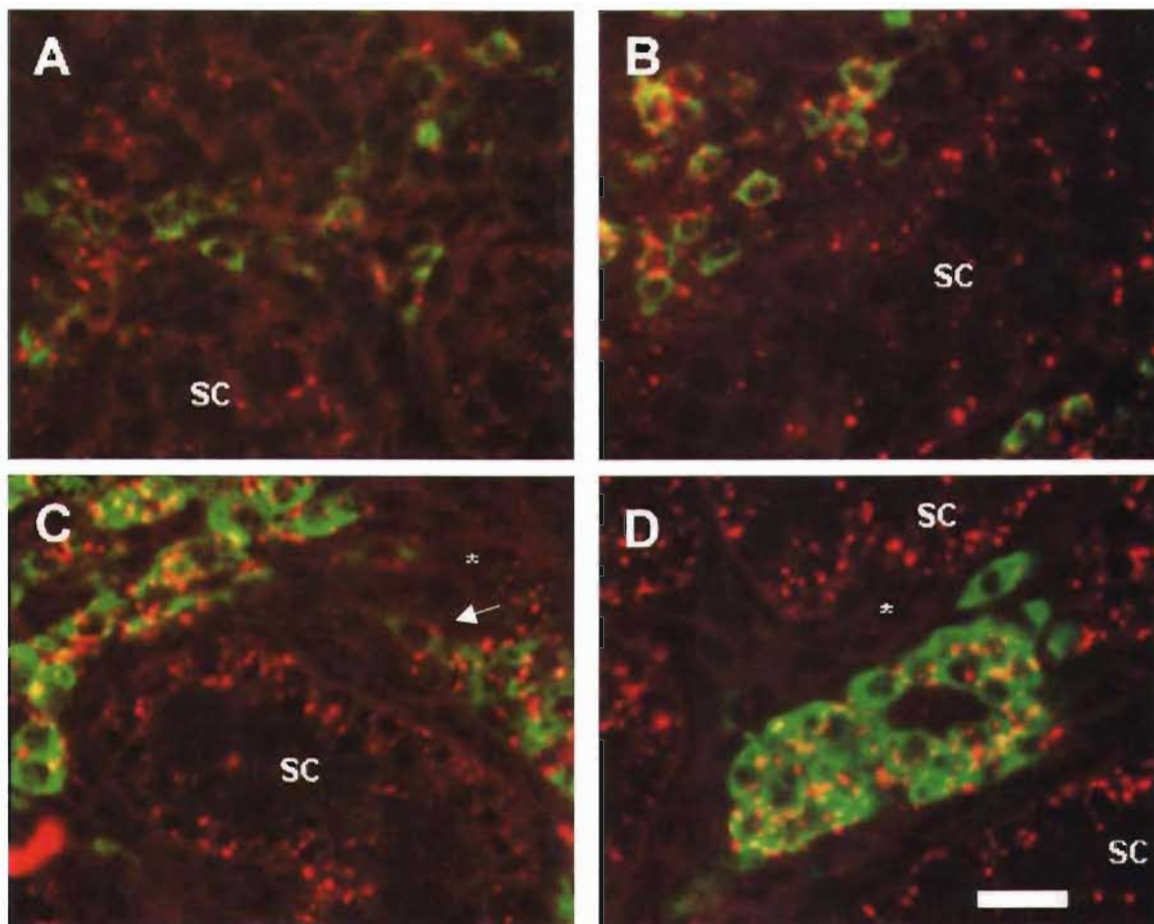


Fig. 4. Increase in connexin 43 (Cx43) labeling in the interstitial space results from its expression in Leydig cells. Digitized images obtained from testicular sections double labeled with monoclonal antibody against Cx43 MAB3680 (red) and with a polyclonal antibody against 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD) (green) (Keeney et al., 1993). At (A) 12.5, (B) 14.5, (C) 16.5, and (D) 18.5 days post coitum (dpc), Cx43-immunofluorescent dots are localized in the cytoplasm but mainly

at cell membrane appositions between adjacent 3 β HSD-positive cell clumps. No Cx43 labeling was detected in other interstitial cells surrounding 3 β HSD-positive clumps, probably mesenchymal and fibroblasts cells (asterisk). Nonetheless, in some sections (C), Cx43 was found at cell borders between 3 β HSD-positive and negative cells (arrow). Cx43 is also seen in 3 β HSD-negative cells from the seminiferous cords (SC). Scale bar = 30 μ m in A–D.

heads and inserts). Labeling at this last localization suggests that Cx43 may form gap junctions between Sertoli and germinal cells. To further investigate this possibility, parallel sections were double labeled with MAB3068 and a monoclonal antibody to GCNA1. From day 11.5 dpc, the number of germinal or GCNA1-positive cells increased (Fig. 6A). From day 14 dpc, GCNA1-positive cells were mainly distributed in the center of the seminiferous cord (Fig. 6C–E). Cx43 was localized between adjacent GCNA1-negative cells localized at the periphery of the seminiferous cord. Cx43-IF dots were also localized at cell borders between cells negatively and positively stained with antibody against GCNA1 (Fig. 6, arrowheads). This Cx43 localization was observed in the undifferentiated gonad at 11.5 dpc (Fig. 6A), at the earliest stages of sexual gonad differentiation on day 12.5 post coitus (Fig. 6B) and thereafter at 14.5, 16.5 (Fig. 6C,D) up to the end of embryonic life at 18.5 dpc (Fig. 6E). No apparent difference in the size or density of Cx43 IF-dots between germinal and Sertoli cells was detected during fetal life.

DISCUSSION

Various evidences indicate that Cx43 may be critical for control of spermatogenesis (Risley et al., 1992, Pelletier, 1996, Batias et al., 1999, Steger et al., 1999, Bravo-Moreno et al., 2001, Plumb et al., 2001). Data shown in the present study support the hypothesis that Cx43 plays other roles in gonadal development besides control of spermatogenesis because, by using highly specific antibodies (Bravo Moreno et al., 2001), it was demonstrated that (1) at 11.5 dpc, Cx43 mediates heterocellular contacts between precursor germ cells, identified with GCNA1 antibodies, and precursors of somatic cells, presumably pre-Sertoli cells; (2) after gonad sexual differentiation, there are Cx43-mediated contacts between germinal and Sertoli cells that remain throughout embryonic life; and (3) Cx43 is expressed between neighboring Sertoli cells and between adjacent interstitial Leydig cells from the earliest stage of testicular differentiation at 12.5 dpc and that, in both cell types, its expression increases during fetal life.

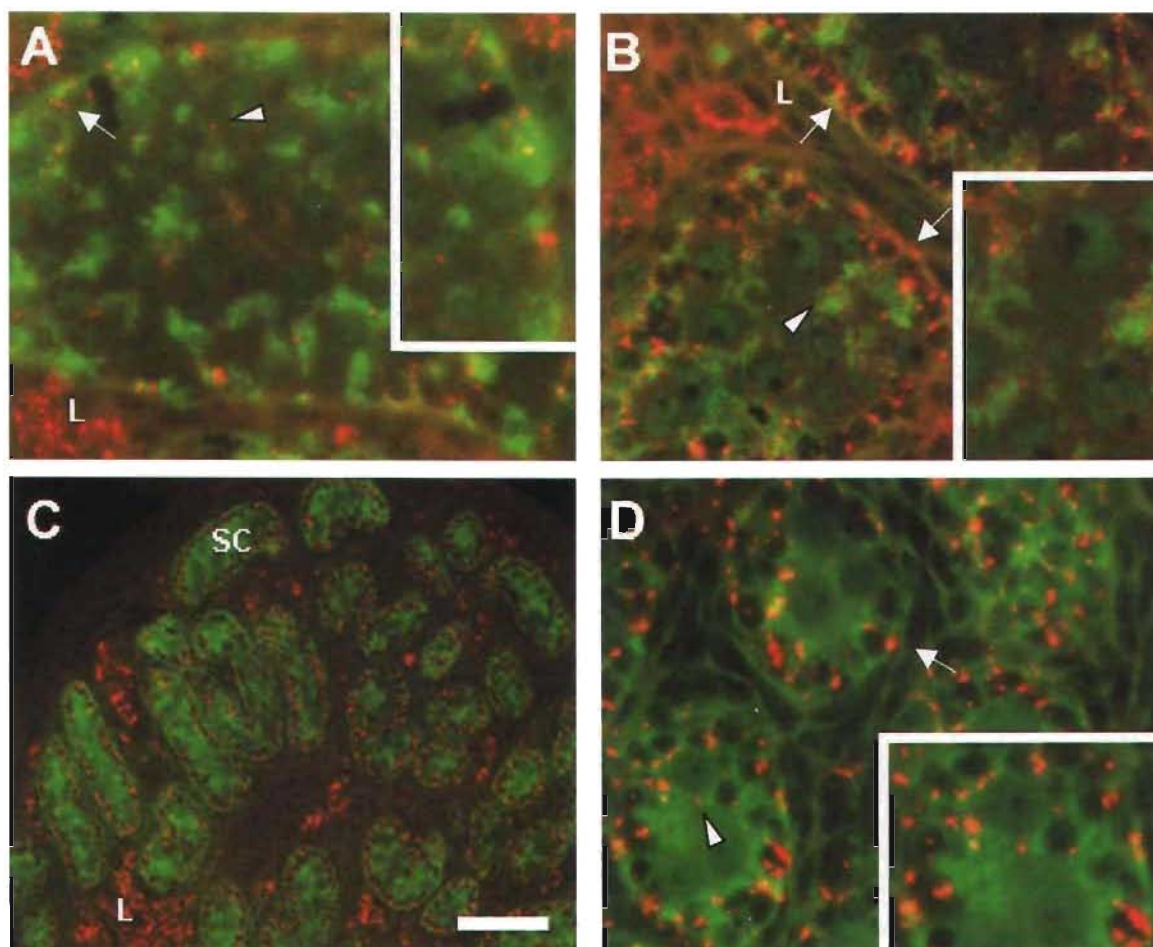


Fig. 5. Connexin 43 (Cx43) increases in Sertoli cells during fetal development. Digitized images obtained from fetal testicular sections double labeled with monoclonal antibody against Cx43 MAB3680 (red) and with antibodies against Mullerian inhibitory hormone (MIH) (bright green) at (A) 14.5, (B) 16.5, and (C,D) 18.5 days post coitum (dpc). As age increased, a larger number of MIH-positive cells were localized at the periphery of the cords (A,B,D). Antibody against MIH also stained cytoplasmic projections that extend from Sertoli cells to the center of the

seminiferous cord, surrounding MIH-negative cells, with large nuclei and prominent nucleoli characteristic of germinal cells (A,B,D). Cx43-labeled cell membrane appositions between adjacent Sertoli cell bodies; the number of Cx43-immunofluorescent dots increased with age (arrows). Cx43-IF dots were also found in the Sertoli cell-cytoplasmic projections that surround central gonocytes or germinal cells (arrowheads and insets). Scale bar = 30 μm in A,B,D, 16 μm in insets, 90 μm in C.

The enzyme $3\beta\text{HSD}$ is an essential component for the biosynthesis of all biologically active steroids, including androgens. Different isoforms of $3\beta\text{HSD}$ enzyme have been identified in mouse testes (Keeney et al., 1993). Neonatal testes only express the type I isoform, whereas adult testes express type I and type VI (Baker et al., 1999). It is likely that both isoforms are recognized by the two antibodies against $3\beta\text{HSD}$ used in the present study. We have previously found that antisera also detected $3\beta\text{HSD}$ -positive cells at different ages of postnatal development (Bravo Moreno et al., 2001). Immunoblot studies are required to confirm this aspect.

Connexin 43 has been found in guinea pig Leydig cells at the end of embryonic life (Pelletier, 1996). In the present study, we provide evidence suggesting that precursors of Leydig cells express Cx43. Moreover, we demonstrate that Cx43 is also expressed in mouse Leydig cells, at their earliest stage of differentiation at 12.5 dpc, and thereafter during fetal life. Increase in Cx43 expression in

the interstitium during embryonic life results from changes in its expression in Leydig cells, because it is temporally and spatially correlated with the increase in $3\beta\text{HSD}$ -labeled cells detected in parallel sections at all embryonic ages studied. Moreover, Cx43 was unambiguously localized in $3\beta\text{HSD}$ -positive cells in double-labeled sections at all fetal ages. Cx43-IF labeling was not detected in the other interstitial cells that surround $3\beta\text{HSD}$ -positive cells. However, detection of Cx43 at cell borders between negative and positive $3\beta\text{HSD}$ -positive cells raises the possibility that Leydig cells may form homomeric or heteromeric gap junctions with fibroblast, mesenchymal, or Leydig cell precursors.

Testosterone release during fetal life is critical for male differentiation. Intratesticular testosterone content increases progressively from day 14 dpc up to the end of embryonic life (O'Shaughnessy et al., 1998). In the present work, we demonstrated that, temporally correlated with this change, there is an increase in the number and size of

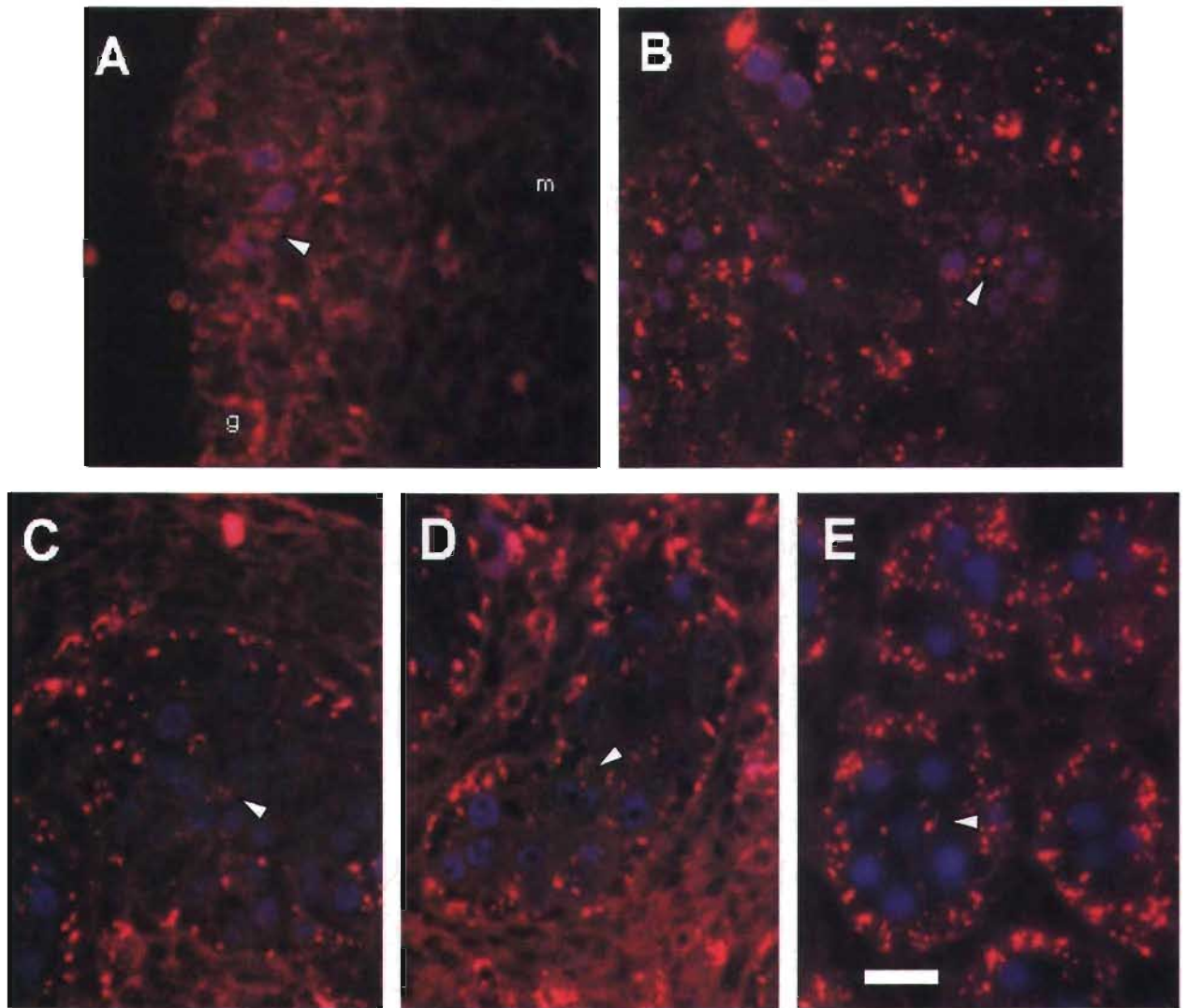


Fig. 6. Connexin 43 (Cx43) is expressed between Sertoli and germinal cells from early embryonic development. **A–F:** Digitized images obtained from fetal testicular sections double labeled with monoclonal antibodies against Cx43, MAB3068 (red), and germinal nuclear cell antigen, GCNA1 (blue). From day 11.5 days post coitum (dpc) (A), the number of germinal or GCNA1-positive cells increased. From day 14 dpc (C–E), GCNA1-positive cells were mainly distributed in the center of the seminiferous cord. Cx43 was localized between adjacent GCNA1-negative cells localized at the periphery of the seminiferous cord. Cx43-

immunofluorescent (-IF) dots were also localized at cell borders between cells negatively and positively stained with antibody against GCNA1 (arrowheads). This Cx43 localization was observed in the undifferentiated gonad at 11.5 dpc (A), at the earliest stages of gonad differentiation on day 12.5 dpc (B) and thereafter at 14.5, 16.5, and 18.5 dpc (C,D,E). No apparent difference in the size or density of Cx43-IF dots between germinal and Sertoli cells was detected during fetal life. m = mesonephros g = gonad. Scale bar = 30 μ m in A–E.

β HSD-positive cell aggregates as well as in their expression of Cx43. We have also described recently the temporal correlation between these three parameters during post-natal life (Bravo Moreno et al., 2001). Thus, results presented here are consistent with the hypothesis that expression of Cx43 may be involved in the control of developmental processes required to regulate testosterone production, secretion, or both.

An increase in gap junction plaques has been found in epithelial cells from other tissues during development (Pitelka et al., 1973; Yamamoto and Kataoka, 1988; Pérez Armendariz et al., 1995). Sertoli cells start proliferating on day 14.5 dpc, reaching their maximum rate of thymi-

dine-labeling index between 16.5 and 18.5 dpc, at the end of embryonic life (Vergoween et al., 1991). The present study shows that temporally correlated with this change there is an increase in the density of Cx43-IF dots in Sertoli cells. Changes in Cx43 levels in Sertoli cells during fetal life may result from their cell membrane closer apposition and might have an effect on the production or liberation of secretory products.

Previous morphologic studies in mouse testis have shown that after day 14.5 dpc gonocytes are localized at the center of seminiferous cords cells (Vergoween et al., 1991) and that Sertoli cells localized at the periphery extend cytoplasmic processes that establish contacts with

germinal (McGinley and Posalaky, 1986). The finding of Cx43-IF-labeled dots in MIH-positive cytoplasmic projections surrounding MIH negative cells, with large nuclei and prominent nucleoli, characteristic of germinal cells, localized at the center of the seminiferous cords points to the existence of Cx43-mediated heterocellular contact between Sertoli and germinal cells. Its existence is also indicated by identification of Cx43 at cell borders of GCNA1-positive and -negative cells at all embryonic ages in parallel sections. Because only Sertoli and germinal cells form the seminiferous cords (Orth, 1982), it is safe to conclude that there are homomeric and/or heteromeric channels formed with Cx43 between these cell types.

Primordial germ cells (PGCs) are first detectable at 7–8 dpc as a population of surface alkaline phosphatase-expressing cells in the extraembryonic tissue near the base of the allantois (Enders and May, 1994; Richards et al., 1999). They migrate through the hindgut endoderm and then through the dorsal mesentery into the genital ridges. During their migration, they also proliferate (see Gomperts et al., 1994). They reach the gonad at day 11.5 dpc. In the male PGCs, they continue their proliferation within the gonad until day 14.5 dpc, when they become mitotically quiescent until shortly after birth, when they resume mitosis (Vergoewen et al., 1991). In parallel to proliferation, during the first days of embryonic life, germinal cells undergo programmed cell death (Rucker et al., 2000). In other cell systems, there is increasing evidence that Cx43 may participate in regulation of migration (Huang et al., 1998; Ashton et al., 1999; McDonough et al., 1999; Bannerman et al., 2000) mitosis and apoptosis (Xie et al., 1997; Kanemitsu et al., 1998; Andrade-Rozental et al., 2000; Wilson et al., 2000). Cx43-deficient mice showed a significant decrease in germinal cells throughout embryonic life that could be traced back as early as 11.5 dpc (Juneja et al., 1999), raising the possibility that, as in other cell tissues, loss of Cx43 may induce alterations in precursor germ cells migration. The findings presented here—the identification of Cx43 homocellular contacts between Leydig and Sertoli cells, as well as of Cx43 heterocellular contacts between germinal and Sertoli cells from the earliest embryonic stages and throughout all fetal gonadal development—raise the possibility that Cx43 may also participate in the control of germinal cell proliferation and/or survival within the gonad.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. N. Josso and Dr. G.C. Enders, for their gift of antibodies. We also thank Dr. Dany Page, Dr. Robyn Hudson, and referees of this manuscript for critical reading of this manuscript and constructive comments.

LITERATURE CITED

Andrade-Rozental AF, Rozental R, Hopperstead MG, Wu JK, Vrionis FD, Spray DC. 2000. Gap junctions: the "kiss of death" and the "kiss of life". *Brain Res Brain Res Rev* 32:308–315.

Ashton AW, Yokota R, John G, Zhao S, Suadicani SO, Spray DC, Ware JA. 1999. Inhibition of endothelial cell migration, intercellular communication, and vascular tube formation by thromboxane A(2). *J Biol Chem* 274:35562–35570.

Batias C, Defamie N, Lablack A, Theport D, Fenichel P, Segretain D, Pointis G. 1999. Modified expression of testicular gap junction connexin43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell Tissue Res* 298:113–121.

Baker PJ, Sha JA, McBride MW, Peng L, Payne AH, O'Shaughnessy PJ. 1999. Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I

and type VI isoforms in the mouse testis during development. *Eur J Biochem* 260:911–917.

Bannerman P, Nichols W, Puhalla S, Oliver T, Berman M, Pleasure D. 2000. Early migratory rat neural crest cells express functional gap junctions: evidence that neuronal crest cell survival requires gap junction function. *J Neurosci Res* 61:605–615.

Bravo-Moreno JF, Díaz-Sánchez V, Montoya-Flores JG, Lamoyi E, Saéz JC, Pérez-Armendariz EM. 2001. Expression of connexin 43 in Leydig cells from mouse testis is regulated in an age and functional dependent manner during postnatal development. *Anat Rec* 264: 13–24.

Bukauskas FF, Elfgang C, Willecke K, Weingart R. 1995. Heterotypic gap junction channels (connexin26–connexin32) violate the paradigm of unitary conductance. *Pflugers Arch* 429:870–872.

Dahl E, Manthey D, Chen Y, Schwarz HJ, Chang YS, Lally PA, Nicholson BJ, Willecke K. 1996. Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *J Biol Chem* 271:17903–17910.

Dupont E, Labrie E, Luu-The V, Pelletier G. 1993. Ontogeny of 3 β hydroxysteroid dehydrogenase (3- β HSD) isomerase in rat testis as studied by immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)* 187:538–589.

Elenes S, Rubart M, Moreno AP. 1999. Junctional communication between isolated pairs of canine atrial cells is mediated by homogeneous and heterogeneous gap junction channels. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10:990–1004.

Enders GC, May JJ Jr. 1994. Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. *Dev Biol* 163:331–340.

Gomperts M, Garcia Castro M, Wylie Ch, Heasman J. 1994. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development* 120:135–141.

Haefliger JA, Bruzzone R, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Paul DL. 1992. Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. *J Biol Chem* 267:2057–2064.

Hennemann H, Schwarz HJ, Willecke K. 1992. Characterization of gap junction genes expressed in F9 embryonic carcinoma cells: molecular cloning of mouse connexin31 and -45 cDNAs. *Eur J Cell Biol* 57:51–58.

Huang GY, Cooper ES, Waldo K, Kirby ML, Gilula NB, Lo CW. 1998. Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. *J Cell Biol* 143:1725–1734.

Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM. 1999. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 60:1263–1270.

Kanemitsu MY, Jiang W, Eckhart W. 1998. Mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis. *Cell Growth Differ* 9:13–21.

Kadle R, Zhang JT, Nicholson BJ. 1991. Tissue-specific distribution of differentially phosphorylated forms of Cx43. *Mol Cell Biol* 11:363–369.

Keeney DS, Naville D, Milewich L, Bartke A, Mason JI. 1993. Multiple isoforms of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5\rightarrow^4$ -isomerase in mouse tissues: male-specific isoforms are expressed in the gonads and liver. *Endocrinology* 133:39–45.

Manthey D, Bukauskas F, Lee GC, Kosak CA, Willecke K. 1999. Molecular cloning and functional expression of the mouse gap junction gene connexin-57 in human HELA cells. *J Biol Chem* 274: 14716–14723.

McDonough WS, Johansson A, Joffe H, Giese A, Berens ME. 1999. Gap junction intercellular communication in gliomas is inversely related to cell motility. *Int J Dev Neurosci* 17:601–611.

McGinley DM, Posalaky Z. 1986. Gap junctions between gonocytes and epithelial cells in the sex cords of the one day old rat. A freeze fracture study. *J Submicrosc Cytol* 18:75–84.

Merchant-Larios H, Moreno Mendoza N. 1996. Embryology of mouse gonadal development. *Front Endocrinol* 20:22–32.

Mok BW, Yeung WSB, Luk JM. 1999. Differential expression of gap-junction gene connexin 31 in seminiferous epithelium of rat testes. *FEBS Lett* 453:243–248.

- Murray SA, Fletcher WH. 1984. Hormone-induced intercellular signal transfer dissociates cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Cell Biol* 98:1710–1719.
- Nagano T, Suzuki F. 1978. Cell to Cell Relationships in the seminiferous epithelium in the mouse embryo. *Cell Tissue Res* 189:389–401.
- Oh S, Rubin JB, Bennett MVL, Verselis VK, Bargiello TA. 1999. Molecular determinants of electrical rectification of single channel conductance in gap junctions formed by connexins 26 and 32. *J Gen Physiol* 114:339–364.
- O'Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, Haavisto A-M, Charlton HM, Huhtaniemi I. 1998. Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology* 139:1141–1146.
- Orth JM. 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 203:485–492.
- Pelletier RM. 1996. The distribution of Connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of the Sertoli cell junctional barrier in continual (guinea pig and seasonal Breeders (Mink) testes. *J Androl* 16:400–409.
- Pérez-Armendariz EM, Romano M, Luna J, Miranda C, Bennett MVL, Moreno AP. 1994. Characterization of gap junctions between pairs of Leydig cells from mouse testis. *Am J Physiol* 267:C570–C580.
- Pérez-Armendariz EM, Luna J, Aceves C, Tapia D. 1995. Connexin26, 32, and 43 are expressed in virgin, pregnant and lactating mammary glands. *Dev Growth Differ* 37:421–431.
- Pérez-Armendariz EM, Luna J, Miranda C, Talavera D, Romano MC. 1996. Luteinizing and human chorionic gonadotropin hormones increase intercellular communication and gap junctions in cultured mouse Leydig cells. *Endocrine* 4:1–10.
- Pitelka DR, Hammamoto ST, Duafala JG, Nemanic MK. 1973. Cell contacts in the mouse mammary gland I. Normal gland in postnatal development and the secretory cycle. *J Cell Biol* 56:797–818.
- Plum A, Hallas G, Margin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher G, Wolpert C, Kim J-S, Lamers WH, Evert M, Meda P, Traub O, Willecke K. 2000. Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol* 10:1083–1091.
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J. 1995. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267:1831–1834.
- Rey R, al-Attar L, Louis F, Jaubert F, Barbet P, Nihoul-Fekete C, Chaussain JL, Josso N. 1996. Testicular dysgenesis does not affect expression of anti-mullerian hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *Am J Pathol* 148:1689–1698.
- Richards AJ, Enders GC, Resnick JL. 1999. Differentiation of murine premeiotic primordial germ cells in culture. *Biol Reprod* 61:1146–1151.
- Risley M, Tan IO, Roy C, Saéz JC. 1992. Cell-, age- and stage dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J Cell Sci* 103:81–96.
- Risley MS. 2000. Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biol Reprod* 62:748–754.
- Rucker EB, Dierisseau P, Wagner KU, Garret L, Wynshaw Boris A, Flaw JA, Henninghausen L. 2000. Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Mol Endocrinol* 14:1038–1052.
- Russell LD. 1996. Structure and development. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD, editors. *The Leydig cell*. p 43–96.
- Saéz JC, Connor JA, Spray DC, Bennett MVL. 1989. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2708–2712.
- Steger K, Tetens F, Bergmann M. 1999. Expression of connexin 43 in human testis. *Histochem Cell Biol* 112:215–220.
- Tan IP, Roy C, Saéz JC, Saéz CG, Paul DL, Risley MS. 1996. Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli gap junctions. *Biol Reprod* 54:1300–1310.
- Tsien RW, Weingart R. 1974. Proceedings: cyclic AMP: cell-to-cell movement and inotropic effect in ventricular muscle, studied by a cut-end method. *J Physiol (Lond)* 242:95P–96P.
- Vergowen RPPA, Jacobs SGOM, Huiskamp R, Davids JAG, de Rooij DG. 1991. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil* 93:233–243.
- Willecke K, Kirchhoff S, Plum A, Temme A, Thonnissen E, Ott T. 1999. Biological functions of connexin genes revealed by human genetic defects, dominant negative approaches and targeted deletions in the mouse. *Novartis Found Symp* 219:76–88.
- Wilson MR, Close TW, Trosko JE. 2000. Cell population dynamics (apoptosis, mitosis, and cell-cell communication) during disruption of homeostasis. *Exp Cell Res* 254:257–268.
- Yamamoto M, Kataoka K. 1988. An electron microscopic study of the development of the exocrine and endocrine pancreas with special reference to intercellular junctions. *Arch Histol Cytol* 51:315–325.
- Xie H, Laird DW, Chang TH, Hu VW. 1997. A mitosis-specific phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in human vascular cells: biochemical characterization and localization. *J Cell Biol* 137:203–210.
- Zhang JT, Nicholson BJ. 1989. Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26 as deduced from its cDNA. *J Cell Biol* 109:3391–3401.

Expression of Connexin43 in Mouse Leydig, Sertoli, and Germinal Cells at Different Stages of Postnatal Development

J. FRANCISCO BRAVO-MORENO,¹ VICENTE DÍAZ-SÁNCHEZ,²
 JOSÉ G. MONTOYA-FLORES,¹ EDMUNDO LAMOYI,³ JUAN C. SAÉZ,⁴
 AND E. MARTHA PÉREZ-ARMENDARIZ^{1,*}

¹Departamento de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México

²Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán, México

³Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México

⁴Departamento de Ciencias Fisiológicas, Pontificia Univ. Católica de Chile, Santiago, Chile

ABSTRACT

Connexin 43 (Cx43) is the most abundant and ubiquitously distributed gap junction protein in testicular cells. Lack of Cx43 expression results in male infertility. We investigated whether Cx43 is expressed and regulated in Leydig, Sertoli and germinal cells at different stages of postnatal development. Cx43 was detected using three different antibodies shown by immunoblotting to be highly specific. At different postnatal ages Cx43 localization was compared in serial or double labeled testicular cryosections with immunocytochemical distribution of steroidogenic enzyme, 3 β hidroxysteroid-dehydrogenase (3 β HSD), Mullerian inhibitory hormone (MIH), and germinal nuclear cell antigen (GNCA1), which are specific markers of interstitial Leydig, Sertoli and germinal cells, respectively. In the interstitium, round cell clumps (RCC) with lipid droplets positive for 3 β HSD and Cx43 were frequently found at intertubular areas at birth and Cx43 was mainly localized at cell membrane appositions. From day 3, the number and size of 3 β HSD-positive RCC started to decrease, and reached a minimum at 7–14 dpp; Cx43 expressed by them is progressively downregulated. From day 21 an increase in the size and number of RCC positive for Cx43 and 3 β HSD was found that continued at 24, 26 and 28 days and reached a maximum at 35 and 60 dpp. Biphasic expression of interstitial Cx43 and 3 β HSD was also found to be positively and temporally correlated with fluctuations in intratesticular testosterone content at all ages studied. In the seminiferous cord (SC), Cx43 was expressed at birth between adjacent Sertoli cells (MIH positive) localized at the periphery, as well as in their cytoplasm projections that surround centrally localized gonocytes. From days 3 to 7, Cx43 labeling increased in Sertoli cells mainly at their apical border. At day 14, Cx43 distribution in Sertoli cells changed from apical to basal in parallel to migration of germinal (GNCA1-positive) cells from the periphery to the center of the SC. At all these ages, Cx43 was also localized at cell borders between Sertoli and germinal cells. In conclusion, this study demonstrates that Cx43 in Leydig cells is regulated during postnatal development in an age and functional dependent manner. In the tubule, it is demonstrated that Cx43 is modulated in Sertoli cells during the neonatal and prepubertal period. We also provide evidence for the first time that Cx43-gap junctions communicate between Sertoli and germinal cells before and during the first wave of spermatogenesis. *Anat Rec* 264:13–24, 2001. © 2001 Wiley-Liss, Inc.

Key words: development; Cx43; Leydig; Sertoli; germinal; differentiation; proliferation; secretion

Gap junctions are conglomerates of intercellular channels formed by a family of homologous proteins termed connexins. They allow transfer of ions and second messengers such as Ca²⁺ (Saéz et al., 1989) and cAMP (Murray and Fletcher, 1984; Tsien and Wiengart, 1974) between adjacent cells. Gap junctions have been implicated in the control of development (Juneja et al., 1999) and regulation of hormone release in secretory glands (Chanson et al., 1998; Munari-Silem and Rousset, 1996; Oyoyo et al., 1997; Pérez-Armendariz et al., 1995).

The testis is the gland required for masculinization and male reproduction. In mice, testicular weight increases

Grant sponsor: CONACYT; Grant number: 26789N; Grant sponsor: DGAPA-UNAM; Grant number: IN220197, IN231799; Grant sponsor: FONDECYT; Grant number: 8990008.

*Correspondence to: Dr. E. Martha Pérez Armendariz, Departamento de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, Mexico, D.F., México. E-mail: mperezarmendariz@aol.com

Received 13 June 2000; Accepted 19 January 2001

Published online 9 July 2001; DOI 10.1002/ar.1100

60-fold from birth to adulthood as a result of the development of two cellular compartments: the tubule and the interstitium (Vergoween et al., 1993). The interstitium contains seven different cell types: mesenchymal, peritubular or myoid, macrophages, endothelial, perivascular, lymphatic endothelial and Leydig cells (LC) (Vergoween et al., 1991). Leydig cells secrete testosterone, the main testicular hormone required for masculinization. In the prepubertal animal, mesenchymal cells represent the largest interstitial cell population. With the onset of puberty, their relative number decreases whereas LC number increases to become the most abundant interstitial cell type in the mature animal (Hardy et al., 1989; Vergoween et al., 1993).

Leydig cells have gap junctions (reviewed, Russell, 1996) and are extensively dye-coupled, both *in vivo* (Risley et al., 1992) and in freshly dispersed preparations (Kawa, 1987; Pérez-Armendariz et al., 1994; Varanda and de Carvalho, 1994). Cx43 is the only connexin described in the interstitium so far. It has been localized in peritubular cells and in rodent (Batias et al., 1999; Pérez Armendariz et al., 1994; Pelletier, 1996; Risley et al., 1992) and human (Steger et al., 1999) Leydig cells. In mouse, functional studies support the idea that Cx43 is the main connexin communicating between adult Leydig cells: a) biophysical properties of macroscopic and microscopic currents recorded from double whole cell voltage clamp of isolated pairs of LC are similar to those recorded from deficiently connected cell pairs transfected with Cx43 (Pérez-Armendariz et al., 1994); b) decrease in Cx43 expression in LC clumps cultured for 36 hr occurs associated with an 80% decay in dye coupling (Pérez-Armendariz et al., 1996); and c) time-dependent decay in Cx43 and dye coupling are prevented by maintaining LC cultures in the presence of luteinizing (LH) or chorionic gonadotrophic (CG) hormones or dibutyryl-cAMP (Pérez-Armendariz et al., 1996).

LH and CG are the main physiological regulators of LC function. They activate the same receptor, stimulate adenylate cyclase and produce an increase in intracellular cAMP levels, [cAMP]_i. Elevation of [cAMP]_i importantly enhances steroidogenesis and testosterone secretion (reviewed by Segaloff and Ascoli, 1993). Because serum LH and testosterone levels change during postnatal development (Okamoto et al., 1982; Ogasawara et al., 1984), it is possible that Cx43 expression in LC is developmentally regulated. In this respect, it has been described that Cx43-immunofluorescent (IF) labeling in interstitial cells with lipid droplets, presumably LC, is reduced in immature compared with mature testes in guinea pig (Pelletier, 1996) and rat (Risley et al., 1992). Because Cx43 may be expressed in the various seven interstitial cells there is no evidence that changes in interstitial Cx43 labeling occur exclusively in Leydig cells.

In rodent tubular cells, mRNA for 12 different connexins has been identified (see Batias et al., 2000), eight in Sertoli and nine in germinal cells (Risley, 2000). A specific spatial distribution has been found for Cx26, Cx31, Cx32, Cx33 and Cx43 using IF studies in testis from adult animals (Batias et al., 1999; Mok et al., 1999; Pérez-Armendariz et al., 1994; Pelletier, 1996; Risley et al., 1992; Tan et al., 1996). Several lines of evidences support the idea that Cx43 is required for adequate control of fertility. It has recently been shown that alterations in spermatogenesis, in both human (Steger et al., 1999) and mouse (Batias et al., 1999), are associated with decreased Cx43

expression in adult Sertoli cells. In addition, the number of germinal cells in fetal testis from Cx43 knock-out mice is significantly reduced (Juneja et al., 1999). Moreover, substitution of the coding region of the Cx43 gene by coding sequences of Cx40 or Cx32 is not sufficient to prevent reduction in germinal cells, and still results in infertile males due to the complete absence of secondary spermatogonia (Plum et al., 2000). In mouse, spermatogenesis starts shortly after birth, however, to date there is no information about Cx43 expression in testicular cells at this developmental stage.

In the present study, we investigated whether Cx43 is developmentally regulated in LC by comparing the spatial distribution and temporal correlation of Cx43 with β 3HSD expression, as well as with intratesticular testosterone content. Additionally, we investigated if Cx43 is expressed and regulated in Sertoli and germinal cells at early postnatal developmental times.

METHODS

Animals

CD1 mice were maintained and handled in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, as promulgated by the Society for the Study of Reproduction. Female breeders showing a vaginal plug the day after mating were considered to be at day 0.5 of pregnancy. To record the time of partum, females were inspected at 6 hr intervals (9, 15, 21 hr) at day 18 after mating. To prevent large variation in mouse weight, litter size was adjusted to 8 to 9 pups. Animals were sacrificed at various days after birth (0, 3, 5, 7, 14, 21, 24, 26, 28, 35, 60) at the mean delivery time (12, 18 hr) with a variation of ± 1 hr at most. Animals were anesthetized with CO₂ and then killed by decapitation. Testes were micro-dissected, embedded in TissueTek, immersed in cryo-preserved and frozen in liquid nitrogen.

Antibodies

Two different rabbit polyclonal antisera against unique peptide sequences of Cx43 were used. An affinity-purified antibody was obtained from Zymed (San Francisco, CA; Cat. No. 71-0700). A serum, F100, was generated in our laboratory according to the procedure of Traub et al. (1994) against a highly purified synthetic peptide corresponding to aa. 346–363 (Biosynthesis Inc., Lewisville, TX) of mouse Cx43 carboxy terminus [Cx43(346–363)]. A BLAST search revealed that this peptide is homologous with Cx43 sequences from other species, but not with any other protein or cloned connexin. One monoclonal antibody, MAB3068, against a synthetic peptide corresponding to another specific sequence (aa 252–270) of Cx43 (Chemicon, Temecula, CA) was also used. Polyclonal antibodies against Mullerian inhibitory hormone (MIH) (Vigier et al., 1985) and steroidogenic enzyme β 3HSD (Dupont et al., 1993; Mason et al., 1993) were kindly donated by Drs. N. Josso, V. Luu-The, and I. Mason, respectively. A monoclonal IgM antibody against a mouse germ cell nuclear antigen (GCNA1) was a gift from Dr. G.C. Enders (Enders and May, 1994).

Immunocytochemical Localization of Cx43, β 3HSD, MIH and GCNA1 Antigen

Cryosections of 10–12 μ m were processed as previously described (Pérez-Armendariz et al., 1994). Briefly, sections were fixed in 70% ethanol at -20°C ; rinsed with

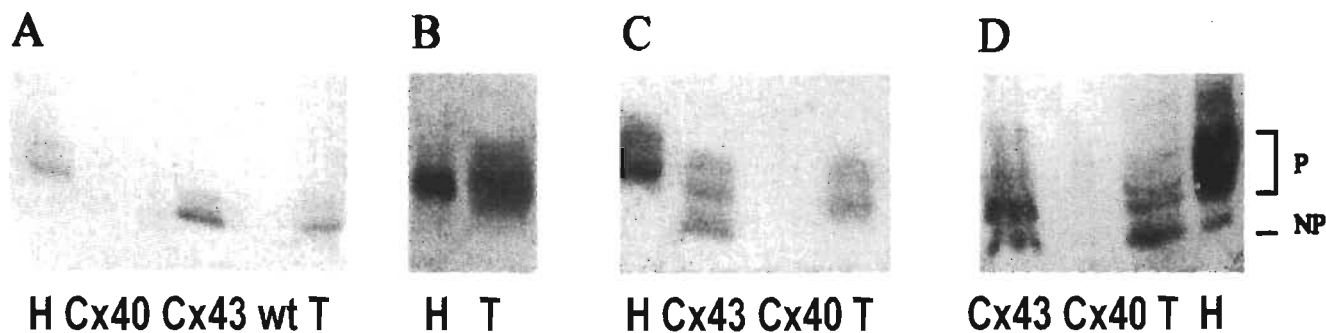


Fig. 1. Specificity of antibodies against Cx43. Immunoblot analysis of total homogenates from heart (H), adult testis (T) and HeLa cells transfected with either Cx43 (Cx43), Cx40 (Cx40) or the expression vector (wt). Blots were developed with (A) polyclonal antibody 71-0700, (B) monoclonal antibody MAB3068, (C) polyclonal antibodies F100

against peptide Cx43 (346–363), and (D) a reference anti-Cx43 antibody. Bands between 40–45 kDa corresponding to phosphorylated (P) and nonphosphorylated (NP) forms of Cx43 were detected in adult testis, heart and Cx43 transfectants but not in HeLa cells transfected with Cx40 or vector.

phosphate buffer saline (PBS), pH 7.3, 1 mM CaCl₂, and preincubated in 2% albumin IgG-free, 0.1% Triton X-100 in PBS. For single labeling, tissue sections were incubated with antibody 71-0700 (1:100), F100 (1:250) or anti-3 β HSD (1:100) for 1 hr at room temperature. After washing in PBS, tissue sections were incubated with FITC-goat anti-rabbit IgG for 1 hr at RT, washed and mounted using a fluorescence protector medium (Vecta Shield, Burlingame, CA), observed under phase contrast and fluorescence microscopy (Olympus-1X70) and photographed. For double labeling experiments, tissue sections were incubated overnight at 4°C with polyclonal antibodies against 3 β HSD or MIH (1:100) or with undiluted supernatant containing monoclonal antibody (IgM) against GCNA1. Then, sections were washed and incubated for 1 hr with FITC-labeled goat anti-rabbit IgG or anti-mouse IgM (Zymed), respectively. Sections were washed again and incubated for 2 hr with MAB3068 (IgG) against Cx43 (1:100). After washing, tissue sections were incubated with rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG (Pierce, Rockford, IL) for 1 hr. The same field of the section was analyzed sequentially under fluorescein- and rhodamine-excitation filters. Monochromatic digitized images at each excitation wavelength were acquired using a Hamamatsu digital camera (ORCA) and Metamorph software (Universal Imaging, West Chester, PA). Using the same software, images were superposed and displayed in pseudocolor. Green was used to represent fluorescence emitted by cells positive for 3 β HSD or MIH. Blue and red were used to code fluorescence of GCNA1 and Cx43 labeling, respectively. Micrographs of images shown for each developmental age are representative of observations obtained from at least six different animals.

Immunoblots

Freshly dissected testis, heart and transfected HeLa cells were homogenized in cold buffer containing 250 mM NaCl, protease inhibitors (200 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 1 mg/ml benzamidine, 1 mg/ml aminocaproic acid and 2 mM PMSF) and phosphatase inhibitors (20 mM Na₄P₂O₇ and 100 mM NaF). Immunoblots were performed as described previously (Sáez et al., 1997). Briefly, 50 μ g (heart homogenates) or 150 μ g (testis and HeLa cells) of protein were separated in 8% SDS-PAGE and electro-

transfer. After incubation with anti-Cx43 polyclonal antibodies 71-0700 (1:500) and F100 (1:100) or monoclonal MAB3068 (1:500) blots were reacted with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG, respectively, and developed with substrate (BCIP/NBT tablets, Sigma). The reactivity of these antibodies was compared with that of a previously characterized anti-Cx43 antibody described elsewhere (Sáez et al., 1997). Cx40 and Cx43-transfected HeLa cells (Elfgang et al., 1995) were kindly provided by Dr. Klaus Willecke, Institute für Genetik, Universität Bonn, Germany.

Testosterone Determination

Steroidal compounds were extracted from homogenized gonadal tissue from 10–15 individual mice of the same age, with diethyl ether. After solvent evaporation to dryness, extracts were resuspended in PBS and testosterone was determined in duplicate aliquots by a liquid phase radioimmunoassay (Sufi et al., 1986). Sensitivity of the assay was 6.8 pg/ml with a coefficient of variation of 3.6%. Data analysis was performed using a four parameter logistic transformation of the standard curve using the statistical package SigmaStat (Jandel Scientific, Sausalito, CA).

RESULTS

Specificity of Antibodies Against Cx43

Two polyclonal rabbit antibodies, 71-0700 and F100, and a monoclonal antibody, MAB3068, directed against unique amino-acid sequences of Cx43 were used. Figure 1 shows that by immunoblotting, antibody 71-0700 (A), MAB3068 (B) and antibody F100 (C) revealed bands of 40–45 kDa, in total homogenates from heart, adult testis, and in HeLa cells transfected with Cx43, but not in HeLa cells transfected with Cx40 or with the expression vector alone. These bands correspond to nonphosphorylated (NP) and several phosphorylated (P) forms of Cx43 (Sáez et al., 1997). The different banding patterns obtained with the various antibodies reflects the different degree of phosphorylation of Cx43 expressed in the studied cells and tissues. The specificity of antibodies to Cx43 was further studied by immunofluorescence (IF) in testicular sections at different ages. Figure 2 shows micrographs of sections from adult testis incubated with antibodies 71-0700 (A)

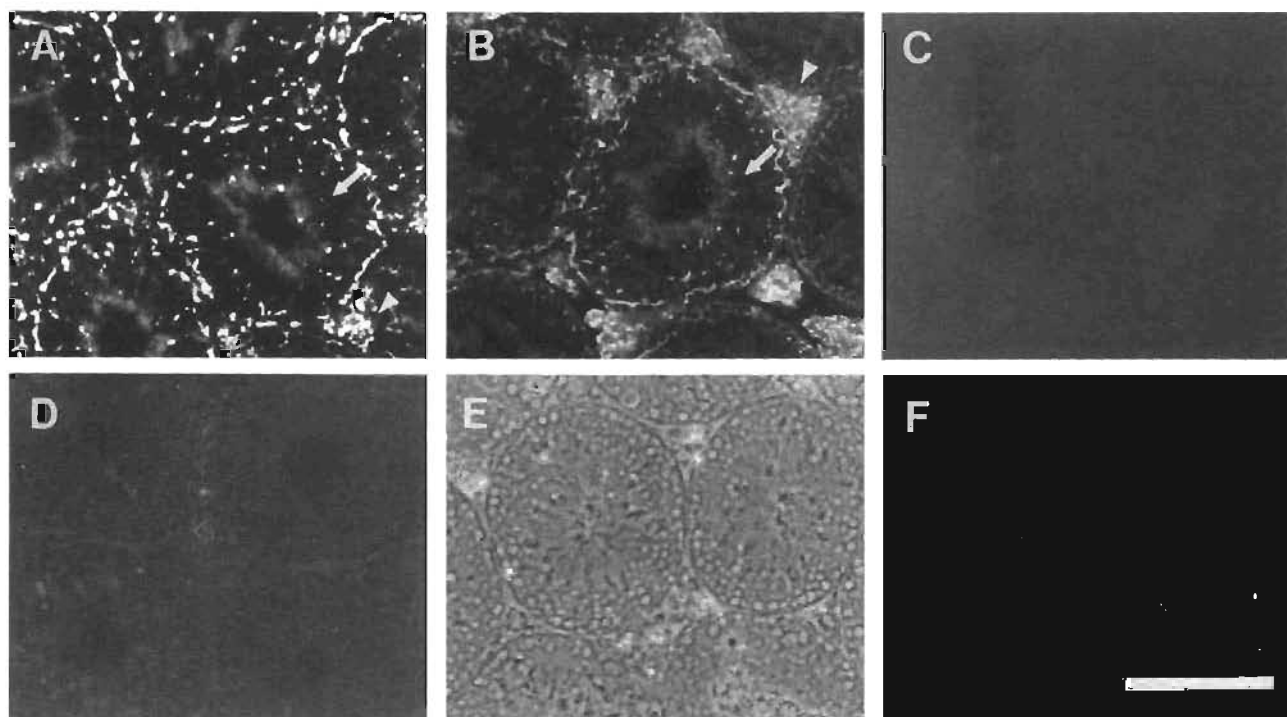


Fig. 2. Specificity of Cx43 labeling in testicular tissues. (A–D, F) Fluorescent micrographs of sections from adult mouse testes obtained after incubation with antibodies (A) 71-0700, and (B) F100. With both anti Cx43 antibodies (see also Fig. 4) a similar pattern of labeling was found in the interstitial space (arrowhead) as well as in the tubule (arrow). No

labeling was found in tissue sections incubated with (C) preimmune serum F100, (D) secondary antibody alone, or (F) antiserum F100 pre-adsorbed with peptide Cx43 (346–363). E: Phase contrast micrograph of (F). Scale bar = 150 μ m.

and F100 (B). Both polyclonal antibodies gave a similar Cx43-labeling pattern in the interstitium as well as in the tubule. This distribution was also observed by staining with monoclonal antibody MAB3068 (Fig. 5). No labeling was detected in testicular sections incubated with the pre-immune serum F100 (Fig. 2C) or with FITC-secondary antibodies alone (Fig. 2D). Furthermore, the reactivity of antiserum F100 was eliminated by adsorption with the antigenic peptide Cx43 (346–363) (Fig. 2E,F). None of the anti-Cx43 antibodies used in immunocytochemical studies labeled liver sections (not shown).

Expression of 3 β -Hydroxy-5-Ene Steroid Dehydrogenase/⁵⁻⁴ Isomerase (3 β HSD) During Postnatal Development Is Biphasic

The enzymatic complex 3 β HSD is an essential component for the biosynthesis of all biologically active steroids, including androgens. In testicular sections of newborn animals, cells expressing 3 β HSD were organized in round cell clumps (RCC) of large (>10 cells), medium (4–10) and small size (<4) at several intertubular areas (Fig. 3A). At 3 days postpartum (dpp), the size and number of 3 β HSD-positive RCC decreased, particularly in the central part of the testis. In addition, elongated 3 β HSD-positive cells were detected in some intertubular areas (Fig. 3B). These changes became more prominent at 7 dpp, when small cell clumps and mostly isolated elongated cells were found (Fig. 3C). By day 14, the number of intertubular areas that showed 3 β HSD-positive cells increased (Fig. 3D). At 21 dpp, small RCC were again detected at most intertu-

bular areas (Fig. 3E). Thereafter the size of 3 β HSD positive RCC increased progressively at 26 (Fig. 3F) and 28 dpp (Fig. 3G), to reach a maximum at 35 (Fig. 3H) and 60 dpp (Fig. 3I). Most 3 β HSD-positive cells exhibited lipid droplets under phase contrast microscopy (Fig. 3). The intensity of staining in 3 β HSD cell clumps from different intertubular areas was heterogeneous within the same section (Fig. 3). Usually, the larger the cell clumps the more lipid droplets and more intense the 3 β HSD reaction. Slight differences in intensity of the reactions were also found between cells within the same cluster. Cells in the clump that were more strongly labeled also exhibited more lipid droplets (not shown).

Biphasic Expression of Cx43 in the Interstitial Space Results From its Modulation in Leydig Cells

At birth, Cx43 was always detected in small, medium and large RCC, localized in the interstitial space (Fig. 4A,B, arrowheads). The size of Cx43-positive RCC and their spatial distribution were similar to that found for 3 β HSD-positive cells (see above). Round cell aggregates of various sizes were unambiguously identified as LC in double-labeled sections stained with antibodies to Cx43 and 3 β HSD. At birth, Cx43 IF-dots were found in the cytoplasm but mostly at cell membrane appositions (Fig. 5A). Interstitial cells surrounding 3 β HSD-positive cells, very likely fibroblast and mesenchymal cells, were not labeled by Cx43 antibodies, whereas tubular cells were strongly labeled for Cx43 (Fig. 5A,C). From 3 dpp on, Cx43 labeling

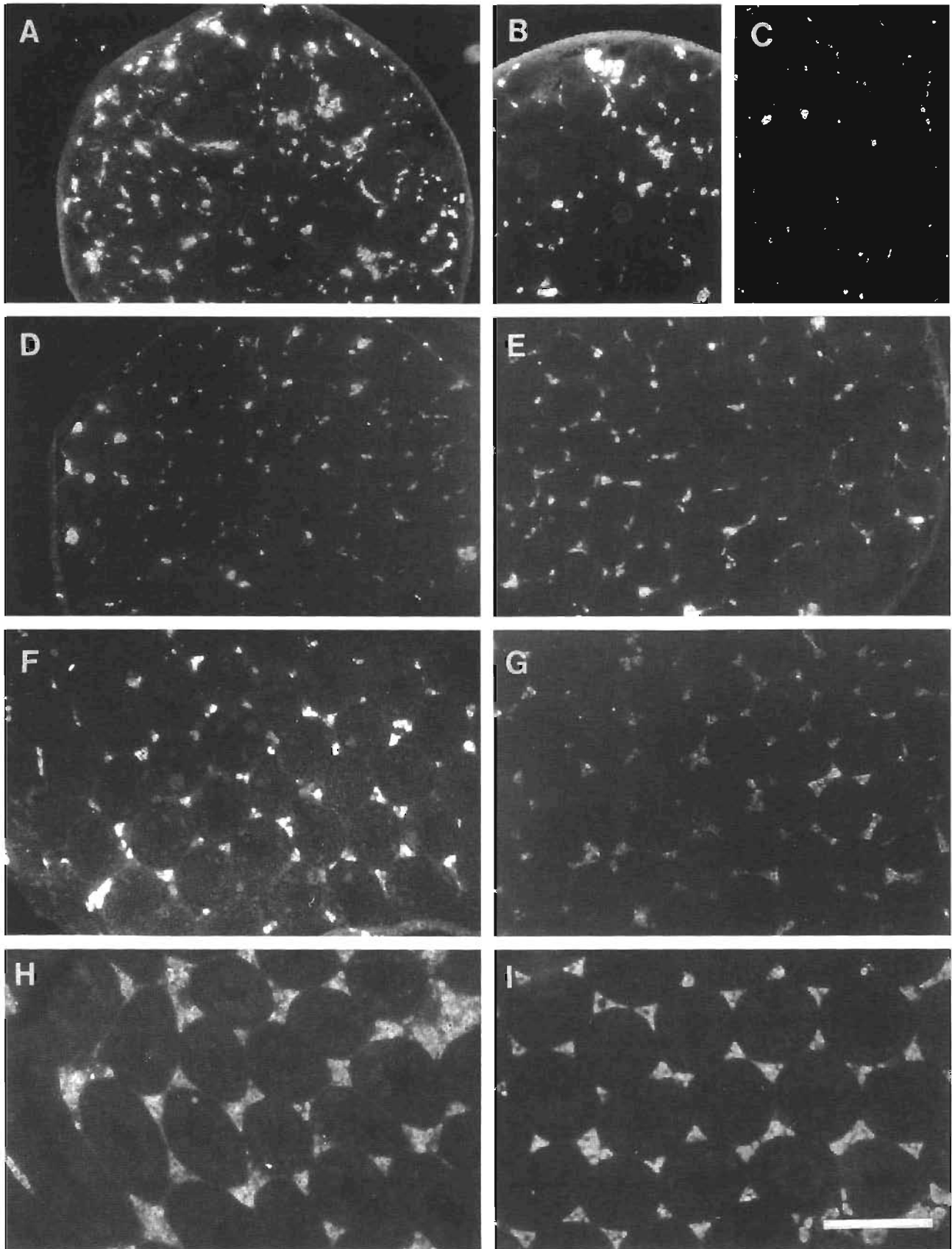


Fig. 3. Biphasic expression of 3β HSD during postnatal development. Fluorescent micrographs of testicular sections obtained with an antibody against 3β HSD (Dupont et al., 1993). **A:** After birth, large (>10 cells), medium (4–10 cells) small (<4 cells) cell clusters and isolated 3β HSD positive cells were frequently found. **B:** At 3 and **(C)** 7 dpp, the size of 3β HSD-positive clumps progressively decreased whereas isolated elongated cells became apparent. **D:** At 14 dpp 3β HSD-positive

cell number slightly increased. **E:** From day 21 dpp, small 3β HSD positive cell clumps were again detected in most intertubular areas. Size of cell clumps increased progressively at **(F)** 26 and **(G)** 28 days reaching its maximum at **(H)** 35 dpp, and **(I)** 60 dpp. Notice that within the same section, the intensity of staining varied between the different intertubular areas; usually the larger the cell clump, the more intense the 3β HSD reaction was. Scale bar = 300 μ m.

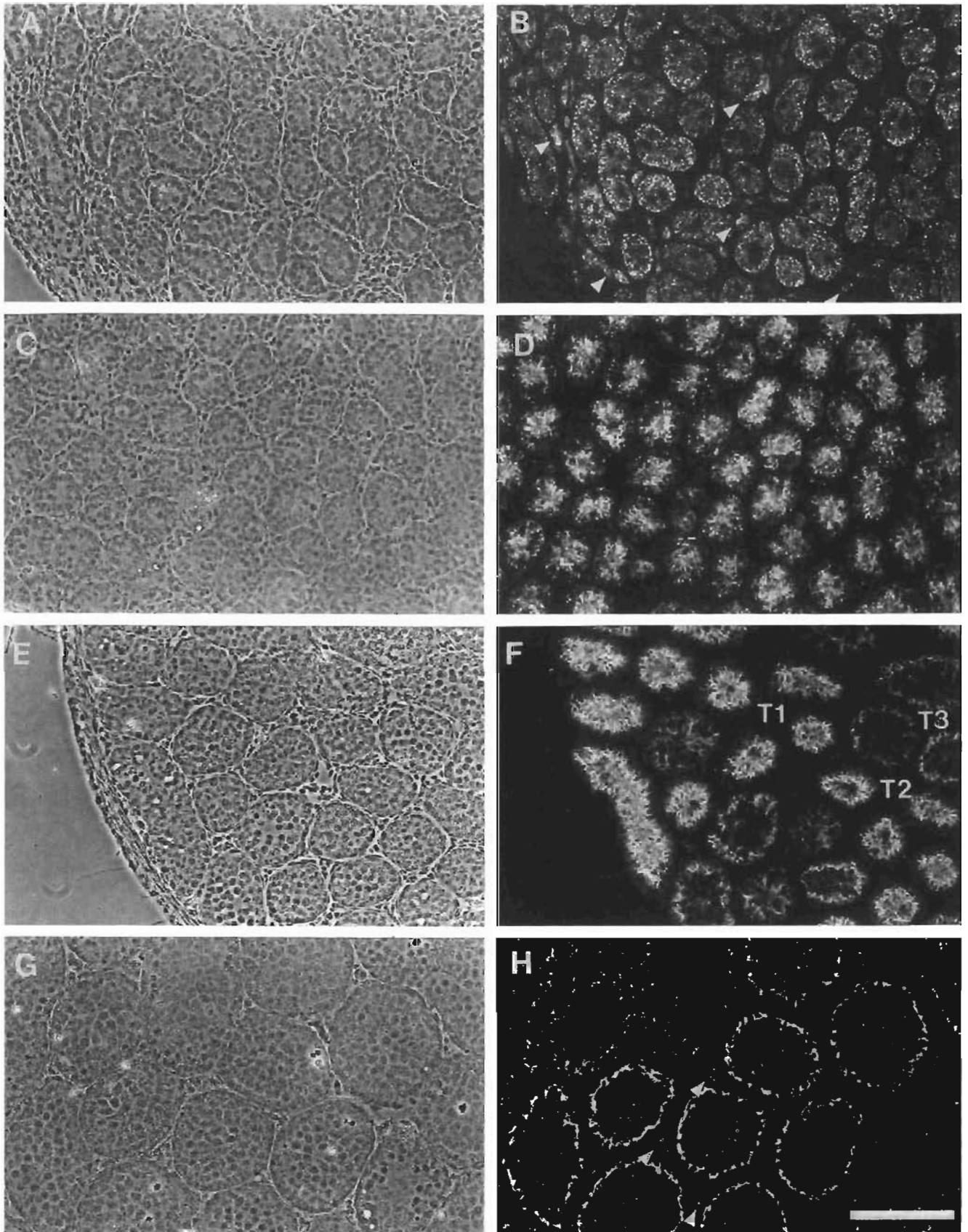


Figure 4.

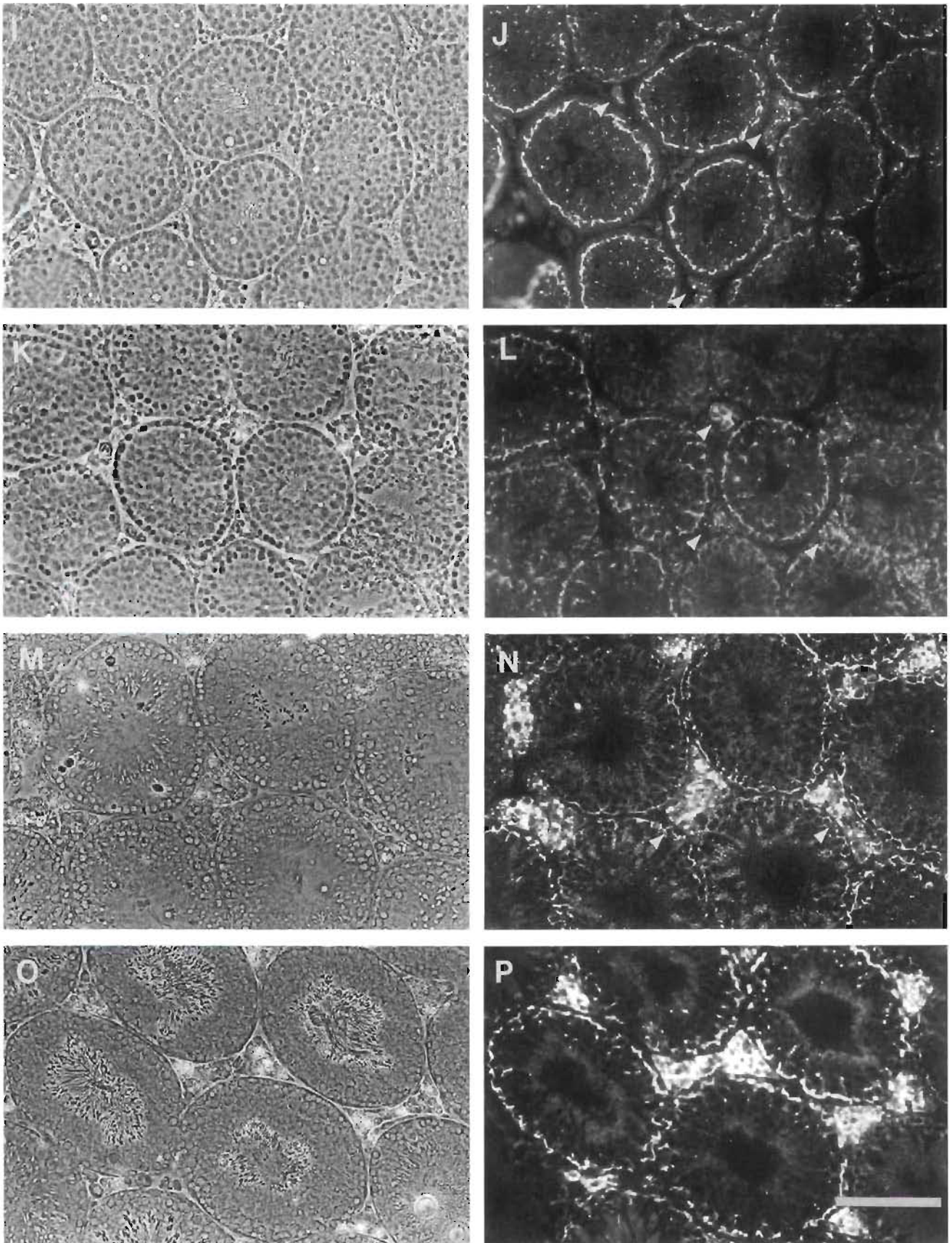


Figure 4.

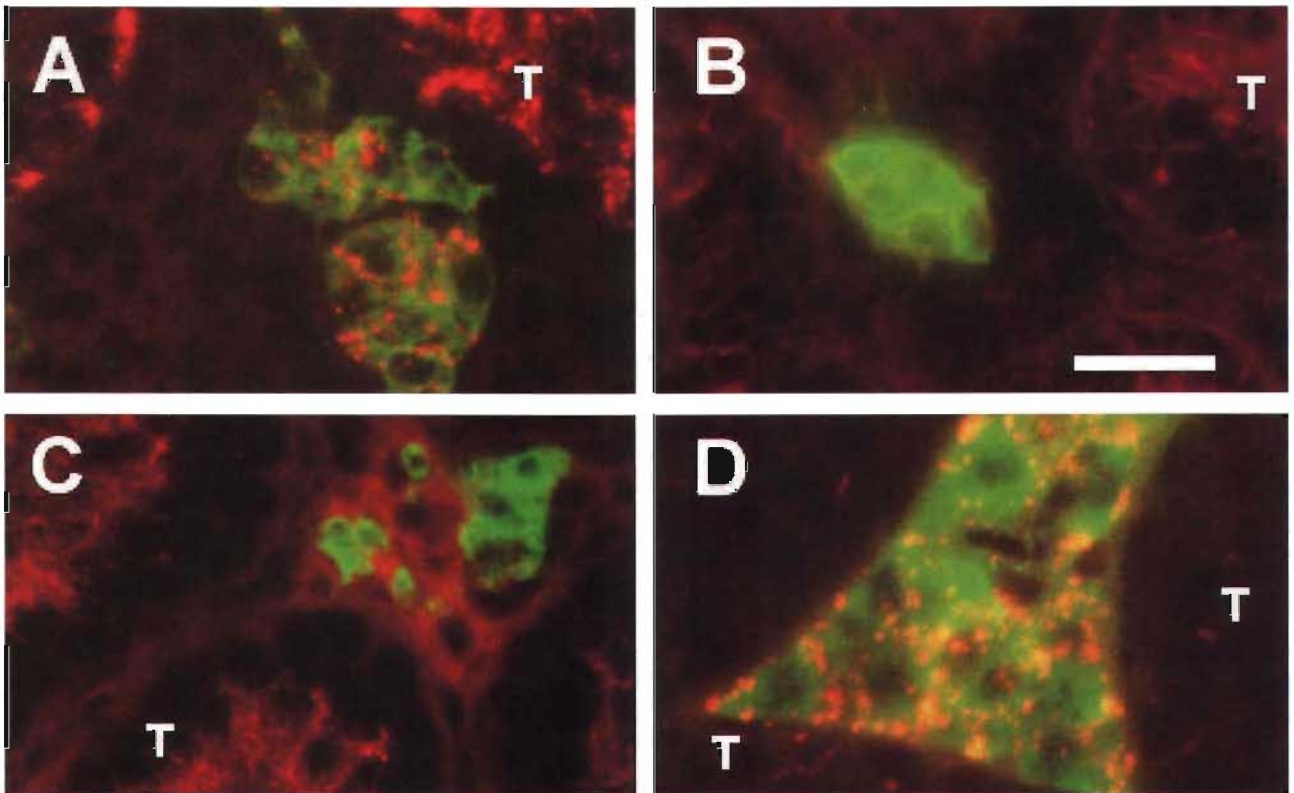


Fig. 5. Fluctuation in interstitial Cx43 results from its expression in Leydig cells. Digitized images obtained from testicular sections double-labeled with monoclonal antibody against Cx43 MAB3680 (red) and with antibodies against 3 β HSD (Mason et al., 1993) (green). **A:** At birth, Cx43 labeling was localized mostly in cell membrane appositions in 3 β HSD-positive cell clumps. Other interstitial cells surrounding 3 β HSD positive

clumps, probably fibroblasts, were not labeled. **B,C:** At 7 and 14 dpp, size of 3 β HSD-positive cell clumps decreased and Cx43 labeling was reduced. **D:** In adult testicular sections abundant Cx43 labeling was again detected mainly at cell membrane appositions between 3 β HSD-positive cells. Tubules (T) are strongly labeled with antibodies to Cx43 but not with anti-3 β HSD. Scale bar = 35 μ m.

in the interstitium decreased progressively. Cx43 IF-dots were abundant in some cells, but absent in others from the same aggregate (not shown). At day 7, Cx43 was not found

in most intertubular areas (Fig. 4C,D) and remained negative by 14 dpp (Fig. 4E,F). Double-labeling experiments showed that in addition to reduction in size of 3 β HSD-positive cell clumps there was an important decrease in Cx43 expression at both ages (Fig. 5B,C). From day 21, interstitial Cx43-IF labeling again increased. Punctate IF dots were found at several intertubular areas (Fig. 4G,H arrowheads). The size of cell clumps positive for Cx43 continued to increase at 26 (Fig. 4I,J, arrowheads) and 28 dpp (Fig. 4K,L, arrowheads) to reach a maximum at 35 (Fig. 4M,N) and 60 dpp (Fig. 4O,P). In the adult animal, Cx43-IF-dots were localized mainly at cell membrane appositions (Fig. 5D). As the RCC size increased, lipid droplets and Cx43-IF dots were more abundant.

Fig. 4 (overleaf.) Biphasic expression of Cx43 in the interstitial space during postnatal development. Phase contrast (A, C, E, G, I, K, M, O) and fluorescent (B, D, F, H, J, L, N, P) micrographs of testicular sections obtained after incubation with anti-Cx43 antibodies 71-0700. *Interstitialium.* **A,B:** At birth, abundant Cx43 IF-labeling was found in interstitial round cell clumps that showed lipid droplets at phase contrast (arrowheads). At 7 (**C,D**) and 14 dpp (**E,F**), Cx43 decreased and most intertubular areas were not labeled (see also Fig. 5). From day 21 (**G,H**) size of RCC (arrowheads) and Cx43 labeling increased progressively at 26 (**I,J**) and 28 dpp (**K,L**), reaching its maximum at 35 (**M,N**) and 60 dpp (**O,P**). *Tubule.* **A,B:** At birth, Cx43 labeling was intense in the periphery and reduced in the center of the seminiferous cords (SC). **C,D:** At 7 dpp, strong Cx43 reaction was found mainly in the center of the SC. **E,F:** At 14 dpp, SC were heterogeneously labeled. Three main patterns of Cx43 labeling were found (T1, T2 and T3), classified according to localization of their strongest Cx43 reaction. See Figure 7 for detailed description of these different Cx43 labeling patterns. **G–P:** From the 21st dpp onwards, Cx43 IF-dots were found at the luminal compartment. In addition, more delineated labeling was found in the basal third of the tubule, within the area of the junctional complex localization. At this last localization, intensity and distance of Cx43 reaction with respect to the limiting border varied between tubules of the same section. Scale bar = 150 μ m.

Developmental Changes in Intratesticular Testosterone Concentration

Figure 6 shows that intratesticular testosterone content also changed in a biphasic manner during postnatal development. The testicular testosterone content showed a marked reduction from 14 through 21 dpp when compared with newborn animals. At birth, the mean concentration of testosterone was 108 pg/mg of protein. This concentration subsequently decreased to 42 pg/mg of protein at 7 dpp and fell sharply to 3.7 and 4.2 pg/mg of protein at 14 and 21 dpp, respectively. From day 25 (20.1 pg/mg) on-

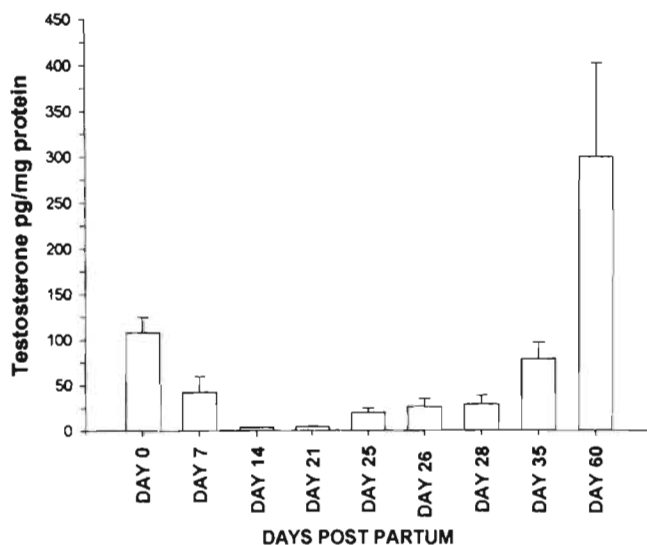


Fig. 6. Biphasic fluctuation in intratesticular testosterone content during postnatal development. Testosterone content was measured by liquid phase radioimmunoassay after diethyl ether extraction of the homogenized tissue. Each value represents the mean and SE of testosterone levels in testes from 10–15 individual animals. Testosterone values in pg/mg of protein are 108.7 ± 16.3 at birth, 42.6 ± 17.4 at 7 dpp, 3.7 ± 0.5 at 14 dpp, 4.3 ± 0.9 at 21 dpp, 20.2 ± 5 at 25 dpp, 26.3 ± 9 at 26 dpp, 29.1 ± 10 at 28 dpp, 78.9 ± 18 at 35 dpp and 301.5 ± 102 at 60 dpp. Samples corresponding to 14, 21, 25, and 26 dpp are significantly lower when compared with those from 0, 35 and 60 dpp ($P < 0.05$ Kruskal-Wallis one-way ANOVA).

wards an increase in testosterone content was detected that became prominent at 35 (78.8 pg/mg) and 60 dpp (301.5 pg/mg). The testosterone content of samples collected on days 14, 21, 25, 26, was statistically significantly different from that at 0, 28, 35 and 60 dpp.

Connexin 43 Is Expressed in Cells of the Seminiferous Cords at Birth and Is Modulated During the Neonatal and Prepubertal Period

The seminiferous cord (SC) is formed by Sertoli and germinal cells. Mouse germ cell nuclear antigen, GNCA1, a common marker of the germ cell lineage, is known to be abundant in nuclei of prespermatogonia (gonocytes), spermatogonia and early spermatocytes (Enders and May, 1994). In mouse, spermatogenesis starts a few hours after birth (Vergowen et al., 1993). We show that Cx43 is prominently expressed in SC cells from newborn mouse. Labeling of SC in the same section was homogeneous (Fig. 4A,B). In double-labeled sections Sertoli cells, identified by their positive staining with anti-Mullerian inhibitory hormone antibody, were found at the periphery of the SC (Fig. 7A). Abundant Cx43-IF dots were localized at cell membrane appositions between adjacent Sertoli cells as well as in their cytoplasmic projections that surround central gonocytes (Fig. 7A arrowhead). Gonocytes, identified with antibodies against GNCA1, were localized in the center of the SC (Fig. 7B, arrowhead). Between gonocytes Cx43 IF-dots were frequently found. Cx43 at this localization may result from its expression between gonocytes or between gonocytes and Sertoli cells.

During the first week of life, gonocytes migrate from the center to the periphery of the SC. At this latter region they

proliferate (Vergowen et al., 1991) and by the end of the week most of them have differentiated to spermatogonia (Nebel et al., 1961). Sertoli cells continue their proliferation and change from a round to a droplet shape (Vergowen et al., 1991). Here we found that associated with these events, expression of Cx43 changed in SC cells. In double-labeled sections at 3 dpp, Cx43 increased in the center of the SC, localized in Sertoli cells that were not labeled with the anti-GNCA1 antibody (Fig. 7C). In the periphery, Cx43 was localized at cell borders between Sertoli cells and GNCA1-positive cells (Fig. 7C, arrowhead). At 7 dpp, Cx43 reactivity remained intense in the center of the SC and became almost undetectable at the periphery (Fig. 4C,D). In this latter region abundant and closely packed GNCA1-positive cells were found (Fig. 7D). Between adjacent GNCA1-positive cells, Cx43-IF labeling was localized occasionally (Fig. 7D arrow, and insert). In contrast, Cx43 IF-dots were frequently found between the luminal pole of GNCA1-positive cells and centrally localized Sertoli cell membranes (Fig. 7D arrowhead).

By 14 dpp, Sertoli cells stop proliferating and have differentiated to a polarized epithelium (Vergowen et al., 1991). Spermatogonia cells have differentiated up to their pachytene spermatocyte stage (Enders and May, 1994; Nebel et al., 1961). At this age, Cx43 expression changed again; labeling of SC was markedly heterogeneous (Fig. 4E,F). Three different patterns of Cx43 expression in the SC were found. In type one (T1), intense Cx43-IF labeling was localized in the center of the SC, and GNCA1-positive cells were localized in the periphery (Figs. 7E; 4E,F). In type two (T2), intense Cx43 reaction was localized in the middle of the SC, and GNCA1-positive cells were found in the center and at the periphery (Figs. 7E; 4E,F). In type three (T3), intense but more delineated Cx43-IF labeling was localized toward the basal region, and abundant GNCA1-positive cells were found in the center of the SC. In type II and type III SC, tiny Cx43 IF dots were also found between GNCA1-positive cells localized at the center (Fig. 7E; 4E,F). In the three different patterns of Cx43 expression in the SC, labeling was found at cell borders between negative and GNCA1 positive cells (Fig. 7, arrowheads).

From 21 dpp onwards, after the formation of the blood testis barrier, abundant delineated Cx43 was found at the basal third of Sertoli cells, within the area of localization of the junctional complex (Fig. 4G,H). From this time on, Cx43 intensity and distance toward the limiting border of the tubule varied between tubules from the same section (Fig. 4G–P). In the luminal compartment small Cx43 punctate staining was also found (Fig. 4G–P). Observations at these last dates are consistent with previous reports (Batias et al., 2000; Pelletier, 1996; Risley et al., 1992; Steger et al., 1999).

DISCUSSION

In these studies we have demonstrated that Cx43 expression in LC from mouse testis is regulated in an age- and functional-dependent manner from birth to adult life. In addition, it is clearly documented that Cx43 is expressed in Sertoli cells at birth and that it is also modulated during the neonatal and prepubertal period. Evidence suggesting that Cx43 forms gap junctions between Sertoli and germinal cells before and at the time of initiation of spermatogenesis is also provided.

Immunofluorescent staining of testis truly reflects expression of Cx43 because antibodies used for its detection were found to be highly specific. This was demonstrated

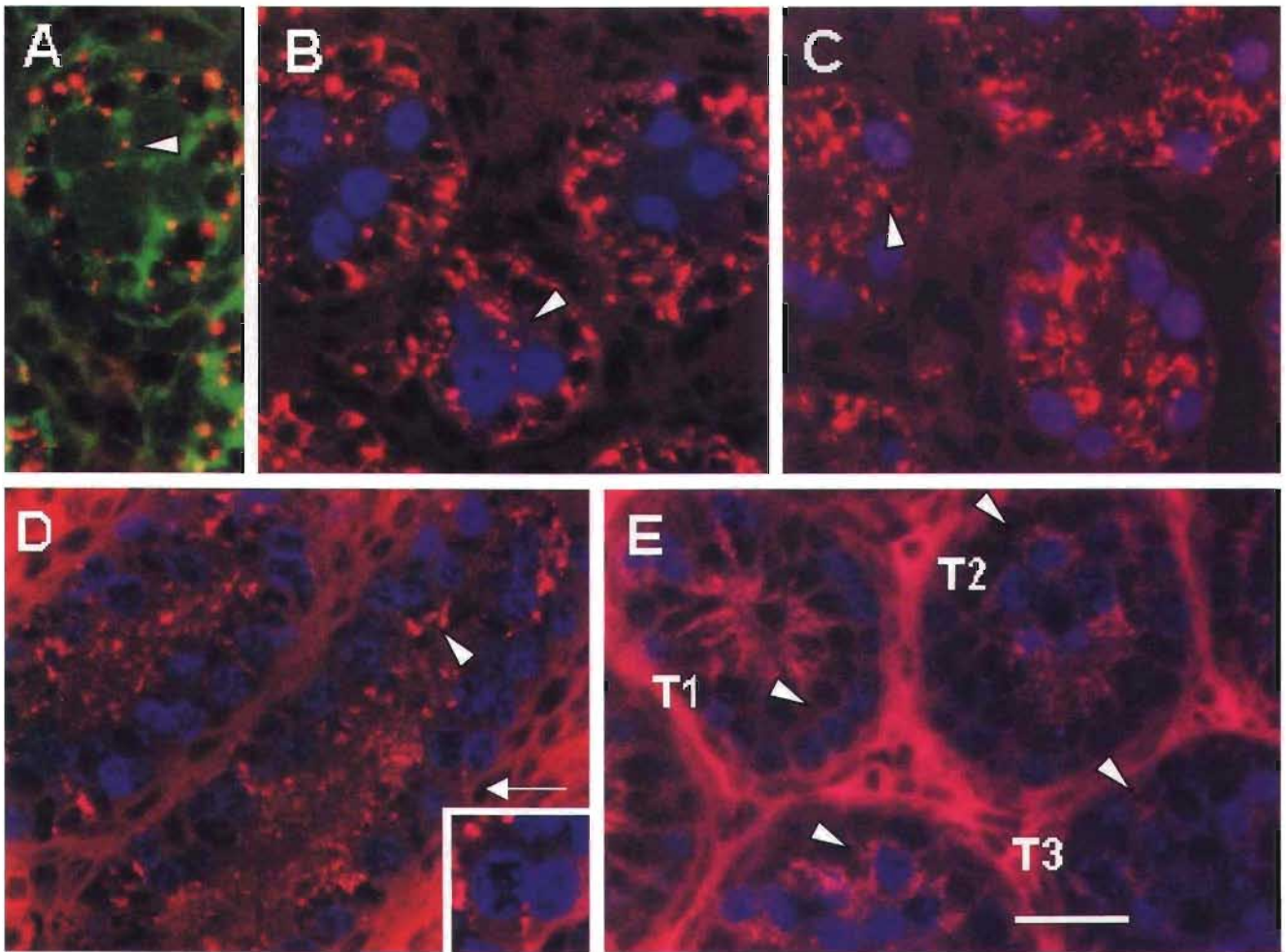


Fig. 7. Cx43 is expressed between adjacent Sertoli and between Sertoli and germinal cells at early postnatal development. Digitized images obtained from testicular sections double-labeled with monoclonal antibodies MAB3068 against Cx43 (red) and monoclonal antibodies to germinal nuclear cell antigen, GNCA1 (blue) or polyclonal antibody against Mullerian inhibitory hormone (MIH, green). **A:** At birth, Cx43-IF dots (red) were found in cell membrane appositions at the lateral borders of peripheral MIH-positive (Sertoli cells) as well as in their cytoplasmic projections (intense green) that surround central gonocytes (arrowhead). **B:** At birth, gonocyte cells were identified with antibodies against germ cell nuclear antigen (GCNA1). Cx43 IF-dots were frequently found between them (arrowhead). Cx43 localization shown in A and B indicates the presence of Cx43-gap junctions between cytoplasmic Sertoli cell projections and gonocytes. **C:** At 3 dpp, Cx43 increased in the center of the SC, and some GCNA1 cells were localized in the periphery. **D:** At 7

dpp, Cx43 was intense in the center of the SC. At the periphery, abundant and closely packed GNCA1-positive cells were found. Between them, Cx43 IF-dots were found infrequently (arrow). A higher magnification of this area is shown in the insert. **E:** At 14 dpp three different patterns of Cx43 expression in the SC were found. In type one (T1), intense Cx43-IF labeling was localized in the center of the SC- and GNCA1-positive cells were localized in the periphery. In type two (T2), intense Cx43 reaction was localized in the middle of the SC, and GNCA1-positive cells were found in the center and at the periphery. In type three (T3), intense but more delineated Cx43-IF labeling was localized toward the basal region of the SC and abundant GCNA1-positive cells were found in the center. In the three different patterns of SC-Cx43 labeling, Cx43 was found at cell borders between GNCA1-negative and GNCA1-positive cells (arrowheads). See also Figure 4F for lower scale micrographs of this developmental age. Scale bar = 30 μ m.

by: a) similar labeling pattern in the interstitium and in the tubule at various developmental ages using three different antibodies directed against unique sequences of Cx43; b) polyclonal antibodies F100 and 71-0700 and monoclonal MAB3068 reacted with bands of 40–45 kDa in immunoblots of heart, adult testis and Cx43-transfected HeLa cells, but not in Cx40-transfectants. These bands correspond to phosphorylated and unphosphorylated forms of Cx43 (Sáez et al; 1997); c) no labeling was detected in liver sections with these antibodies; d) labeling of LC and tubular cells by antiserum F100 was eliminated by prior absorption with the immunogenic peptide; e) the

pattern of Cx43 expression shown here by IF in adult animals is similar to that previously reported by others (see Introduction); and f) our description of the expression of Cx43 in Leydig, Sertoli and germinal cells in adult mouse testis is consistent with the recent localization of Cx43 gene transcript in these cell types by *in situ* RNA hybridization (Batiás et al. 2000).

Biphasic fluctuation in interstitial Cx43 results from changes in Cx43 expression in LC because it was found to be temporally correlated with 3 β HSD expression and intratesticular testosterone content along all postnatal development. Moreover, Cx43 was unambiguously localized

in β HSD-positive cells by double labeling but not in other interstitial cell types that surround them. Luteinizing hormone may be the physiological trigger signal that controls Cx43 expression in LC during postnatal development. This possibility is suggested by the temporal correlation between fluctuations in testosterone content, β HSD and Cx43 expression found here, with the known biphasic changes in mouse LH serum levels during postnatal development (Berkowitz et al., 1979; Ogasawara et al., 1984). It is also suggested by the previously described modulation of intercellular communication and Cx43 expression induced by LH in cultured adult mouse Leydig cells (Pérez-Armendariz et al., 1996).

Results presented here suggest that expression of Cx43 may be participating in developmental processes required for adequate control of testosterone production and secretion. This is supported by the correlation between fluctuations in intratesticular testosterone content and Cx43 and β HSD expression and by the finding that modulation in Cx43 expression is an early event in Leydig cell developmental changes. Downregulation during neonatal and prepubertal life was found to occur in parallel with a decrease in β HSD expression, and Cx43 upregulation observed during puberty preceded both the main increase in β HSD-positive cells and testosterone release. One possible mechanism by which gap junctions may enhance testosterone release is by transfer of cAMP (Murray and Fletcher, 1984; Tsien and Weingart, 1974), induced by LH in some cells to LC expressing none or low numbers of LH receptor or steroidogenic enzymes levels. Transfer of cAMP may amplify the transcription of cAMP-dependent steroidogenic enzymes (Payne and Youngblood, 1995) as well as synchronize testosterone release between cells of the aggregate. Directed target disruption of Cx43 gene results in mice that die early after birth from heart failure (Reaune et al., 1995). Interestingly, knock-in mice in which the Cx40- or Cx32-coding region was substituted for Cx43 survive to adulthood but show failed spermatogenesis (Plum et al., 2000). Whether alterations in testosterone levels at this developmental stage contribute to the failure of differentiation of germinal cells in these mice remains to be determined.

This study provides evidence for the first time that in the seminiferous cord Cx43 is expressed between Sertoli and germinal cells before and during the first wave of spermatogenesis. Its expression in this site is indicated by Cx43-IF dots found in Sertoli cell cytoplasmic projections that surround germinal cells, as well as in cell borders between Sertoli and germinal cells at 0, 3, 7 and 14 days of age. It is also indicated by the occasional detection of Cx43 between adjacent GCNA1-positive cells. Thus, homotypic, heterotypic or heteromeric channels containing Cx43 (Bukauskas et al., 1995; Elenes et al., 1999; Elfgang et al., 1995; Oh et al., 1999) may communicate between these cell types. Cx43-mediated heterocellular contacts between Sertoli and germinal cells is consistent with recent findings of Cx43 gene transcript in germinal and Sertoli cells by *in situ* hybridization (Batias et al., 2000). It is also consistent with the description of dye transfer (Batias et al., 2000; Orth and Boehm, 1990) and gap junctions (Byers and Pelletier, 1991; McGinley et al., 1979) between Sertoli and germinal cells, and between adjacent germinal cells (Pelletier and Byers, 1992). Further studies using electron microscopic techniques will confirm whether Cx43-mediated heterocellular contacts exist between SC cells. Recently, failed maturation of remaining

germinal cells has been found in knock-in Cx40 and Cx32 mice (Plum et al., 2000). Loss of Cx43 gap junctions between Sertoli and germinal cells may be a possible explanation for this.

Data presented here clearly show that Cx43 in Sertoli cells is expressed at birth and is modulated during the neonatal and prepubertal period. Gap junctions between neonatal Sertoli cells have also been documented (Nagano and Suzuki, 1976). Change of Cx43 spatial distribution in Sertoli cells from their apical region (3 dpp) to their basal domain (14 dpp) is correlated with the differentiation from a nonpolarized to a polarized epithelium (Vergowen et al., 1991). By the end of the second week post partum, the lumen of the tubule is formed (Flickinger, 1967) and gap junctions (Gilula et al., 1976; Nagano and Suzuki, 1976) and tight-junction protein ZO-1 (Byers et al., 1991) distribution changes from the apical to the basal pole of Sertoli cells. More recently, direct interaction (Giepmans and Moolenaar, 1998) and co-localization of the tight junction protein ZO-1 with Cx43 has been documented (Batias et al., 1999). Thus, it is likely that the heterogenous distribution of Cx43 between SC detected here at 14 dpp may reflect a redistribution of this connexin in Sertoli cells during the maturation of the junctional complex and formation of the hematotesticular barrier. These changes occur in parallel with the maturation and migration of germinal cells within the SC that may represent the first wave of spermatogenesis. Because Cx43 heterocellular contacts exist throughout early development, the possibility is raised that direct transfer of molecules from germinal to Sertoli cells mediated by this connexin may contribute to the regulation of Cx43 distribution at these stages in Sertoli cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Roberto Chavira, Lourdes Boeck, and Gladys Garcés for their technical assistance. We thank Dr. F. Labrie, Dr. V. Luu-The, Dr. I. Mason, Dr. N. Josso and Dr. G.C. Enders for their gift of antibodies. We also thank Dr. O. Traub and Dr. E. Beyer for their advice in the generation of anti-connexin antibodies and Dr. K. Willecke for donation of HeLa cells transfected with Cx40 and Cx43. We also thank Dr. H. Rasgado-Flores and Dr. Robyn Hudson for critical reading of this manuscript.

LITERATURE CITED

- Batias C, Siffroi JP, Fenichel P, Pointis G, Segretain D. 2000. Connexin 43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. *J Histochem Cytochem* 48:793–805.
- Batias C, Defamie N, Lablack A, Theport D, Fenichel P, Segretain D, Pointis G. 1999. Modified expression of testicular gap junction connexin43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell Tissue Res* 298:113–121.
- Bukauskas FF, Elfgang C, Willecke K, Weingart R. 1995. Heterotypic gap junction channels (connexin26-connexin32) violate the paradigm of unitary conductance. *Pflügers Arch* 429:870–872.
- Berkowitz AS, Lloyd JA, Chowdhury M. 1979. Effects of the method of exsanguination on measurements of developmental changes in serum concentrations of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in prepubertal and adult male house mice. *J Endocrinol* 83:6166.
- Byers S, Graham R, Dai HN, Hoxter B. 1991. Development of Sertoli cell junctional specializations and the distribution of the tight junction associated protein ZO-1 in the mouse testis. *Am J Anat* 191:35–47.
- Byers SW, Pelletier RM. 1991. Sertoli-Sertoli cell tight junctions and the blood-testis barrier. In: Cereijido M, editor. *Tight junctions*. Boca Raton: CRC Press Inc. p 279–304.
- Chanson M, Fanjul M, Bosco D, Nelles E, Suter S, Willecke K, Meda P. 1998. Enhanced secretion of amylase from exocrine pancreas of connexin32-deficient mice. *J Cell Biol* 141:1267–1275.

- Dupont E, Labrie E, Luu-The V, Pelletier G. 1993. Ontogeny of 3-hydroxysteroid dehydrogenase (3- β HSD) isomerase in rat testis as studied by immunocytochemistry. *Anat Embryol* 187:538–589.
- Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hulser DF, Willecke K. 1995. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129:805–817.
- Elenes S, Rubart M, Moreno AP. 1999. Junctional communication between isolated pairs of canine atrial cells is mediated by homogeneous and heterogeneous gap junction channels. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10:990–1004.
- Enders GC, May JJ II. 1994. Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. *Dev Biol* 163:331–340.
- Flickinger C. 1967. The postnatal development of the Sertoli cells of the mouse. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 78:92–113.
- Giepmans BN, Moolenaar WH. 1998. The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr Biol* 8:931–934.
- Gilula NB, Fawcett DW, Aoki A. 1976. The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis. *Dev Biol* 50:142–168.
- Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL. 1989. Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology* 124:762–770.
- Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM. 1999. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 60:1263–1270.
- Kawa K. 1987. Existence of calcium channels and intercellular coupling in the testosterone-secreting cells of the mouse. *J Physiol (Lond)* 393:647–666.
- Mason JI, Ushijima K, Doody KM, Nagai K, Naville D, Head JR, Milewich L, Rainey WE, Ralph MM. 1993. Regulation of expression of the 3- β hydroxysteroid dehydrogenases of human placenta and fetal adrenal. *J Steroid Biochem Mol Biol* 47:151–159.
- McGinley DM, Posalaky Z, Porvaznik M, Russell L. 1979. Gap junctions between Sertoli and germ cells of rat seminiferous tubules. *Tissue Cell* 11:741–754.
- Mok BW, Yeung WS, Luk JM. 1999. Differential expression of gap-junction gene connexin 31 in seminiferous epithelium of rat testes. *FEBS Lett* 453:243–248.
- Munari-Silem Y, Rousset B. 1996. Gap junction-mediated cell-to-cell communication in endocrine glands-molecular and functional aspects: a review. *Eur J Endocrinol* 135:251–264.
- Murray SA, Fletcher WH. 1984. Hormone-induced intercellular signal transfer dissociates cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Cell Biol* 98:1710–1719.
- Nebel BR, Amrose AP, Hackett EM. 1961. Calendar of gametogenic development in the prepubertal male mouse. *Science* 134:832–833.
- Nagano T, Suzuki F. 1976. The postnatal development of the junctional complexes of the mouse Sertoli cells as revealed by freeze fracture. *Anat Rec* 185:403–418.
- Ogasawara Y, Yamane T, Kitamura Y, Uchida K, Wakabayashi K, Matsumoto K. 1984. Inhibition of luteinizing hormone secretion during quiescent interval of testicular androgen production in immature mice. *J Steroid Biochem* 20:563–567.
- Okamoto S, Takatsuka D, Tateishi K, Ogasawara Y, Yamane T, Kitamura Y, Matsumoto K. 1982. Proliferative pattern of seminal vesicle cells and the production of testosterone and 5 α -androgens from birth to adulthood in mice. *Endocrinology* 111:1230–1234.
- Orth JM, Boehm R. 1990. Functional coupling of neonatal rat Sertoli cells and gonocytes in coculture. *Endocrinology* 127:2812–2820.
- Oh S, Rubin JB, Bennett MVL, Verselis VK, Bargiello TA. 1999. Molecular determinants of electrical rectification of single channel conductance in gap junctions formed by connexins 26 and 32. *J Gen Physiol* 114:339–364.
- Oyoyo UA, Shah US, Murray SA. 1997. The role of α_1 (connexin-43) gap junction expression in adrenal cortical cell function. *Endocrinology* 138:5385–5397.
- Payne AH, Youngblood GL. 1995. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod* 52:217–225.
- Pelletier RM. 1996. The distribution of Connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of the Sertoli, cell junctional barrier in continual (guinea pig and seasonal Breeders (Mink) testes. *J Androl* 16:400–409.
- Pelletier RM, Byers SW. 1992. The blood testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Tech* 20:3–33.
- Pérez-Armendariz EM, Romano M, Luna J, Miranda C, Bennett MVL, Moreno AP. 1994. Characterization of gap junctions between pairs of Leydig cells from mouse testis. *Am J Physiol* 267:C570–C580.
- Pérez-Armendariz EM, Luna J, Aceves C, Tapia D. 1995. Cx26, Cx32 and Cx43 are expressed in mammary glands from virgin, pregnant and lactating animals. *Dev Growth Differ* 37:421–431.
- Pérez-Armendariz EM, Luna J, Miranda C, Talavera D, Romano MC. 1996. Luteinizing and human chorionic gonadotropin hormones increase intercellular communication and gap junctions in cultured mouse Leydig cells. *Endocrinology* 4:1–10.
- Plum A, Hallas G, Margin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher G, Wolpert C, Kim J-S, Lamers WH, Evert M, Meda P, Traub O, Willecke K. 2000. Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol* 10:1083–1091.
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J. 1995. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267:1831–1834.
- Risley M, Tan IO, Roy C, Saéz JC. 1992. Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J Cell Sci* 103:81–96.
- Risley MS. 2000. Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biol Reprod* 62:748–754.
- Russell LD. 1996. Structure and development. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD, editors. *The Leydig cell*. Vienna, IL: Cache River Press. p 43–96.
- Saéz JC, Connor JA, Spray DC, Bennett MVL. 1989. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2708–2712.
- Saéz JC, Nairn AC, Czernik AJ, Fishman GI, Spray DC, Hertzberg EL. 1997. Phosphorylation of connexin43 and the regulation of neonatal rat cardiac myocyte gap junctions. *J Mol Cell Cardiol* 29:2131–2145.
- Segaloff DL, Ascoli M. 1993. The lutropin/choriogonadotropin receptor: four years later. *Endocr Rev* 14:324–347.
- Steger K, Tetens F, Bergmann M. 1999. Expression of connexin 43 in human testis. *Histochem Cell Biol* 112:215–220.
- Sufi SB, Donaldson A, Jeffcoate SL. 1986. World Health Organization. Special program of research, development and research training in human reproduction. Program for the provision of matched assay reagents for the radio immunoassay of hormones in reproductive physiology. *Methods manual*, 10th ed. Geneva: WHO.
- Tan IP, Roy C, Saéz JC, Saéz CG, Paul DL, Risley MS. 1996. Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli gap junctions. *Biol Reprod* 54:1300–1310.
- Traub O, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Elfgang C, Bastide B, Scheidtmann KH, Hulser DF, Willecke K. 1994. Immunocytochemical and electrophysiological characterization of murine connexin40 and -43 in mouse tissues and transfected human cells. *Eur J Cell Biol* 64:101–112.
- Tsien RW, Weingart R. 1974. Cyclic AMP: cell-to-cell movement and inotropic effect in ventricular muscle, studied by a cut-end method. *J Physiol (Lond)* 242:95P–96P.
- Varanda WA, de Carvalho AC. 1994. Intercellular communication between mouse Leydig cells. *Am J Physiol* 267:C563–C569.
- Vergoween RPPA, Jacobs SGOM, Huiskamp R, Davids JAG, de Rooij DG. 1991. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil* 93:233–243.
- Vergoween RPPA, Huiskamp R, Bas RJ, Roepers-Gajadien HL, Davids JAG, de Rooij DG. 1993. Postnatal development of testicular cell populations in mice. *J Reprod Fertil* 99:479–485.
- Vigier B, Picard JY, Campargue J, Forest MG, Heyman Y, Josso N. 1985. Secretion of anti-Mullerian hormone by immature bovine Sertoli cells in primary culture studied by a competition-type radioimmunoassay: lack of modulation by either FSH or testosterone. *Mol Cell Endocrinol* 43:141–150.

DISCUSIÓN

En los estudios incluidos en la presente tesis, hemos demostrado por primera vez que la Cx43 se expresa en la gónada indiferenciada en el testículo fetal y en el testículo neonatal y prepuberal. También demostramos que la Cx43 forma uniones intercelulares homocelulares entre las células intersticiales de Leydig y entre las parenquimatosas de Sertoli, así como uniones heterocelulares entre las células de Sertoli y las células germinales durante la vida fetal, neonatal y prepuberal. También demostramos que la expresión de la Cx43 en las células de Leydig y de Sertoli se modula *in vivo* en una forma que depende de la edad durante los periodos neonatal y prepuberal. Los resultados de esta tesis dan información original relevante sobre la expresión de la Cx43 durante el desarrollo embrionario y prepuberal. Estos hallazgos permiten ampliar nuestra comprensión sobre los posibles mecanismos mediante los cuales la pérdida de la Cx43 induce infertilidad. También se proveen evidencias experimentales consistentes con la hipótesis de que la Cx43 participa en el control de la esteroidogénesis.

Especificidad de la detección de la Cx43 en el testículo durante las diferentes etapas de su desarrollo

Concluimos que la tinción inmunofluorescente de los cortes de testículo refleja la expresión de la Cx43 durante la ontogenia del ratón con base en las siguientes evidencias aquí presentadas: a) Se observó un patrón similar de la marca en el intersticio y en el túbulo en las diferentes edades del desarrollo usando tres diferentes anticuerpos dirigidos contra secuencias específicas de la Cx43, de acuerdo a una búsqueda realizada en la base de datos de secuencias BLAST; b) El anticuerpo policlonal F199 generado en el laboratorio de la Dra. Pérez Armendariz, el anticuerpo policlonal 71-0700 y el anticuerpo monoclonal MAB3068, detectan bandas de 40-45 kDa en preparaciones de inmunoblots de homogenados totales de testículo adulto y de corazón, así como en los de células HeLa transfectadas con la Cx43, éstos dos últimos utilizados como controles positivos. Estos anticuerpos no detectaron estas bandas en los homogenados totales de células HeLa transfectadas con la Cx40, ni en homogenados de hígado que fueron utilizados como controles negativos. Las bandas de 40 y 45 kDa detectan la Cx43 en su forma no fosforilada y fosforilada (Moreno et al., 1994), c) la marca encontrada en las células testiculares aquí mostrada con el anticuerpo Cx43-F100, fue eliminada cuando las secciones fueron preincubadas conjuntamente con el péptido inmunogénico, d) El patrón de expresión de la Cx43 en el testículo adulto aquí mostrado por inmunofluorescencia, es similar al previamente reportado por otros autores (ver introducción); y e) La expresión de la Cx43 en las células de Leydig, células de Sertoli y células germinales en el testículo de ratón adulto, es consistente con la reciente localización del transcripto de la Cx43 en estos tipos celulares por hibridación del RNAm *in situ* (Batias et al., 2000).

Especificidad en la detección de la enzima 3 β -HSD

En el presente trabajo se utilizaron dos anticuerpos policlonales dirigidos contra la 3 β -HSD producidos en diferentes laboratorios de investigación (Mason et al., 1997; Luu-The, et al., 1989). La localización de esta enzima en el espacio intersticial y su cambio durante el desarrollo encontradas con ambos anticuerpos, fueron similares tanto en la vida fetal como postnatal. Estos anticuerpos reconocen por inmunoblot bandas de 40-46 kDa, su secuencia de cDNA se encuentra entre los 1.37 y 1.7 Kb (Mason et al., 1997; Luu-The, et al., 1989). En el testículo adulto, se ha detectado para esta enzima un peso molecular de 42 kDa por estudios de inmunoblots (Baine et al., 1991; Luu-The et al., 1989). La enzima 3 β -HSD es un componente esencial para la biosíntesis de todas los esteroides activos incluyendo los andrógenos. Diferentes isoformas de la enzima 3 β -HSD han sido identificadas en el testículo del ratón (Keeney et al., 1993). Los testículos neonatales solamente expresan la isoforma tipo 1, mientras que el testículo en el adulto expresa las isoformas tipo 1 y tipo IV (Baker et al., 1999). El hecho de que los dos anticuerpos policlonales utilizados inmuno-tiñeron tanto las células de Leydig fetales como postnatales, indica que reconocen ambas isoformas de la 3 β -HSD.

Especificidad de la unión de los anticuerpos contra la hormona inhibidora muleriana y el antígeno germinal nuclear

Los anticuerpos utilizados en la presente tesis contra la hormona inhibidora Muleriana (MIH), y el anticuerpo germinal nuclear, fueron generados y han sido ampliamente caracterizado por la Dra. Nathalie Josso, y por el Dr. George C. Enders, respectivamente. El anticuerpo contra la MIH, reconoce bandas de 140 a 200 kDa que corresponden a los pesos moleculares identificados en esta hormona (Picard y Josso, 1976). El anticuerpo contra el antígeno nuclear (GNCA1), se generó por la técnica de hibridomas y se sabe que reconoce a las células germinales fetales y diferenciadas en el testículo adulto hasta la etapa de diploteno (Enders y May II, 1994).

La Cx43 se expresa desde las etapas más tempranas del desarrollo gonadal.

Como se mencionó, existen evidencias por microscopia electrónica de imágenes consistentes con la existencia de uniones comunicantes en la gónada indiferenciada (Just et al., 1981), no obstante, a la fecha se ignoraba completamente su identidad molecular. Nuestros resultados permiten proponer que la Cx43 es uno de sus componentes moleculares ya que en el presente estudio localizamos la Cx43 en zonas de aposición membranal en la gónada indiferenciada al día 11.5 dpc. Esta se localizo entre las membranas de las células precursoras somáticas así como entre éstas y las germinales (GNCA1 positivas), formando pequeñas placas, semejantes a las detectadas por inmunofluorescencia en las uniones comunicantes descritas en otros tejidos.

La conexina 43 se expresa entre las células de Leydig y su expresión tiene un patrón que se modula con la edad durante el desarrollo fetal.

Las uniones comunicantes se han descrito en el testículo embrionario (Nagano and Suzuki, 1976). No obstante se ignoraba su composición molecular. En el presente trabajo mostramos también por primera vez que las Cx43 se expresan en las células del intersticio del testículo fetal. Demostramos que de las células intersticiales, la Cx43 se expresa en las células de Leydig. En esta tesis demostramos que la Cx43 se expresa en estas células desde los estadios más tempranos de su diferenciación a testículo, esto es, al día 12.5 postcoitum. Más aún, demostramos que la expresión de la Cx43 en el intersticio se incrementa durante la vida embrionaria, y que este aumento resulta de su mayor expresión en las células de Leydig con base a las siguientes evidencias: a) La expresión de la Cx43 se localiza espacial y temporalmente correlacionada con un incremento en la marca de la 3β -HSD detectada en secciones paralelas a los 12, 14, 16, 18 dpc. b) La Cx43 fue indudablemente localizada en células 3β -HSD-positivas en secciones de testículo procesadas por doble marcaje en todas las edades fetales estudiadas. c) La marca fluorescente para la Cx43 no fue detectada en otras células intersticiales que rodean a las células 3β -HSD positivas. No obstante, el hecho de que la marca de la Cx43 se detecta en los bordes entre células 3β -HSD-positivas y 3β -HSD negativas, sugiere que las células de Leydig puedan formar uniones homoméricas o heteroméricas con células mesenquimatosas y las precursoras de las células de Leydig. También encontramos que el incremento en el número de células de Leydig y en la expresión relativa de la Cx43 en estas células con la edad, se correlaciona con el contenido de testosterona durante la vida fetal descrito previamente por O'Shaughnessy et al., (1998). Esta correlación sugiere que la Cx43 pueda estar modulando el desarrollo de este tipo celular. Dado que en el ratón no se ha descrito la expresión del receptor a la LH en la etapa temprana del desarrollo fetal (ver introducción), es posible que otros factores puedan estar participando en su regulación. No obstante, dado que a partir del día 16 dpc, ya se detectan tanto el receptor a la LH, así como la LH intrapituitaria y sérica, es posible que el máximo de la expresión de esta conexina detectado al final de la vida fetal, también esté siendo modulado por la LH.

Expresión de la Cx43 en las células de Leydig durante el periodo postnatal.

Durante la vida postnatal también demostramos que la Cx43 intersticial resulta principalmente de su expresión en las células de Leydig, así como el que su expresión se modula en una forma que depende de la edad y del estado funcional celular. Esto se concluye con base a las siguientes observaciones que se presentan en esta tesis: a) A que en el espacio intersticial a todas las edades de desarrollo postnatal se encontró en las células 3β -HSD positivas y no en otras del espacio intersiticial utilizando estudios de doble marcaje en los periodo neonatal y prepuberal, puberal y adulto. b) A que se incrementó la densidad

de puntos inmunofluorescentes durante el desarrollo postnatal, c) a que documentamos que existe una correlación en la expresión de la Cx43 con el número de células 3 β -HSD positivas y los niveles de testosterona intratesticular a los 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 60 días postnatales.

Se ha documentado que la LH y hCG *in vitro*, además de incrementar la secreción de testosterona, incrementa la expresión de la Cx43 y la comunicación intercelular en las células de Leydig (Pérez Armendariz et al., 1996). También el que la LH tiene una curva bifásica durante el desarrollo postnatal (Berkowitz et al., 1979; Ogasawara et al., 1984). El curso temporal bifásico en la expresión de la Cx43, la 3 β -HSD y la testosterona durante el desarrollo postnatal que se describe en esta tesis, también están correlacionados con el curso bifásico de la concentración de LH sérica. De ahí que nuestros resultados nos permiten proponer la hipótesis de que *in vivo* la LH puede ser la señal que regule la modulación de la Cx43 durante el desarrollo postnatal (Bravo Moreno et al., 2001).

Un posible mecanismo por el cual las uniones comunicantes pueden incrementar la liberación de testosterona, podría darse por la transferencia intercelular del AMPc (*ver sección 6.5*), inducida por la activación del receptor a LH en algunas células de Leydig de un conglomerado de células heterogéneas, hacia otros del mismo conglomerado que no expresan receptores a LH o tienen un número de estos muy bajo (*ver sección 7.2*). De esta forma la señal requerida para la secreción de testosterona sería recibida por una número mayor de células del agregado.

Vale la pena subrayar que el hecho de que la expresión de la Cx43 ocurra correlacionada con el contenido intratesticular de testosterona a todo lo largo de la vida fetal como postnatal, apoya la hipótesis de que esta conexina puede estar jugando un papel en el control de la esteroidogénesis. En contra de este argumento se encuentra el resultado de que los niveles de secreción de testosterona inducidos por LH no fueron diferentes entre testículos fetales de animales Cx43-KO y silvestres cuando estos fueron transplantados a un animal huésped por 21 días (*ver arriba*). No obstante, como ya se mencionó, a los 21 días de vida postnatal se encuentran los niveles mínimos de expresión de esta conexina y del receptor a la LH. De ahí que este resultado negativo no invalida la hipótesis de que la Cx43 puede regular la secreción de testosterona.

Detección de la Cx43 en las células de los cordones seminíferos del periodo fetal.

Existen evidencias previas que indican que la Cx43 juega un papel crítico para el desarrollo embrionario de las células germinales (*ver introducción*). No obstante, los mecanismos celulares responsables de su participación en este aspecto se desconocen. Los siguientes resultados, obtenidos en el desarrollo de la primer parte de esta tesis representan información relevante para la elucidación de estos posibles mecanismos, ya que describimos por primera vez que: (1) En la gónada indiferenciada al día 11.5 dpc, existen contactos heterocelulares mediados por la Cx43 entre las células germinales precursoras,

identificadas con el anticuerpo GCNA1, y las precursoras de las células somáticas, presumiblemente, las células pre- Sertoli; (2) Después de la diferenciación sexual gonadal, hay contactos mediados por la Cx43 entre las células germinales y las células de Sertoli, los cuales se mantienen a través de la vida embrionaria, y (3) En el cordón, la Cx43 se expresa entre las células de Sertoli desde el inicio de su diferenciación celular, 4) En los intersticios, la Cx43 se expresa entre las células de Leydig desde su diferenciación celular y 5) En las células de Sertoli como de Leydig, la expresión de la Cx43 se modula durante la vida fetal.

Las células de Sertoli comienzan a proliferar al día 14.5 dpc alcanzando su máxima proliferación entre el día 16.5 y el 18.5dpc, al final de la vida embrionaria (Vergoween et al., 1991). El presente estudio muestra que, temporalmente correlacionado con estos cambios, hay un incremento en la densidad del punteado fluorescente de la Cx43 en las células de Sertoli. Estos datos sugieren el que la expresión de la Cx43 se modula en estas células durante el desarrollo. Los cambios en los niveles de la Cx43 en las células de Sertoli durante la vida fetal, pueden resultar de su mayor aposición celular y pueden tener un efecto en la producción o liberación de los productos secretorios. El incremento en las placas de unión comunicante durante el desarrollo ha sido descrito en células epiteliales de otros tejidos (Pérez-Armendariz et al., 1995; Pitelka et al., 1973; Yamamoto and Kataoka, 1988).

En cuanto a las células germinales, se sabe por estudios previos en el testículo de ratón, que éstas se localizan después del día 14.5 dpc en el centro de los cordones seminíferos (Vergoween et al., 1991) y que las células de Sertoli localizadas en la periferia extienden sus procesos citoplasmáticos para establecer contactos con las células germinales (McGinley and Posalakay, 1986). El hallazgo presentado en esta tesis de que en el centro de los cordones seminíferos encontramos la marca inmunofluorescente de la Cx43 en proyecciones membranales de células MIH positivas rodeando a células MIH negativas con núcleos grandes y nucleolo prominente que son característicos de las células germinales, indica la existencia de contactos heterocelulares mediados por la C43 entre las células de Sertoli y las células germinales. Su existencia entre estos tipos celulares está sustentada por la identificación de la marca de la Cx43 en las zonas de aposición entre las células GCNA1 y las células MIH en todas las edades embrionarias. Por otra parte, debido a que en los cordones seminíferos únicamente se localizan las células de Sertoli y las células germinales, es posible proponer que hay canales homoméricos o heteroméricos formados por la Cx43 entre estos tipos celulares. No obstante, para demostrar este punto se requiere de estudios de microscopía electrónica.

Las células germinales primordiales se detectan primeramente a los 7-8 dpc en ratón, como una población de células identificadas por la reacción de la fosfatasa alcalina en tejidos embrionarios cercanos a la base del alantoides (Enders and May, 1994; Richards et al., 1999). Estas migran a través del mesenterio dorsal hasta la cresta genital. Durante su migración proliferan (Gomperts et al., 1994)

alcanzando la gónada al día 11.5dpc. En el macho, las células germinales primordiales continúan su proliferación dentro de la gónada, hasta el día 16.5 dpc, día en el cual se vuelven mitóticamente aquiescentes hasta poco después del nacimiento cuando reasumen la mitosis (Vergoween et al., 1991). Paralelo a la proliferación, durante el primer día de la vida embrionaria, las células germinales están sometidas a la muerte celular programada (Rucker et al., 2000). En otros sistemas celulares, hay evidencia de que la Cx43 puede participar en la regulación de la migración (Asthon et al., 1999; Banerman et al., 2000; Huang et al., 1998; Mc Donough et al., 1999) la mitosis y la apoptosis (Andrade-Rozental et al., 2000; Kanemetsu et al., 1998; Wilson et al., 2000; Xie et al., 1997).

Los ratones deficientes en la expresión de la Cx43, muestran una disminución significativa en el número de las células germinales a través de la vida embrionaria. La Cx43 puede ser localizada desde la muy temprana edad de 11.5 dpc (Juneja et al., 1999). Esta situación permitió a estos investigadores el proponer que la Cx43 posiblemente puede inducir alteraciones en la migración de los precursores de las células germinales. Los hallazgos presentados en esta tesis en cuanto a la identificación de contactos de la Cx43 homocelulares entre las células de Leydig y entre las células de Sertoli, así como también de contactos heterocelulares de la Cx43 entre las células germinales y las células de Sertoli, desde los estadios más tempranos de la vida embrionaria, así como a todo lo largo del desarrollo fetal, nos permiten proponer la hipótesis de que la Cx43 puede también participar en el control del desarrollo de la población de células germinales dentro de la gónada.

Localización de la Cx43 en los túbulos seminíferos del periodo postnatal.

Durante el periodo neonatal y prepuberal se reinicia la mitosis de las células germinales y se da inicio a la espermatogénesis. La existencia de las uniones comunicantes entre las células de Sertoli neonatales del ratón ha sido documentada (Nagano and Suzuki, 1976). No obstante, nuevamente se desconocía su identidad molecular. Los resultados de la presente tesis nos permiten demostrar que uno de estos componentes es la Cx43. El presente estudio provee evidencia por vez primera de que la Cx43 se expresa en las células de Sertoli del ratón recién nacido. También el que esta conexina se expresa y se modula en estas células durante la etapa prepuberal y durante la primera onda de espermatogénesis. Su expresión en este sitio durante los primeros días de vida postnatal (0-3 dpp) fue documentada por estudios de doble marcaje en donde la Cx43 se localizó en las proyecciones citoplasmáticas de las células de Sertoli o en las MIH positivas. También por la localización de la marca Cx43 en el cordón o tubo seminífero con respecto a la marca producida por el anticuerpo contra el antígeno GNCA1. Este doble marcaje se utilizó durante todo el periodo prepuberal y fue particularmente útil para las fechas 7 y 14 dpp, ya que la expresión de la MIH a estas fechas de desarrollo disminuye. Con esta estrategia encontramos que a partir de que se inicia la espermatogénesis al día 3 dpp, comienza a modularse la expresión de la Cx43. Los

cambios de la distribución espacial de la Cx43 en las células de Sertoli de la región apical (3dpp) a su dominio basal (14dpp) aquí presentados, se correlacionan con la diferenciación de un epitelio no polarizado a un epitelio polarizado (Vergoween et al., 1991). Se sabe que al final de la segunda semana postnatal (14 dpp) el lumen del túbulo se forma (Flickinger, 1967), mientras que las uniones estrechas y las uniones comunicantes detectadas por microscopía electrónica (Gilula et al., 1976; Nagano and Suzuki, 1976) cambian de una región apical, a una región basal en las células de Sertoli. La correlación temporal entre estos cambios con la distribución variable de la localización de la Cx43 con respecto a la membrana basal o apical, detectada entre los diferentes túbulos seminíferos de un testículo de 14 dpp, mostrada en esta tesis, sugiere que esta modulación está reflejando una redistribución de esta conexina durante la formación de la barrera hematotesticular. Esta interpretación también es sustentada por el hallazgo de que conjuntamente con la redistribución de la Cx43 de la zona apical a la basal ocurren en paralelo una translocación de las células germinales o GNCA1 positivas del compartimiento basal al apical. En resumen, la abundante expresión de la Cx43 en el testículo neonatal y prepuberal y su modulación importante en las células de Sertoli descrita en esta tesis durante la vida neonatal y prepuberal, son consistentes con el papel regulador de esta conexina para el proceso de espermatogénesis.

Finalmente, en la presente tesis también se presentaron por primera vez evidencias utilizando estudios de doble marcaje en secciones de tejidos, sobre la posible existencia de uniones heterocelulares entre células de Sertoli y germinales durante los periodos neonatal, prepuberal y durante la primera onda de espermatogénesis. La existencia de la marca de la Cx43 que media contactos heterocelulares entre las Sertoli y las células germinales, es consistente con los recientes hallazgos en donde observaron por hibridación *in situ* el transcritto de la Cx43 entre las células germinales y las células de Sertoli (Batias et al., 2000). Esto también es consistente con la descripción de los estudios de transferencia intercelular de un indicador fluorescente (Orth and Boehm, 1990) observados entre las células de Sertoli y las células germinales a los días 4 y 6 dpp. Estos resultados indican la interacción directa entre estos dos tipos celulares durante estos periodos críticos para la diferenciación de las células germinales.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

• ABREVIATURAS

- **ACTH.-** Hormona adrenocorticotrópica.
- **ADNc.-** ADN complementario.
- **AMPC.-** Adenosil de monofosfato ciclico.
- **[Ca]²⁺ .-** Concentración del ión calcio
- **Cx.-** Conexina
- **FSH.-** Hormona Foliculo estimulante
- **FITC.-** Tiocianato de fluoresceína.
- **GH.-** Hormona de crecimiento.
- **G_j.-** Conductancia de unión macroscópica normalizada.
- **GnRH.-** Hormona liberadora de las gonadotropinas
- **hCG.-** Gonadotropina coriónica humana
- **IP-3** Inositol trifosfato.
- **LH.-** Hormona luteinizante
- **MIH.-** Hormona anti-Muleriana
- **PKA.-** Proteina cinasa A.
- **Ratones FORKO.-** Ratones deficientes en el gen del receptor a la hormona FSH (Follicle-stimulating hormone Knockout).
- **Ratones hpg.-** Ratones hipogonádicos, son ratones deficientes en el gen de la hormona liberadora de las gonadotropinas.
- **Ratones LURKO.-** Ratones deficientes en el gen del receptor para la hormona LH (Luteinizing Hormone Receptor Knockout Mice).
- **Ratones ROSA 26.-** No tiene todavía traducción al español, en ingles sus siglas indican “reverse orientation splice acceptor”.
- **SF-1.-** Factor de transcripción esteroideogénico tipo uno.
- **TGF-β.-** Factor de crecimiento transformante beta.
- **TGF-α.-** Factor de crecimiento transformante alfa.
- **3β-HSD/Δ⁵- Δ⁴ .-** 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa, delta 5, delta 4 isomerasa.
- **17β-HSD/KSR.-** 17 hidroxisteroide deshidrogenasa/cetosteroide reductasa
- **P450 17α-citocromo P450** alfa-hidroxilasa.
- **P450scc.-** Citocromo P450 liberadora de la cadena lateral.

- V_0 .- en experimentos de fijación de voltaje, es el Voltaje al cual se obtiene la mitad del valor máximo de conductancia (G_j) de acuerdo a la ecuación de Boltzman.
- $g_j / (g_j + g_{nj}) =$ Coeficiente de acople, donde $g_j =$ conductancia de unión, y $g_{nj} =$ conductancia que no proviene de las uniones comunicantes o de no unión.

BIBLIOGRAFIA

- Acampora, D., Mazan, S., Tuorto, F., Avantaggio, V., Tremblay, J. J., Lazzaro, D., Carlo, A., Mariano, A., Macchia, P.E., Corte, G., Macchia, V., Drouin, J., Brulet, P. (1998). Transient dwarfism and hypogonadism in mice lacking OTK) reveal prepubescent stage-specific of pituitary levels of GH, FSH and LH. *Development*. 125: 1229-1239.
- Ackland, J. F., Shwartz, N. B. (1991). Changes in serum immunoreactive inhibin and follicle-stimulating hormone during gonadal development in male and females rats. *Biol. Reprod.* 45: 295-300.
- Anawkwe, O. O., Moger, W. H. (1984). Ontogeny of rodent testicular androgen production in response isoproterenol and luteinizing hormone in vitro. *Biol. Reprod.* 30: 1142-1152.
- Andrade-Rozental, A. F., Rozental, R., Hopperstand, M. G., Wu, J. K., Vrionis, F. D., Spray D. C. (2000). Gap junctions: the "Kiss of death" and the "Kiss of life". *Res. Brain. Res. Rev.* 32: 308-315.
- Ashton, A. W., Yokot, John, G., Zhao, S., Suadacini, S. O., Spray D. C., Ware, J. A. (1999). Inhibition of endothelial cell migration, intercellular communication, and vascular tube formation by thromboxane A(2). *J. Biol. Chem.* 274: 35562-35570.
- Attar, L.A., Noel, K., Duterte, M., Belville, C., Forest, M. G., Burgoyne, P. S., Josso, N., Rey, R. (1997). Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-mullerian hormone production in the posnatal mouse. *J. Clin. Invest.* 100: 1335-1343.
- Baccetti, B., Collo, G., Costatin-Cecarini, E., Eskhol, A., Gamberg, L., Morett, E., Strazza, M., Piombon. P. (1998). Localization of human follicle-stimulating hormone in the testis: *FASEB J.* 12: 1045-1054.
- Baine, P.A., Yoo, M., Clarke, T., Hammond, S.H., Payne, A.H. (1991). Multiple forms of the mouse 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and differentiated expresión in gonads, adrenal glands, liver and kydneyes of both sexes. *Proc Natl Acad Sci.* 88: 8870-8874.
- Baker, P. J., & O'Shaugnessy, P. J. (2001). Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and sertoli cells during fetal and posnatal development in mice. *Reproduction.* 122: 227-234.
- Baker, P. J., Sha, J. A., McBride, M. W., Peng, L., Payne, A. H., O'Shaugnessy P. J. (1999). Expression of 3Beta-hidroxyteroid dehydrogenase type I and type II isoforms in the mouse testis during development. *J. Biochem.* 260: 911-917.
- Bannerman, P., Nichols, W., Puballa, S., Oliver, T., Berman, M., Pleasure, D. (2000). Early migratory rat neuronal crest cell express functional gap junctions: evidence that neuronal crest cell survival requires gap junction function. *J. Neurosci. Res.* 61: 605-615.
- Batias, C., Defamie, N., Lablack, A., Theport, D., Fenichel, P., Segretain, D., and Pointis, G. (1999). Modified expression of testicular gap junction connexin43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell Tissue Research.* 298: 113-121.
- Bennet M. V. L., Barrio L. C., Bargiello T. A., Spray D. C., Hertzberg, E., Saez, J. C. (1991). Gap Junctions: New Tools, New Answer, New Questions. *Neuron.* 6: 305-320.
- Benton, L., Shan, L. X., Hardy, M. P. (1999). Differentiation of adult Leydig cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 53: 61-68.
- Bergh, A. (1982). Local differences in Leydig cell morphology in the adult rat testis: evidence for local control of Leydig cells by adjacent seminiferous tubules. *Int. J. Androl.* 5: 325-330.

- Berkowitz, A. S., Lloyd, J. A., and Chowdhury, M. (1979). Effects of the method of exsanguination on measurements of developmental changes in serum concentrations of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in prepubertal and adult male house mice. *J. Endocr.* 83: 61-66.
- Bhalla, K. V., Flash, M. V., Browne, E. S., Sohal, G. S., Sharawy, M. M. (1987). Interstitial cell heterogeneity in rat testes. *J. Biol. Chem.* 262: 5322-5332.
- Boitani, P. J., Steffani, M., Fragale, A., Morena, A. R. (1995). Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis. *Endocrinology.* 136: 5438-5444.
- Bravo Moreno, J.F., Sanchez, V. D., Montoya-Flores, J. G., Lamoyi, E., Saez, J. C., Pérez-Armendariz, E. M. (2001). Expression of connexin 43 in mouse Leydig, Sertoli, and germinal cells at different stages of postnatal development. *The Anatomical Record.* 264: 13-24.
- Bremner, W. J., Millar, M. R., Sharpe, R. M., and Saunders, P. T. K. (1994). Immunohistochemical localization of androgens receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology.* 135: 1227-1234.
- Bruzzone, R., Whitte, T.W., Paul, D.L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 238: 1-27.
- Bukausakas, F. F., Elfgang, C., Willecke, K., Weingart, R. (1995). Heterotypic gap junction channels (connexin 26-32) violate the paradigm of unitary conductance. *Pflugers. Arch.* 429: 870-872.
- Burns, R.K. (1961). Role of hormones in the differentiation of sex: In: sex and internal secretions, edited by W.C. Young Baltimore, MD: Williams & Wilkins, p: 76-160.
- Byers, S., Graham, R., Dai, H. N., and Hoxter, B. (1991). Development of Sertoli cell junctional specializations and the distribution of the tight junction associated protein ZO-1 in the mouse testis. *Am. J. of Anatomy* 191: 35-47.
- Byskov, A.G. (1986). Differentiation of mammalian in embryonic gonad. *Physiol. Rev.* 66: 71-117.
- Carreau, S.V., Papadopoulus, V., and Drosowsky, M.A. (1988). Stimulation of adult rat Leydig cell aromatase activity by a Sertoli cell factor. *Endocrinology.* 122: 1103-1109.
- Caton D., Calabrese, A., Mas, C., Serre-Beinier, V., Charollais, A., Caille, D., Zufferey, R., Trono, D., Meda, P. (2003) Lentivirus-mediated transduction of connexin cDNAs shows level- and isoform-specific alterations in insulin secretion of primary pancreatic beta-cells. *J. Cell. Sci.* 116: 2285-94.
- Chalcroft, J. P., and Bullivant, S. (1970). An interpretation of liver cell membrane and junction structure based on observation of freeze fracture replicas of both sides of the fracture. *J. Cell. Biol.* 47: 49-60.
- Chanson, M., Fanjul, M., Bosco, D., Nelles, E., Suter, S., Willecke, K., and Meda, P. (1988). Enhanced secretion of amylase from exocrine pancreas of connexin32-deficient mice. *Cell. Biol.* 14: 1267-1275.
- Chase, D. J. and Payne, A. H. (1983). Changes in Leydig cell function during sexual maturation in the mouse. *Biol. Reprod.* 29: 1194-1200.
- Chaudhary, L.R., Stocco, D. M. (1996). Effect of different steroidogenic stimuli on protein phosphorylation and steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1094: 175-184.
- Chemes, H.E., Dym, M., Raj, H. G. M. (1979). The role of gonadotropins and testosterone on initiation of spermatogenesis in the immature rat. *Biol. Reprod.* 21: 241-249.

- Chubb, C., and Ewing, L. L. (1991). Leydig cell. In infertility in the male. (Lipshultz, L.I., and Howards, S.S., eds.) 2nd edition. Mosby Yearbook Medical Publishers, Inc, Chicago.
- Conn, P.M., McArdle, C.A., Andrews, W.V., Huckle, W.R. (1987). The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone GnRH action in the pituitary gonadotrope. *Biol. Reprod.* 36: 17-35.
- Cormack, D.H. (1988). *Traatado de Histología*. Ed. Interamericana. México.
- Corpechot, C., Baulieu, E.E., Robel, P. (1981). Testosterone, dihydrotestosterone and androstenediol in plasma, testes and prostates of rats during development. *Acta Endocrinologica.* 96: 127-135.
- Dahl, E., Manthey, D., Chen, Y., Schwarz, H. J., Chang, Y. S., Lalley, P. A., Nicholson, B. J., Willecke, K. (1996). Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *J. Biol. Chem.* 271: 17903-17910.
- Del Socorro-Retana M., Bonilla Jaime H., Vásquez Palacios G., Velazquez Moctezuma J (2001). Estrés y reproducción. En: *Biología de la Reproducción* Editado por: UAM-UNAM.
- Dupont, E., Labrie, E., Luu-The, V., and Pelletier, G. (1993). Ontogeny of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) isomerase in rat testis as studied by immunocytochemistry. *Anat. Embriol.* 187: 538-589.
- Elenes, S., Rubart, M., Moreno, A.P. (1999). Junctional communication between isolated pairs of canine atrial cells is mediated by homogeneous gap junction channels. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 10: 990-1004.
- Enders, G.C., and May, II, J. J. (1994). Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. *Develop. Biol.* 163 : 331-340.
- Ewing, L. L., Keene, D. S., Keene, D. S. (1993). Leydig cells :Structure and function. In: *Cell and Molecular Biology of the testis*" (Desjardin, C. & Ewing, L. eds.). Oxford University Press. pp: 137-165.
- Ewing, L.L., and Zirkin, B. (1983). Leydig cell structure and steroidogenic function. *Recent Prog. Hormone Res.* 39: 599-635.
- Faucher, J. C. H., Berger, M., Turckheim, de M., Veysiere, G., Jean, C. I. (1978). Development patterns of plasma and testicular testosterone in mice from birth to adulthood. *Acta Endocrinologica.* 89: 780-788
- Fawcett, D.W. (1975). Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In: *Grrep RO (ed) Handbook of Physiology, sect / vol 5, Williams and Wilkins, Baltimore, PP 21-25.*
- Filippini, A., Lienard, M. O., Aorval, I., Le, G., Lejeune, H., Jegpu, H. (2002). Control and impairment of immune privilege in the testes and in semen. *Human Reprod. Update.* 7: 444-449.
- Fletcher, W.H., Greenan, R.T. (1985). Receptor mediated action without receptor occupancy. *Endocrinology.* 116: 1660-1662.
- Flickinger, C. (1967). The postnatal development of the Sertoli cells of the mouse. *Z. Zellforsch.* 78: 92-113.
- Fouquet, J. P. (1987). Ultrastructural análisis of a local regulation of Leydig cells in adult monkey (*macaca fascicularis*) and rat. *J.Reprod. Fétil.* 79: 45-96.
- Friedrich, G., and Soriano, P.(1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes and Development.* 5: 1513-1523.
- Ge, R.S., Shan L.-X., Hardy, M. P. (1996). Pubertal development of Leydig cells. In "The Leydig Cell"(A.H., Payne, M.P., Hardy, and L.D., Russell, Eds). Cache River Press, pp: 159-174 .

- Giepmans, B. N., and Moolenaar, W. H., (1998). The gap junction protein connexin 43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr. Biol.* 8: 931-934.
- Gilula, N. B., Fawcett, D.W., and Aoki, A., (1976). The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis. *Develop. Biology*, 50: 142-168.
- Goodenough, H. D. A., Goliger, J. A., Paul, D.L. (1996). Connexins, connexons and intercellular communication. *Ann. Rev. Biochem.* 65:475-502.
- Gomperts, M., Garcia, C. M., Wylie, Ch., and Heasman, J. (1994). Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development*. 120: 135-141.
- Gore, A. C., Roberts, J. L., and Gibson, M. J. (1999). Mechanism for the regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the developing mouse endocrinology. 140: 2280-2287.
- Gilula, N.B., Fawcett, D.W., Aoki, A. (1976). The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis. *Developmental Biology* 50: 142-168.
- Greco, T. L., Payne, A. H. (1994). Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 α -hydroxylase/c17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinology*. 135: 262-268.
- Haefliger, J. A., Bruzzone, R., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Paul, D. L. (1992). Four novel members of the connexin family of gap junctions proteins. *J. Biol. Chem.* 267:2057-2064.
- Hardy, M. P., Zirkin, B. R., and Ewing, L. L. (1989). Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology*. 124: 762-770.
- Hedger, M.P. and Eddy, E.M. (1987). The heterogeneity of isolated adult rat Leydig cells separated on percoll density gradients: an immunological, cytochemical, and functional analysis. *Endocrinology*. 121: 1824-1838.
- Hennemann, H, Schwarz, H. J., Willecke, K. (1992). Characterization of gap junction genes expressed in F9 embryonic carcinoma cells: molecular cloning of mouse connexin31 and -45 cDNAs. *Eur. J. Cell Biol.* 57: 51-58.
- Herve, J.C., Bourmeyster, N., Sarrailhe, D. (2004). Diversity in protein-protein interactions of connexins: emerging roles. *Biochim Biophys Acta*. 1662: 22-41.
- Huang, G.Y., Cooper E.S., Waldo, K., Kirby, M.L., Gilula, N.B., Lo, C.W. (1998). Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neuronal crest migration. *J. Cell Biol.* 143:1725-1734.
- Huhtaniemi, I. (1994). Fetal testis-a very special endocrine organ. *Eur. J. Endocrinol.* 130: 25-31.
- Jhonston, H., Baker, P.J. Abel, M., Charlton, H.M., Jackson, G., Fleming, L., Kumar, T.R., O'Shaughnessy, P.J. (2004). Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle stimulating hormone (FSH) and androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology*. 145: 318-29
- Jiang, X., White, T.W., Goodenough, D.A. (1995). Changes in connexin expression and distribution during chick lens development. *Dev Biol.* 168: 649-661.
- Juneja, S. C., Barr, K. J., Enders, G.C., and Kidder, G. M., (1999). Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod.* 60: 1263-1270.
- Just, A., Magre, S., and Angelopoulou, R. (1981). Early stages of testicular differentiation. *Human genetic.* 58: 59-63.

- Kadle R, Zhang JT, Nicholson BJ. (1991). Tissue-specific distribution of differentially phosphorylated forms of Cx43. *Mol. Cell Biol.* 11: 363-369.
- Kanai, Y., Kanai-Azuma, M., Kurohmaru, M., Yazaki, K., Hayashi, Y. (1995). Effects of extracellular matrix on differentiation of mouse fetal gonads in the absence of mesonephros in vitro. *Microsc Res Tech.* 32: 437-48.
- Kanemitsu, M.Y., Jiang, W., Eckhart, W. (1998). Mediated phosphorylation of the gap-junction protein, connexin 43, during mitosis. *Cell Growth Differ.* 9: 13-21.
- Kari, J., Capel, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis origin from the coelomic epithelium. *Dev. Biol.* 15: 323-333.
- Kawa, K. (1987). Existence of calcium channels and intercellular couplings in the testosterone-secreting cells of the mouse. *J Physiol (Lond).* 393: 647-666.
- Keeney, D.S., Mason, J.I. (1992). Expression of testicular 3 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-4-isomerase: regulation by luteinizing hormone and forskolin in Leydig cells of adult rats. *Endocrinology.* 130: 2007-15.
- Keeney, D. S., Naville. D., Milewich, L., Bartke, A., and Mason, J. I. (1993). Multiple isoforms of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5 \rightarrow 4$ -isomerase in mouse tissues: Male-specific isoforms are expressed in the gonads and liver. *Endocrinology.* 133: 39-45.
- Kerr, J.B., Robertson, D.M., Kretser, D.M. (1985). Morphological and functional characterization of interstitial cells from mouse testis: fractions on Percoll density gradients. *Endocrinology:* 116: 1030-1043.
- Ketelslegers, J. M., Hetzel, W. D., Sherins, R. J., Catt, K. J. (1978). Development changes in testicular gonadotropin receptors: plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat. *Endocrinology.* 103: 212-222.
- Kumar. N. M., and Gilula N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell.* 84:381-388.
- Kuopio T., Tapanainen, J., Pelliniemi, L.J., Huhtaniemi, I. (1989). Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development.* 107: 213-220.
- Lamb, D. J. (1993) Growth factors and testicular development. *The Journal of Urology.* 150: 583-592.
- Leblond, C.P., and Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. NY. Acad. Sci.* 55: 548-573.
- Lejeune, H., Habert, R., Saez, J. M. (1998). Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *Journal of Molecular Endocrinology Reviews.* 20: 1-25.
- Luu-The, V., Lachance, Y., Labrie, C., Leblanc, G., Thomas, J.L., Strickler, R.C. Labrie, F. (1989). Full-length cDNA structure and deduced amino acid sequence of human 3 β -hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase. *Mol. Endocrinol.* 3: 1310-1312.
- Makowski, L., Caspar, D. L. D., Phillips, W. C., Goodenough, D. A. (1977). Gap junction structures. II Analysis of the X-ray diffraction data. *J. cell. Biol.* 74: 629-645.

- Manuela- Simoni, M., Gromoll, J., and Nieschalg, E. (1997). The follicle-stimulating hormone receptor. *Biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. Endocrine Reviews.* 18: 739-773.
- Mason, J. I., Ushijima, K., Doody, K. M., Nagai, K., Naville, D., Head, J. R., Milewich, L., Rainey, W. E., Ralph, M. M. (1993). Regulation of expression of the 3 β -hidroxysteroid dehydrogenase of human placenta and fetal adrenal. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 47: 151-159.
- Matsumara, P.D., Rodriguez, A.M., Castellanos, A.S.M., Aguirre, A.U. (2001). Papel de la glicosilación en la función de las hormonas hipofisarias. En: *Biología de la Reproducción* ed. Velasquez Moctezuma J UAM/UNAM. pp: 347-371.
- McDonough, W. S., Johansson, H., Joffe, H., Giese, A., Berens, M. E., (1999). Gap junction intercellular communication in gliomas as inversely related to cell motility. *Int. J. Dev Neurosci* 17: 601-611 .
- McGinley, D. M., Posalaky, Z., Porvaznik, M., and Russell, L. (1979). Gap junctions between Sertoli and germ cells of rat seminiferous tubules. *Tissue & Cell.* 11: 741-754.
- MacNutt, N.S. and Weinstein, R.S.(1970). The ultrastructure of the nexus. A correlated thin-section and freeze cleave study. *J. Cell. Biol.* 47: 666-668.
- Meda, P. (1996). The role of gap junction membranes channels in secretion and hormonal action. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 28: 369-377.
- Meehan, T., Shlart, S., O'Bryan, M. K., de Kretser, D. M., Loveland, K. L. (2000). Regulation of germ cell and sertoli cell development by action, follistatin and FSH. *Dev. Biol.* 220:235-237.
- Merchant-Larios, H. and Moreno-Mendoza, N. (1996). Embryology of mouse gonadal development. *Frontiers in Endocrinology.* 20: 22-32.
- Melaine, N., Lienard, M.O., Aorval, I., Le, G., Lejeune, H., Jegpu, H. (2002). Multidrug resistance genes and p-glycoprotein in the testis of the rat mouse, guinea pig and human. *Biol. Reprod.* 7: 444-449.
- Merchant-Larios, H., Moreno-Mendoza, N. (1998). Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cell in the mouse fetal testis. *Exp. Cell. Res.* 244: 230-238.
- Merchant-Larios and Moreno-Mendoza. (1996). Embriology of mouse gonadal development. *Frontiers in Endocrinology.* 20: 22-32.
- Merchant-Larios H. and Taketo, T. (1991). Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *Journal of Electron Microscopy Technique.* 19: 158-171.
- Mok B. W., Yeung, W. S., and Luk, J. M.(1999). Differential expression of gap-junction gene connexin 31 in seminiferous epithelium of rat testes. *FEBS Lett.* 453: 243-248.
- Moreno, A.P., Saez, J.C., Fishman, G.I., and Spray, D.C. (1994). Human connexin 43 gap junction channels regulation of unitary conductances by phosphorylation. *Circ. Res.* 74: 1050-1057.
- Munari-silem, Y., Audebet, C., Rousset, B. (1991). Hormones control of cell to cell communication : regulation by thyrotropin of the gap junction- mediated dye transfer between thyroid cells. *Endocrinology.* 128: 3299-3309.

- Munari-silem, Y., Audebet, C., Rousset, B. (1991). Hormones control of cell to cell communication : regulation by thyrotropin of the gap junction- mediated dye transfer between thyroid cells. *Endocrinology*. 128: 3299-3309.
- Munari-Silem, Y., and Rousset, B. (1996). Gap junction-mediated cell-to-cell communication in endocrine glands--molecular and functional aspects: a review. *Eur J. Endocrinol.* 135: 251-264.
- Munary-Silem Y., Lebrethon, M. C., Morand, I., Kousset, B., Saez, J. M. (1995). Gap junction mediated cell-to-cell communication in bovine and human cells. A process whereby cells increase their responsiveness to physiological corticotropin concentrations. *J. Clin. Invest* 95: 1429-1439.
- Murono, E.P. and Payne, A.H. (1979). Testicular maturation in the rat. In vivo effect of gonadotropins on steroidogenic enzymes in the hypophysectomized immature rat. *Biol Reprod.* 20: 911-917.
- Murphy, L., Jeffcoate, I. A., O'Shaughnessy, J. O. (1994). Abnormal Leydig cell development at puberty in the androgen-resistant *tfm* mouse. *Endocrinology*. 135: 1372-1377.
- Murray, S. A., and Fletcher, W. H., (1984). Hormone-induced intercellular signal transfer dissociates cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Cell. Biol.* 98: 1710-1719.
- Musil, L. S. B. A., Cunningham, G. M. E., Goodenough, D. A. (1990b). Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin 43 in junctional communication competent and deficient-lines. *J. Cell Biol.* 111: 2077-2088.
- Musil, L.S., and Goodenough, D.A. (1993). Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell.* 74: 1065-1077.
- Nagano, T., and Suzuki, F., (1976) The postnatal development of the junctional complexes of the mouse Sertoli cells as revealed by freeze fracture. *Anat. Rec.* 185: 403-418.
- Nebel, B. R., Amarose, A. P., and Hackett, E. M. (1961). Calendar of gametogenic development in the prepuberal male mouse. *Science* 134: 7-8.
- Nicholson, B.J., dermietzel, R., Teplow, D., Traub, O., Willecke, K., and Revel, P. (1987). Hepatic gap junctions are comprised of two homologous proteins of mr 28,000 and mr 1,000. *Nature.* 329: 732-734.
- Niemi, M., Sharpe, R. M., Brown, W. R. A. (1986). Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell and Tissue Research* 243: 337-344.
- Oakberg, E. F. (1956). A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am. J. Anat.* 99: 391-413.
- Ogasawara, Y., Yamane, T., Kitamura, Y., Uchida, K., Wakabayashi, K., and Matsumoto K. (1984). Inhibition of luteinizing hormone secretion during quiescent interval of testicular androgen production in immature mice. *J. Steroid Biochem.* 20: 563-567.
- Oh, S., Rubin, J. B., Bennett, M. V. L., Verselis, V. K., Bargiello, T. A. (1999). Molecular determinants of electrical rectification of single channel conductance in gap junctions formed by connexins 26 and 32. *J. Gen. Physiol.* 114: 339-64.
- Okamoto, S., Takatsuka, D., Tateishi, K., Ogasawara, Y., Yamane, T., Kitamura, Y., and Matsumoto, K., (1982). Proliferative pattern of seminal vesicle cells and the production of testosterone and 5 alpha-androgens from birth to adulthood in mice. *Endocrinology*. 111: 1230-1234.

- Orth, J., Gunsalus, G., and Lamperti. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122: 787-794.
- Orth J, M., Boehm, R. (1990). Functional coupling of neonatal rat Sertoli cells and gonocytes in coculture. *Endocrinology*. 127: 2812-2820.
- Orth, J.M. (1993). Cell biology of testicular development. In: "Cell and Molecular Biology of the Testis" (Desjardins, C. & Ewing, L. eds.) Oxford University Press. pp: 4-42.
- O'Shaughnessy, P. J., Baker, P., Sohnius, U., Haavisto, A-M., Charlton, H.M., and Huhtaniemi, I. (1998). Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology*. 139: 1141-1146.
- O'Shaughnessy, P.J., Baker, P.J., Kikkeila, M., Vainio, S., and McHahon, A.P. (2000). Localization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis. androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal Leydig cells. *Endocrinology*. 141: 2631-2637.
- Oyoyo, U. A., Shah, U. S., Murray, S. A. (1997). The role of α_1 (connexin 43) gap junction expression in adrenal cortical cell function. *Endocrinology* . 138:5385-5397.
- Parvinen, M. H., Nikula, H., Huhtaniemi, N., and Huhtaniemi, I. (1984). Influence of rat seminiferous tubules on Leydig cell testosterone production in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 37: 331-336
- Payne, A. H., and O'Shaughnessy, P. J. (1996). Structure, function and regulation of steroidogenic enzymes in the Leydig cell. . In "The Leydig Cell"(A. H., Payne. M. P., Hardy, and L. D., Russell, Eds). Cache River Press, pp: 259-286.
- Payne, A. H., and Youngblood, G. L.,(1995). Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol. Reprod.* 52: 217-25.
- Pelletier, R. M., and Byers, S. W. (1992). The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Tech.* 20: 3-33.
- Pelliniemi, L. J., Kuopio, T. J., & Frodman K. (1996). The cell Biology and function of the fetal Leydig cell . In "The Leydig Cell" (A. H., Payne, M. P., Hardy, and L. D., Russell, Eds). Cache River Press. pp: 143-158.
- Pérez Armendariz, M., Roy, C., Spray, D.C., and Bennett, M.V.L. (1991),. Biophysical properties of gap junctions between freshly dispersed pairs of mouse pancreatic beta cells. *Biophys. J.* 59: 76-92.
- Pérez-Armendariz, E. M., Romano, M., Luna, J., Miranda, C., Bennett, M. V. L. and Moreno, A. P. (1994). Characterization of gap junctions between pairs of Leydig cells from mouse testis. *Am. J. Physiol.* 267: C570-C580.
- Pérez-Armendariz, E. M., Luna, J., Miranda, C., Talavera, D., and Romano, M. C. (1996). Luteinizing and human chorionic gonadotropin hormones increase intercellular communication and gap junctions in cultured mouse Leydig cells. *Endocrine*. 4: 1-10.
- Pérez-Armendariz, E. M., Lamoyi, E., Mason J. I., Cisneros-Armas, D., Luu.The-V., Bravo Moreno, J. F. (2001). Developmental regulation of connexin 43 expression in fetal mouse testicular cells. *The Anatomical Record.* 264: 237-246.
- Perez-Armendariz, E.M., Luna, J., Aceves, C., Tapia, D.(1995). Cx 26, Cx32 and Cx 43 are expressed in mammary glands from virgin, pregnant and lactating animals. *Dev. Growth Differ* 37: 421-431.

- Perez-Armendariz, E.M., Luna, J., Aceves, C., Tapia, D. (1995). Cx 26, Cx32 and Cx 43 are expressed in mammary glands from virgin, pregnant and lactating animals. *Dev. Growth Differ* 37: 421-431.
- Picard, J. Y., Josso, N. (1976) Anti-Mullerian hormone: estimation of molecular weight by gel filtration. *Biomedicine*. 25:147-50.
- Pino, A. M., Inostroza, H., and Valladares, L. E. (1992). Detection of testosterone secretion from individual rat Leydig cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 41: 167-170.
- Pipeleers, D., in T Veld, P., Maes, E., and Van De Winkel, M. (1982). Glucose induced insulin release depends on functional cooperation between islet cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 7322-7325.
- Pitelaka, D.R., Hamamoto, S. T., Dualfa, J.G., Nemanic, M.K. (1973). Cell contacts in the mouse mammary gland I. Normal gland in postnatal development and the secretory cycle. *J. Cell. Biol.* 56: 797-818.
- Plant, T. and Marshall, G.R. (2001). The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocrine Reviews* 22: 764-768.
- Plum, A., Hallas, G., Margin, T., Dombrowsky, F., Hagendorff, A., Shumacher, G., Wolpert, C., Kim, J. S., Lamers W. H., Evert, M., Meda, P., Traub, O., Willecke, K. (2000). Unique and shared functions of different connexin in mice. *Curr Biol*. 10: 1083-1091.
- Pointis G, Mahoudeau, J. A. (1977). Responsiveness of foetal mouse testis to gonadotropins at various times during sexual differentiation. *J. Endocrinol. (Paris)* 74:149-150.
- Ramaley, J.H. (1979). Development of gonadotropin regulation in the prepubertal mammal. *Biol of Rep.* 20: 1-31.
- Revel, J.P., and Karnovsky, M.J. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* 33:C7-C12.
- Rey R, al-Attar L, Louis F, Jaubert, F., Barbet, P., Nihoul-Fekete, C., Chausain J. L., Josso, N. (1996). Testicular dysgenesis does not affect expression of anti-mullerian hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *Am J Pathol.* 148: 1689-1698.
- Rey, R. (1999). The prepubertal testis: a quiescent or a silent active organ. *Histol. Histopathol.* 14: 991-1000.
- Richards, A. J., Enders, G.C., Resnick, J.L. (1999). Differentiation of murine premeiotic primordial germ cells in culture. *Biol. Reprod.* 6: 1146-1151.
- Risley, M. S. (2000). Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biol. Reprod.* 62: 748-54.
- Risley, M., Tan, I. O., Roy, C., and Saéz, J. C. (1992). Cell-, age- and stage dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J. Cell Sci.* 103: 81-96.
- Robertson, J.D. (1963). The occurrence of a subunit pattern in the unit membranes of club endings in Mauthner cell synapses in goldfish brains. *J. cell. Biol.* 19: 201-221.
- Roscoe, W. A., Barr, K. J., Mbawi, A. A., Pomerantz, D. K., Kidder, G. M. (2001). Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin 43. *Biol. Reprod.* 65: 829-838.
- Rose, B., and Lowenstein, W.R. (1975). Permeability of cell junction depends on local cytoplasmic calcium activity. *Nature*. 254: 250-252.

- Reaume, A.G., de Sousa, P.A., KulkaRni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M., Rossant, J. (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin 43. *Science*. 257: 1831-1834.
- Russell, L.D., and Peterson, R.N. (1985). Sertoli cell junctions: morphological and functional considerations. *Int.Rev. Cytol.* 94:177-211.
- Russell, L. D., (1996). Mammalian Leydig cell structure. In "The Leydig Cell" (A.H., Payne, M.P., Hardy, and L.D., Russell, Eds). Cache River Press, pp 44-96.
- Saez, J. C., Connor, J. A., Spray, D. C., Bennett, M. V.(1989). Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 2708-12.
- Saez, J. M. (1994). Leydig cells: Endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocrine Reviews*. 15: 574-625.
- Sairam, M. R., and Krishnamurthy, H. (2001). The role of follicle hormone in spermatogenesis: lessons from Knockout animal models. *Arch. Med. Res.* 32: 601-608.
- Santulli, R., Sprando, R. L., Awniyi, C. A., Ewin, L. L., Zirkin, Br. (1990). To what extent on spermatogenesis be maintained in the hypophysectomized adult rat testis with exogenously administered testosterone. *Endocrinology*. 126: 95-101.
- Satoh, M. (1985). The histogenesis of the gonad in rat embryos. *J.Anat.* 143:17-37.
- Segaloff, D. L., and Ascoli, M., (1993). The lutropin/choriogonadotropin receptor .. 4 years later. *Endocr. Rev.* 14: 324-347.
- Selmanoff, M. K., Goldman, B. D., Ginsburg, B. E. (1977). Developmental changes in serum luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and androgen levels in males of two inbred mouse strainst. *Endocrinology*. 100: 122-127.
- Sha, J., Baker, P., O'Shaughnessy, P. J. (1996). Both reductive forms of 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (type I and 3) are expressed during development in the mouse testis. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 222: 90-94.
- Shan.L. X., Zhu, L., Bardin, C.W., and Hardy, M.P. (1995). Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cells and Sertoli cells by *in situ* hybridization. *Endocrinology*. 136: 3856-3862.
- Sheffield, J. W., and O'Shaughnessy, P. J. (1988). Testicular steroid metabolism during development in the normal and hypogonadal mice. *J. Endocr.* 119: 257-264.
- Sheffield, J.W., and O'Shaughnessy, P. J. (1989). Effect of injection of gonadotrophin-releasing hormone on testicular steroidogenesis in the hypogonadal (hpg) mouse. *J. Reprod. Fert.* 89: 609-617.
- Sheffield, J. W., and O'Shaughnessy, P. J. (1991). Effect of temperature and the role of testicular descent and posnatal testicular androgen production in the mouse. *J. Reprod. Fert.* 91: 357-364.
- Singh J, Handelsman, D. J. (1996). Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *J. Endocrinol.* 151: 37-48.
- Smith, P.F., Frawley, L.S., Neill, J.D. (1984). Detection of LH release from individual pituitary cells by the reverse hemolytic plaque assay: estrogen increases in fraction of gonadotropes responding to GnRH. *Endocrinology*. 115: 2484-2486.

- Stagg, R. B., and Fletcher, W. H. (1990). The hormone-induced regulation of contact-dependent cell-cell communication by phosphorylation. *Endocrine Reviews*. 11: 363-369.
- Steger, K., Tetens, F., and Bergmann, M. (1999). Expression of connexin 43 in human testis. *Histochem. Cell Biol.* 112: 215-220.
- Steinberger, E., and Steinberger, A. (1975). Spermatogenic function of the testis. In: Grep RO (ed) *Handbook of Physiology*, sect / vol 5, Williams and Wilkins, Baltimore, PP 1-19.
- Steiner, R.A., and Cameron, J.L. (1990). Endocrine control of reproduction. In: "Textbook of Physiology" Vol.2. Saunders Company eds. pp: 1289-1342.
- Stevenson, B.R., Keon, B.H. (1988). The tight junction: morphology to molecules: *Annu.Rev. Cell. Dev. Biol.* 14: 89-109.
- Stocco, D. M. (1996). Acute regulation of Leydig cell steroidogenesis . In "The Leydig Cell"(A.H.. Payne, M.P., Hardy, and L.D., Russell, Eds). Cache River Press. pp: 241-258.
- Sufi, S. B., Donalson, A., and Jeffcoate, S. L. (1986). World Health Organization. Special Program of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. Program for the Provision of Matched Assay Reagents for the Radio immunoassay of Hormones in Reproductive Physiology. Methods Manual 10th Edn. WHO. Geneva.
- Takens-Kwak, B.R., Jongasma, H.J., Rook, M.B., and Van Ginnekan, C.G. (1992): Mechanism of heptanol-induced incoupling of cardiac gap junction: a perfored patch-clamp study. *Am. J. Physiol.* 261 (Cell Physio. 31): C1531-1538.
- Tan, I. P., Roy, C., Saéz, J.C., Saéz, C. G., Paul, D. L., and Risley, M. S. (1996). Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli gap junctions. *Biol. Reprod.* 54: 1300-1310.
- Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., and Tada, M. (1989). Intercellular calcium signaling via gap junction in connexin 43 transfected cells. *J Biol. Chem.* 273: 1519-1528.
- Traub. O., Look, J., Dermietzel. R., Brummer, F., Husler, D., and Willecke, K. (1989). Comparative characterization of the 21 kD and 26 kD gap junction proteins in murine liver and culture hepatocytes. *J.Cell. Biol.* 108: 1039-1051.
- Traub. O., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Elfgang, C., Bastide, B., Scheidtmann, K. H., Hulser, D. F., and Willecke, K. (1994). Immunochemical and electrophysiological characterization of murine connexin40 and -43 in mouse tissues and transfected human cells. *Eur. J. Cell. Biol.* 64: 101-112.
- Tsien, R. W., and Weingart, R. (1976). Proceedings: Cyclic AMP: cell-to-cell movement and inotropic effect in ventricular muscle, studied by a cut-end method. *J. Physiol (Lond)* 242: 95P-96P.
- Turín, L., and Warner, A. (1977). Carbon dioxide reversibly abolishes ionic communication between cells of early amphibian embryo. *Nature.* 270: 56-57.
- Unwin, P.N.T., and Zampighy, G. (1980). Structure of the junction between communication cells. *Nature.* 283: 545-549.
- Varanda, W. A., and de Carvalho, A. C (1994). Intercellular communication between mouse Leydig cells. *Am. J. Physiol.* 267: C563-C569.
- Veldhuis, J.D., Rogol, A.D., Johnson, M.L., Dufai, M.L. (1983). Endogenous opiates modulate the pulsatile secretion of biological active luteinizing hormone in man. *J. Clin. Invest.* 72:2031-2040.

- Vergoween, R. P. F. A., Jacobs, S. G. O. M., Huiskamp, R., Davids, J. A. G., and de Rooij D. G. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J. Reprod. Fertil.* 93: 233-243.
- Vergoween, R. P. F. A., Huiskamp, R., Bas R. J., Roepers-Gajadien, H. L., Davids, J. A. G., and de Rooji, D. G. (1993). Postnatal development of testicular cell populations in mice. *J. of Reprod. and Fertility.* 99: 479-485.
- Verhoeven G and Cailleau, J. (1985). A factor in spent media from Sertoli cell-enriched cultures that stimulates steroidogenesis in Leydig cells. *Moll and Cell. End.* 40: 57-68.
- Veyssiere, G., Berger, M., Jean-Faucher, C., De Turckheim, J.C. (1982). Pituitary and plasma levels of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in male and female rabbit fetuses. *J. Endocrinol.* 381-387.
- Warren, W.D., Huhtaniemi, I.T., Tapanainen, J., Dufau, M.L., Kevin, J.C. (1984). Ontogeny of gonadotropin receptors in the fetal and neonatal rat testis. *Endocrinology.* 114: 470-476.
- Wartenberg, H. (1978). Human testicular development and the role of the mesonephros in the origin of a dual Sertoli cell system. *Andrologia.* 10: 1-21.
- White, T. W., and Bruzzone, R. (1996). Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and functional consequences. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 28: 339-350
- White, T. And Paul D.L. (1999). Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annual Reviews Physiology.* 61: 283-310.
- Willecke, K., Kirchoff, S., Plum, A., Temme, A., Thonissen, E., Ott, T. (1999). Biological functions of connexin genes revealed by human genetic defects, dominant negative approaches and targeted deletions in the mouse. *Novartis Found Symp.* 219: 76-88.
- Wilson, M. R., Close, T. W., Trosko, J. E. (2000). Cell population dynamics (apoptosis, mitosis, and cell-cell communication) during disruption of homeostasis. *Exp. Cell. Res.* 254: 257-268.
- Wing, T. Y., Ewing L. L., and Zirkin, B. R. (1984). Effects of Luteinizing Hormone Withdrawal on Leydig Cell Smooth Endoplasmic Reticulum and Steroidogenic Reactions wich Convert Pregnenolone to Testosterone. *Endocrinology.* 115: 2290-2296.
- Witschi, E. (1951). Embryogenesis of the adrenal and the reproductive glands. *Recent Prog.Horm.Res.* 6: 1-23.
- Yamamoto, M., Kataoka, K., (1988). An electron microscopic study of the development of the exocrine and endocrine pancreas with special reference to intercellular junctions. *Arch. Histol. Cytol.* 51: 315-325.
- Xie, H., Laird, D.W., Chang, T.H., Hu, V.W., (1997). A mitosis-specific phosphorylation of the gap junction protein connexin 43 in human vascular cells: biochemical characterization and localization. *J. Cell. Biol.* 137: 203-210.
- Zamboni, L. and Upadhyay, S. (1982). The contribution of the mesonephros to the development of the sheep fetal testis. *The American Journal of Anatomy.* 165: 339-356.
- Zhang, J. T., Nicholson, B. J. (1989). Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26 as deduced from its cDNA. *J. Cell Biol.* 109: 3391-3401.

Zhang, F.P., Poutanen, M., Wilbertz, J., Huhtaniemi, I. (2001). Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor Knockout (LuRKO) mice. *Molecular Endocrinology*. 15 : 172-183.

Zhou, B. and Hutson J. M. (1995). Human Chorionic Gonadotropin (hCG) fails to stimulate gonocyte differentiation in newborn mouse testes in organ culture. *The Journal of Urology*. 153: 501-505.

Zhou, Q., Nie, R., Prins G.S., Saunders, P.T., Katzenellenbogen, B.S., Hess, R.A. (2002). Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J. Androl*. 23:870-881.

Zhou, X., Kudo, A., Kawakami, H., Hirano, H. (1996). Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *The Anatomical Record* 245: 509-518.

Zirkin, B.R. (1993). Regulation of spermatogenesis in the adult mammal:Gonadotropins and androgens. In: "Cell and Molecular Biology of the Testis" (Desjardins, C. & Ewing, L.L.). Oxford University Press. pp: 166-187.