

030687
zeje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

EFFECTO DEL GOSIPOL SOBRE EL TESTICULO DE RATA
CON TUBOS SEMINIFEROS SINCRONIZADOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
P R E S E N T A :
Biol. Rosa María Viguera Villaseñor

Director de Tesis: Dr. Horacio Merchant Laríos

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

CON CARIÑO A MIS PADRES HERMANOS Y SOBRINITOS

Rogelio Viguera Rendón
Martha Villaseñor de Viguera
Gaby, Dany, Mony, Adry Marco, Rodrigo y Samantha

CON TODO MI AMOR A :

Mi esposo Julio César Rojas Castañeda
y a mi bebé

CON PROFUNDA ALEGRIA A MIS COMPAÑEROS DE LA UNIDAD DE
INVESTIGACION EN SALUD INFANTIL DEL INP; DEL INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE LA UNAM Y DEL DEPARTAMENTO DE
MORFOLOGIA DE LA FMVZ-UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Horacio Merchant Larios por su constante apoyo como tutor, ya que con su experiencia profesional, orientación y sugerencias ha sido posible la realización de este trabajo.

Al jurado por sus valiosas sugerencias e ideas:

Dr. Homero Hernández Montes
Dr. Rafael Hernández González
Dr. Enrique Pedernera Astegiano
Dra. Gabriela Morali de la Brena

Al Dr. Silvestre Frenk Freud y Dr Ismael Lares Asseff, Directivos de la Unidad de Investigación en Salud Infantil del Instituto Nacional de Pediatría, por las facilidades otorgadas para la realización de la presente.

CON PROFUNDO AGRADECIMIENTO AL DR. JOAQUIN HERRERA Y AL M EN C ARTURO SALAME, POR LA REALIZACION DE LOS ANALISIS DE BIOTRANSFORMACION. ASI MISMO HAGO PARTICIPE DE LOS AGRADECIMIENTOS AL BIOLOGO ALEJANDRO MARMOLEJO Y AL SR. JOSE GUADALUPE BALTAZAR POR EL APOYO TECNICO BRINDADO.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO Y EN LA UNIDAD DE INVESTIGACION EN SALUD INFANTIL DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA.

I N D I C E

I.	RESUMEN	3
II.	INTRODUCCION	4
	1. CELULAS GERMINALES	6
	1.1. ESPERMATOGONIA	6
	1.2. ESPERMATOCITO	6
	1.3. ESPERMATIDA	7
	2. ESPERMIOGENESIS	7
	3. CICLO DEL EPITELIO SEMINIFERO	10
	4. DESARROLLO SINCRONICO DE LAS CELULAS GERMINALES	13
	5. REGULACION HORMONAL DE LA ESPERMATOGENESIS. . .14	
	6. PROPIEDADES DEL GOSIPOL	17
	7. MODELO DE LA RATA DEFICIENTE EN VITAMINA A . . 19	
III.	OBJETIVO	20
IV.	MATERIAL Y METODO	21
	1. PROTOCOLO DE SINCRONIZACION DEL CICLO DEL EPITELIO SEMINIFERO.	22
	2. INYECCION DE TIMIDINA TRITIADA Y TRATAMIENTO CON GOSIPOL	22
	3. ANALISIS DE MICROSCOPIA DE LUZ	23
	4. AUTORRADIOGRAFIA	24
	5. ANALISIS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA	25
	6. OBTENCION DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN CELULAS DE LEYDIG.	25
	7. ANALISIS DE BIOTRANSFORMACION A PARTIR DE PREGNENOLONA.	26
V.	RESULTADOS	28
	1. PROTOCOLO DE SINCRONIZACION	29

2.	MICROSCOPIA DE LUZ	29
3.	AUTORRADIOGRAFIA	42
4.	MICROSCOPIA ELECTRONICA	46
5.	ANALISIS DE BIOTRANSFORMACION A PARTIR DE PREGNENOLONA.58
VI.	DISCUSION61
VII.	CONCLUSIONES	68
VIII.	BIBLIOGRAFIA	69

I. RESUMEN

Hasta ahora no se ha realizado un estudio sistemático e integrativo del efecto del gosipol sobre la espermatogénesis utilizando un modelo animal con sincronización del ciclo del epitelio seminífero (CES). En el presente trabajo, la sincronización del CES se logró en ratas privadas de la vitamina A durante 9 semanas. Al reintroducir esta vitamina en la dieta, la espermatogénesis se reinició en los tubos seminíferos a partir de las espermatogonias y/o los espermatoцитos.

Empleando técnicas de alta resolución, como son el marcado con timidina tritiada y autorradiografía, así como el estudio de la capacidad de biotransformación de esteroides en células de Leydig, observamos lo siguiente:

El gosipol administrado simultáneamente con la vitamina A tiene un efecto directo solamente limitado a algunos tubos seminíferos en los que la alteración de la espermatogénesis se hace evidente a los 26 y 39 días del tratamiento. Sin embargo, en la mayoría de los tubos seminíferos, el efecto del gosipol sobre la espermatogénesis parece ser indirecto, ya que esta droga también provocó un daño ultraestructural en las células de Leydig y disminución en la capacidad de biotransformación de precursores de la vía delta 4. Es hasta el día 52 del tratamiento, cuando se detectó una degeneración masiva de la línea germinal en todas las etapas (muerte celular generalizada y disminución del diámetro de los tubos seminíferos). Al considerar que los daños mas severos se presentaron en este lapso de tiempo, es decir la duración de un ciclo completo de espermatogénesis, se puede también sugerir que el efecto del gosipol es, probablemente debido a un efecto directo acumulativo sobre espermatogonias, y pasando esta fase crítica, el gosipol no tiene efecto, tal y como se presentó en la mayoría de los tubos con lapso de 13, 26 y 39 días.

EFFECTO DEL GOSIPOL SOBRE EL TESTICULO DE RATA CON TUBOS SEMINIFEROS SINCRONIZADOS

II. INTRODUCCION

El epitelio de los tubos seminíferos está involucrado en la proliferación, división y transformación morfológica de las células germinales, para el desarrollo de los espermatozoides. Este fenómeno se lleva a cabo durante tres fases: multiplicación por mitosis, meiosis y espermiogénesis. A las células en estas fases se les denomina espermatogonias, espermatocitos y espermátidas respectivamente (Chakraborty y col, 1976).

La espermatogonia es diploide, se multiplica mitóticamente y forma una población de células madre. Después de seis mitosis sucesivas comienza la meiosis con la replicación de DNA en espermatocitos en preleptoteno. Durante la profase de la meiosis caracterizada por $4n$, los cromosomas homólogos se aparean, y finalmente la célula se divide dando lugar a espermátidas haploides. El núcleo de este elemento celular se condensa, se forma el acrosoma y el flagelo, posteriormente el espermatozoide es liberado del epitelio seminífero (Parvinen y col, 1986).

Los procesos citoplásmicos de las células de Sertoli envuelven a las células germinales, y forman la barrera hematotesticular. Esta se localiza en todas las especies, y esta constituida por los complejos de unión entre las células de Sertoli (Nicander, 1967; Dym y Fawcett, 1970). Estos complejos están especialmente localizados en la porción basal de las células de Sertoli y dividen al epitelio seminífero de los mamíferos en dos compartimentos, el basal y el adluminal. El compartimento basal contiene a las espermatogonias y espermatocitos primarios (preleptoteno en la rata) (Cornell, 1974; Russell, 1978) y el compartimento adluminal contiene a los espermatocitos mas avanzados y espermátidas (Fawcett, 1975). Los espermatocitos en leptoteno y zigoteno residen durante su migración

hacia el compartimento adluminal, en el compartimento Intermedio, delineado por uniones especializadas situadas por arriba y abajo de estas células. Las sustancias originadas fuera de los tubos seminíferos utilizan la vía del espacio intercelular para tener acceso directo al compartimento basal del tubo seminífero. El acceso hacia las otras capas es evitado por las uniones entre las células de Sertoli, y de esta forma se aíslan las células en meiosis y espermatídas. Esto indica que la barrera hematotesticular es crucial para el desarrollo de la espermatogénesis (Jégou, 1992).

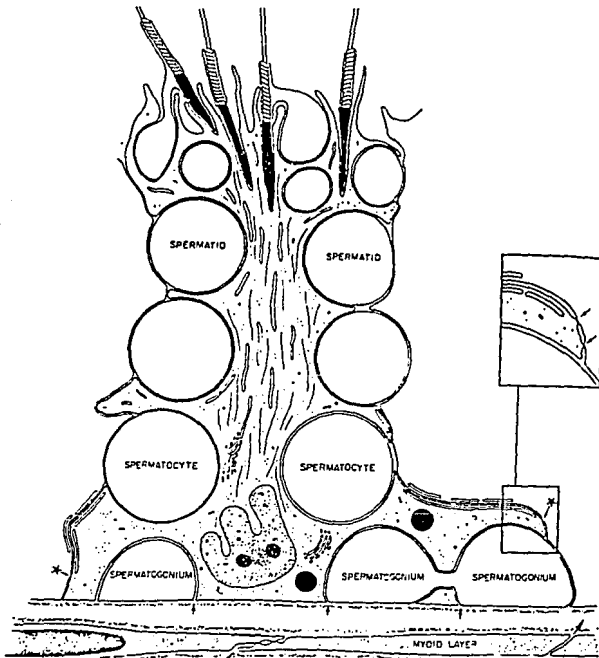


Figura 1 Esquematación del epitelio seminífero donde se puede observar la localización de la barrera hematotesticular (estrella) y la compartimentalización basal y adluminal de este epitelio. (Tomado de Dym y Fawcett, 1970).

II.1. CELULAS GERMINALES

II.1.1. ESPERMATOGONIA

La espermatogonia esta localizada en el compartimento basal del epitelio seminífero, separado del compartimento adluminal por uniones estrechas entre las células de Sertoli contiguas.

La espermatogonia puede ser de tres tipos de acuerdo a la disposición de la cromatina. Se clasifica como tipo A, aquella con cromatina en grumos pequeños; tipo B con cromatina en costras y una intermedia entre ambas (Regaud, 1901; Clermont, 1972). Las células que se multiplican mitóticamente y proveen de células madre para la espermatogénesis es la llamada tipo A (Leblond y Clermont 1952; Parvinen y col, 1986). La quinta generación, da lugar a la espermatogonia intermedia y la división de ésta origina la espermatogonia B, la cual es la encargada de comenzar la meiosis. (Clermont, 1972).

II.1.2. ESPERMATOCITO

Durante la etapa de espermaticitos en preleptoteno, éste pierde su contacto con la lámina basal, a través de su penetración en los procesos de las células de Sertoli. El estado de espermaticitos en leptoteno presenta cromosomas filamentosos y las uniones estrechas entre las células de Sertoli se localizan por arriba y abajo de los espermaticitos en este estado. Durante la etapa de zigoteno, la célula se localiza ya en el compartimiento adluminal; en este estado los cromosomas homólogos se aparean y conectan por el complejo sinaptonémico. En paquíteno, el apareo de cromosomas se completa y pueden evidenciarse los complejos sinaptonémicos, los espermaticitos pasan por un corto período de diploteno dando origen a espermaticitos secundarios, estos continúan

con la meiosis II para la reducción del número cromosómico, y dan lugar a cuatro espermátidas haploides. (Clermont, 1972; Parvinen y col, 1986).

II.1.3. ESPERMATIDA

Estas células atraviesan por una serie sucesiva de eventos durante los cuales transforman su núcleo, condensan la cromatina y desarrollan estructuras especiales tales como el acrosoma y el flagelo. A este proceso se le denomina espermiogénesis.

I.2 ESPERMIOGENESIS

Este proceso ha sido perfectamente descrito en 1952 por Leblond y Clermont, quienes, considerando criterios morfológicos, lo dividieron en cuatro fases, las cuales pueden ser subdivididas en varios estados que en total suman 19 en la rata.

A.- FASE GOLGI

Consiste en 3 estados para la formación del acrosoma.

El estado 1 es caracterizado por la presencia de una estructura casi esférica, el idiosoma, localizado en el aparato de Golgi. Un fino filamento emerge de uno de los centriolos en el citoplasma, este dará origen al futuro tallo del espermatozoide. En el estado 2 uno de los 4 gránulos acrosómicos aparecen en el idiosoma. El estado 3 se caracteriza por la fusión de los gránulos proacrosómicos en uno solo.

B.- FASE CAPUCHON (CAP)

Consiste de 4 estados durante los cuales la capucha crece por fuera del gránulo acrosómico.

En el estado 4 el gránulo acrosómico se pega al núcleo.

En el estado 5 una membrana protege por fuera del gránulo acrosómico y se pega sobre la superficie del núcleo. Para el estado 6 la membrana forma una

capucha definida y el idiosoma se separa del gránulo acrosómico. Durante el estado 7 la capucha presenta su máximo tamaño y uno de los centriolos se adhiere.

C.- FASE ACROSOMA

Consta de 7 estados durante los cuales la capucha y el gránulo acrosómico se orienta hacia la membrana basal del tubo. El gránulo acrosómico se transforma en el acrosoma característico de cada especie.

En el estado 8, el gránulo acrosómico y la capucha se orientan hacia la membrana basal del tubo y el citoplasma se desplaza al polo opuesto del núcleo. En el estado 9 hay un ligero aplanamiento del núcleo y protusión de la región cubierta por la capucha. El gránulo acrosómico se elonga y puede ser referido como el acrosoma. Durante el estado 10 la capucha se extiende a la región caudal del núcleo. Para el estado 11 se presenta una mayor elongación del núcleo y capucha. El estado 12 se presenta cuando el núcleo tiene su máxima longitud. En el estado 13 el núcleo se hace delgado y el citoplasma se condensa a lo largo del tallo. En el estado 14 el núcleo se hace más pequeño, la capucha se orienta sobre la parte anterior del núcleo; el acrosoma se arregla en una cresta del lado dorsal. El citoplasma se condensa a lo largo del tallo y esto hace que la membrana celular se fusione con el tubo caudal.

D.- FASE DE MADURACION

Consiste en 5 estados; en esta fase las espermátidas son denominadas espermatozoides por su semejanza con la célula madura.

El estado 15 indica el comienzo de la fase de maduración, esta caracterizada por la aparición de una membrana fina de material del capuchón a lo largo del borde dorsal de la célula, entre el extremo caudal del acrosoma y el ángulo dorsal del núcleo. En el estado 16 la estructura fina desaparece, mientras que el

acrosoma se extiende caudalmente hacia el ángulo dorsal. En el estado 17, el acrosoma y el capuchón son desplazados en relación al núcleo y provocan que en el estado 18 exista una cierta distancia entre el acrosoma y el núcleo. El citoplasma se acomoda junto al núcleo. Durante el estado 19 el espermatozoide inmaduro se coloca cerca de la luz del epitelio seminífero, como espermatozoide libre, y muestra poco cambio en el detalle estructural.

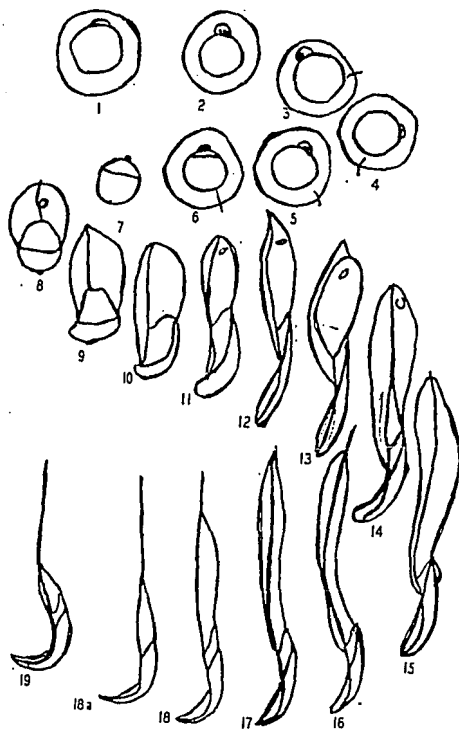


Figura 2 Representación esquemática de la espermiogénesis donde se pueden apreciar los distintos estados de maduración de la espermátida hasta la formación del espermatozoide (tomado de Leblond y Clermont, 1952)

II.3 CICLO DEL EPITELIO SEMINIFERO

Las células germinales no están arregladas al azar en el epitelio seminífero, sino que forman asociaciones celulares definidas. Esto da lugar a las etapas del ciclo del epitelio seminífero (CES), las cuales se pueden reconocer por la morfología del grado de desarrollo del acrosoma y el núcleo de la espermátida.

De acuerdo con Leblond y Clermont (1952), el CES se ha definido como una serie de asociaciones celulares que ocurren en un tiempo y lugar específico. Este ciclo puede ser estudiado morfológicamente determinando el grado de desarrollo de la espermátida; el ciclo presenta una duración de 13 días en la rata.

ETAPA I. Las espermátidas se encuentran en estado 15 de la espermiogénesis, están usualmente alejadas de la membrana basal y se presenta en forma simultánea un nuevo grupo de espermátidas en estado 1. Se observan espermátocitos en preleptoteno. Algunas espermatogonias tipo A se pueden observar en mitosis.

ETAPA II. Comienza con la presencia de las espermátidas jóvenes (estado 2), las cuales están separadas por grupos de espermátidas en estado 15 que se encuentran agrupadas e insertadas en el epitelio. Se observan solo algunas espermatogonias A, ya que predominan las de tipo intermedio. Los espermátocitos están en crecimiento progresivo.

ETAPA III. Espermátidas jóvenes se observan en estado 3 de la espermiogénesis, que separan a los grupos de espermátidas en estado 16. Se presentan pocas espermatogonias tipo A y muchas intermedias. Los espermátocitos continúan creciendo.

ETAPA IV. Comienza con la presencia de espermátidas en estado 4 y 17. En este estado la espermatogonia A en mitosis, da lugar a espermatogonias tipo B. Se observan pocos cambios en los espermátocitos.

ETAPA V. Comienza con la aparición de la capucha, que se origina por las proyecciones que emite el gránulo acrosómico en las espermátidas en estado 5 que están separadas por grupos de espermátidas en estado 17. Se presenta gran cantidad de espermatogonias tipo B; no se observan cambios en los espermátocitos en paquiteno, excepto un progresivo alargamiento.

ETAPA VI. Se presentan pocas espermatogonias tipo A y muchas tipo B en división mitótica a lo largo de la membrana basal, lo cual produce una nueva generación de espermátocitos, y de esta manera, ambos tipos de células pueden ser vistos en la misma sección del tubo. Los espermátocitos viejos son los típicos en paquiteno, las espermátidas jóvenes están en estado 6 y las viejas en 18; estas últimas se sitúan entre el lumen y la membrana basal.

ETAPA VII. El capuchón tiene el tamaño máximo y está dirigido en todas direcciones (espermátidas en estado 7). Se presentan muy pocas espermatogonias A. Las espermátidas en estado 18 se presentan junto a la luz del tubo.

ETAPA VIII. Comienza con la orientación del gránulo acrosómico de las espermátidas jóvenes (estado 8) hacia la membrana basal. Existen espermátocitos en preleptoteno y paquiteno. Los espermátocitos en estado 19 se alinean en el lumen y completan la eliminación de su citoplasma. Hacia el final de esta etapa las células en estado 19 son liberadas como espermátocitos libres. Con la liberación de éstos el grosor del epitelio se ve disminuido y el lumen del tubo se observa aumentado.

ETAPA IX. Comienza con la aparición de las espermátidas en estado 9. Las espermatogonias A se dividen constantemente. Persisten los espermátocitos en preleptoteno. Los cuerpos residuales (exceso de citoplasma de los espermátocitos) desaparecen gradualmente, unos pocos espermátocitos pueden permanecer en el lumen en esta etapa

ETAPA X. Comienza cuando el capuchón se orienta al ángulo dorsal del núcleo (estado 10 de la espermiogénesis). Muy pocas espermatogonias A están presentes. Continúa la generación de espermátocitos jóvenes en preleptoteno y los viejos en paquiteno.

ETAPA XI. Comienza cuando la espermátida pasa al estado 11 y forman grupos entre los espermátocitos viejos. Persisten los espermátocitos en leptoteno y paquiteno.

ETAPA XII. Comienza cuando la espermátida pasa al estado 12 alcanzando la longitud máxima. Se incrementa el número de espermatogonias A y estas se asocian con una capa de espermátocitos jóvenes en leptoteno. Los espermátocitos viejos pasan a diploteno.

ETAPA XIII. Se inicia cuando las espermátidas se presentan en estado 13 y las espermatogonias tipo A se alternan con espermátocitos jóvenes en zigoteno. Los espermátocitos viejos están en diploteno y da inicio la diacinesis.

ETAPA XIV. Las espermátidas pasan a la fase 14, y se agrupan. Las espermatogonias A son vistas a lo largo de la membrana basal. La generación joven de espermátocitos pasa de zigoteno a paquiteno. Los espermátocitos viejos están en la primera división, dando lugar a espermátocitos de segundo orden.

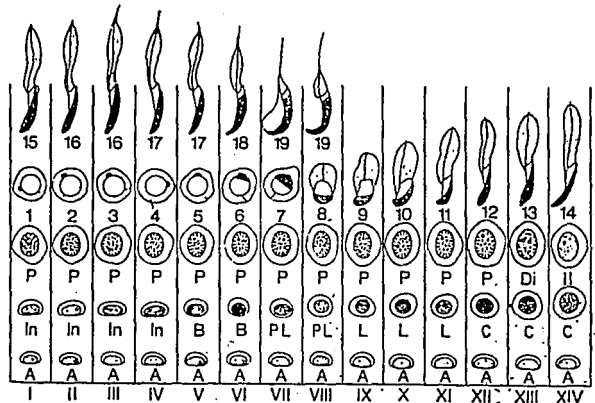


Figura 3 Representación esquemática del corte transversal de tubos seminíferos donde se pueden apreciar las distintas etapas del ciclo del epitelio seminífero de la rata y los elementos celulares que las caracterizan. Los números 1 a 19 se refieren a espermátidas en distintos estados de la espermiogénesis. La letra A, espermatogonia tipo A; B, espermatogonia tipo B; PL, espermatocito en preleptoteno; L, leptoteno; C, cigoteno; P, paquiteno; Di, diploteno y diacinesis; II, espermatocito secundario. (tomado de Perey y Col, 1961)

II.4. DESARROLLO SINCRONICO DE LAS CELULAS GERMINALES

El hecho de que un grupo de células presenten en forma sincrónica los cambios que ocurren a través de la espermiogénesis es un fenómeno histológico importante (Perey y col, 1961).

Los grupos de espermatogonias, espermatocitos y espermátidas se encuentran conectados por puentes intercelulares. Esta conexión puede facilitar la difusión de sustancias intracitoplásmicas, la cual puede controlar la tasa de transformación de las células germinales y por lo tanto contribuir a la sincronización (Fawcett y col, 1959). Roosen-Runge en 1962, indica que tales

conexiones pueden resultar de una incompleta citocinesis del citoplasma en el momento de la división.

II.5. REGULACION HORMONAL DE LA ESPERMATOGENESIS

Se sabe que en ausencia de la glándula hipófisis se presenta inhibición de la espermatogénesis debido a la falta de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) producidas por este órgano, (Clermont y Morgantaler, 1955; Skinner, 1989).

La hormona folículo estimulante (FSH) y los andrógenos secretados por las células de Leydig, bajo el estímulo de la LH, son las hormonas que regulan la espermatogénesis (Chemes y col, 1979; Sharpe, 1986). Las células de Sertoli contienen receptores a estas hormonas. Las células germinales son, tal vez, indirectamente influenciadas por la FSH y andrógenos, así como también dependen de factores producidos por las células de Sertoli, bajo la estimulación de estas hormonas (Chemes y col, 1979). Las células germinales no tienen receptores para gonadotropinas, indicando que el efecto de las hormonas y de las gonadotropinas puede ser indirecto a través de las células somáticas (Chemes y col, 1979; Ackrand y col, 1992).

Los receptores para LH están presentes en la membrana de las células de Leydig. La LH se requiere para completar la meiosis (Steinberger y Steinberger, 1975) ya que la administración de anticuerpos contra LH provoca un cambio dramático cuantitativo en el epitelio seminífero y un detenimiento de la espermatogénesis antes de completar la meiosis.

Esta hormona es una señal para producir la testosterona a partir de colesterol o acetato. (Catt y col, 1980). Las enzimas involucradas en la producción de testosterona en mamíferos se encuentran dentro de el retículo endoplásmico liso y

en las mitocondrias de las células de Leydig (Christensen y Gillim, 1969; Tamaoki y col, 1973; Samuels y col, 1974-1975).

Reportes previos relacionan cambios en los niveles de testosterona con alteraciones en la morfología de las células de Leydig, daños similares se encuentran también bajo condiciones experimentales o patológicas (Kerr y col, 1979; Zirkin y col, 1980). El primer paso en la ruta de la biosíntesis de los andrógenos la constituye la conversión, a nivel mitocondrial, de colesterol a pregnenolona, activada por la LH. La biotransformación de pregnenolona a testosterona en los mamíferos puede proceder a través de diferentes rutas o vías metabólicas que se han definido como delta 5 y delta 4, según la localización del punto de insaturación (doble enlace) de los compuestos intermediarios. En las gónadas masculinas de los roedores opera la ruta de los delta 4 (Loza y col, 1988).

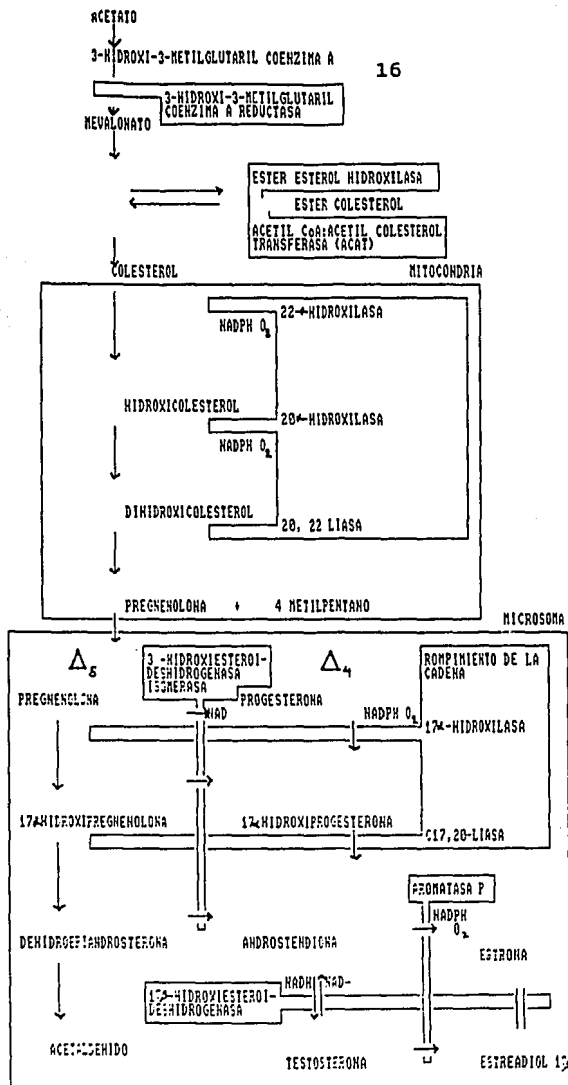


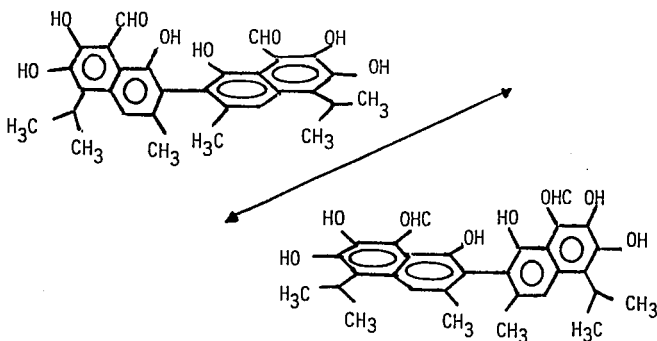
Figura 4 Ruta de biosíntesis de estradiol y testosterona a partir de acetato, así como la compartimentalización de los eventos. (Tomado de Gore-Langton y Armstrong, 1988)

Algunas evidencias sugieren que los espermatoцитos en paquiteno y espermátidas en estado 7 y 19 muestran una clara degeneración ante la disminución de LH (Ackrand y col, 1992).

La estrecha conexión física entre células de Sertoli y germinales, facilita el intercambio de nutrientes y señales de regulación entre éstas. Dos productos de las células de Sertoli, la proteína unidora de andrógenos (ABP) y la transferrina, pueden ser encontrados en las células germinales (Skinner, 1989).

II.6. PROPIEDADES DEL GOSIPOL

El gossipol es un compuesto aislado de la semilla de la planta de algodón del género *Gossypium*. La estructura química de este compuesto está constituida por 2 grupos aldehídos en la posición 8,8; 6 grupos hidroxilo en las posiciones 1,2; 6,6; 7,7 y 4 grupos alcoli: 2 grupos metil en las posiciones 3,3 y 2 isopropil en las posiciones 5,5. Este compuesto es amarillo y soluble en solventes orgánicos (Adams y col, 1960).



El gossipol ha despertado el interés de los investigadores por su efecto anticonceptivo en los habitantes varones de China. En investigaciones clínicas se

ha confirmado que después de 75 días de recibir por vía oral una dosis diaria de 20mg, el 48% de los 124 hombres estudiados, mostraron azoospermia y la concentración promedio de espermatozoides en el semen del resto de los hombres fué de 4 millones/ml, (National Coordinating Group, 1978; Liu y col, 1985). Al cabo de un año de discontinuar el uso del gosipol, la densidad de espermatozoides en el semen fué mayor de 10 millones/ml. Se ha reportado, también, que el gosipol administrado oralmente inhibe la espermatogénesis, tanto en el hombre, como en animales de laboratorio (Udoh, 1992), con la aparente ventaja de que no afecta la libido ni los niveles plasmáticos de testosterona y gonadotropinas (Liu y col, 1985; Gu y col, 1990) sumando a esto que sus efectos son aparentemente reversibles (Prasad y Diezfalasy, 1982; Rikihisa y Lim, 1988).

Estas propiedades hacen del gosipol un compuesto atractivo para ser utilizado formalmente como método anticonceptivo para el hombre.

Los grupos de Nadakavukaren y col, 1979; Stephens y col, 1983; Srivastava y col, 1989; Singh y Rath, 1990; y Ranga y col, 1990 han observado que el gosipol inhibe completamente la movilidad de los espermatozoides, ya que afecta la actividad de diversas enzimas mitocondriales como son la malato deshidrogenasa, fumarasa, piruvato deshidrogenasa y la ATPasa dependiente de Mg^{++} , Na^{+} , K^{+} . El gosipol administrado oralmente produce también daños en el epitelio seminífero, como la disminución del diámetro de los tubos seminíferos (Ranga, 1990; Vyas y col, 1990; Udoh, 1992), exfoliación de las células germinales, (espermatidas, espermatoцитos); produce además tanto la vacuolización del epitelio seminífero, específicamente de las células de Sertoli, como el desprendimiento del acrosoma de las espermatidas (Chang y col, 1980; Hoffer, 1983; Srivastava y col, 1989; Singh y Rath, 1990; Ranga y col, 1990). Una exposición prolongada al gosipol produce daños en el tejido germinal como son la formación de células multinucleares, la citólisis y la picnosis (Chang y col, 1980;

Hoffer, 1983; Ranga y col, 1990). Todos estos estudios se hicieron en animales en cuyos testículos los tubos seminíferos se encontraban en todas las etapas del CES.

II.7. MODELO DE LA RATA DEFICIENTE EN VITAMINA A

Con el objeto de facilitar el determinar los efectos del gospol sobre el testículo, y conociendo que éste presenta una asincronía marcada del CES, se trató de sincronizar el CES, utilizando un modelo propuesto por Morales y Griswold en 1987.

Este se basa en que la carencia de vitamina A en ratas jóvenes durante 9 semanas provoca esterilidad completa debido a la inhibición del proceso espermatogénico, provocada por el desprendimiento hacia la luz de los tubos seminíferos, de las células que constituyen el compartimento adluminal (espermátidas y espermatoцитos) quedando únicamente las células del compartimento basal. Al iniciar la administración de vitamina A al cabo de este tiempo, se reinicia la mitosis y la meiosis de las células del compartimento basal al mismo tiempo en la mayoría de los tubos seminíferos, logrando con esto la sincronización de las etapas del CES en los tubos. En estas condiciones es posible estudiar los efectos de cualquier droga en testículos cuyos tubos seminíferos se encuentren sincronizados.

JUSTIFICACION DEL PRESENTE TRABAJO

Aunque varios estudios han mostrado que el gosispol produce diversas alteraciones en el epitelio del tubo seminifero, no se ha realizado un estudio sistemático e integrativo utilizando un modelo animal con sincronización del CES.

III. OBJETIVO

Establecer si el efecto del gosispol es directo sobre alguna de las etapas de la espermatogénesis y si provoca alguna alteración endócrina en las células de Leydig.

V. MATERIAL Y METODO

Se utilizaron un total de 30 ratas macho cepa Wistar, mantenidas en un ambiente convencional con alimento y agua a libre acceso. Los animales fueron divididos en 2 grandes grupos, el control sano (CS), y aquellos con sincronización del CES, (figura 5).

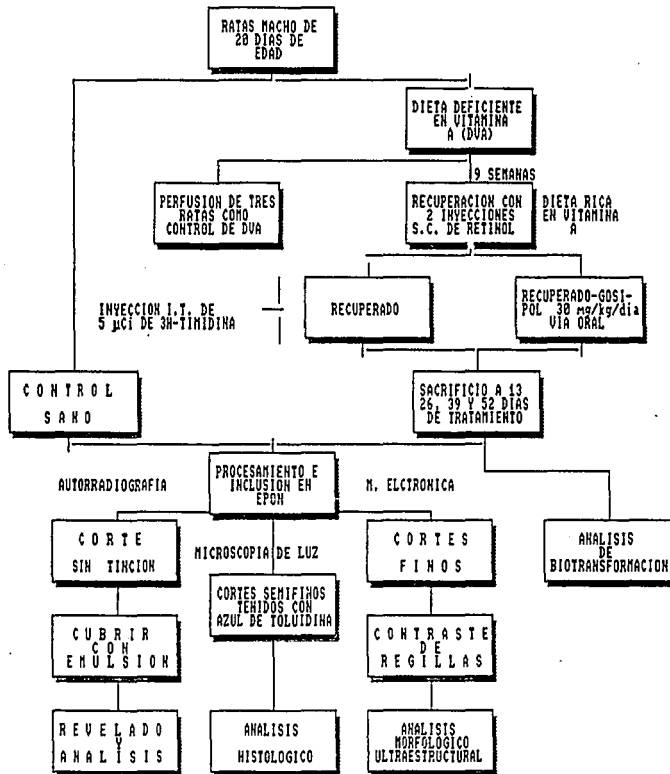


Figura 5 Representación diagramática de la metodología empleada en el presente trabajo.

IV.1. PROTOCOLO DE SINCRONIZACION DEL CICLO DEL EPITELIO SEMINIFERO

Se utilizaron 27 ratas, a las cuales se les proporcionó una dieta deficiente en vitamina A (DVA), a partir de los 20 días de edad durante 9 semanas. Los animales fueron pesados dos veces por semana y su curva de crecimiento se ajustó a una regresión lineal, con el fin de verificar el efecto de la dieta. Al término del lapso establecido se sacrificaron 3 animales como control de dieta DVA, para comprobar que la deficiencia de vitamina A efectivamente inhibe la espermatogénesis.

Para reiniciar la espermatogenesis en forma sincronizada, el resto de los animales fué tratado con 2 inyecciones subcutaneas de 5mg de retinol disuelto en etanol y aceite de sesamo, en proporción de uno a tres respectivamente, durante 2 días consecutivos, y una dieta rica en vitamina A (0.5mg diarios).

IV.2. INYECCION DE TIMIDINA TRITIADA Y TRATAMIENTO CON GOSIPOL

En el segundo día de recuperación a cada uno de los animales se les inyectó, por vía intratesticular, 5 μ Ci de timidina tritiada con actividad específica de 28 Ci/mmol (Amersham) disuelta en 95 μ l de solución salina, a fin de que las espermatogonias y espermatoцитos primarios sobrevivientes de la dieta DVA la incorporen. Al mismo tiempo el total de animales fué dividido en dos grupos denominados: DVA-recuperados (DR) y DVA-recuperados-gosipol (DRG). Al último grupo se le suministró por vía de alimentación forzada, utilizando una cánula, gosipol en una dosis de 30mg/kg/día en vehículo de aceite de cacahuete (0.5ml) y al grupo DR, únicamente se le dió el vehículo. Los animales CS, DR, DRG que cumplieron con un lapso de 13, 26, 39 y 52 días a partir del inicio del tratamiento fueron anestesiados con vapores de eter y se disecaron los testículos y el epidídimo. Se obtuvo por punción en la cauda del epidídimo, una muestra de

semen. Este se colocó en solución de Hank's a un pH 7.3 y 37°C. Utilizando un microscopio invertido, se evaluó la movilidad espermática, de acuerdo a lo propuesto por Hoffer (1983), así como la morfología general de los espermatozoides.

El testículo izquierdo se empleó para el análisis de la biotransformación de esteroides en una fracción enriquecida de células de Leydig y el derecho se perfundió por la arteria espermática (Baker y col, 1980) con el fijador de Karnovsky modificado (Karnovsky, 1965). Posteriormente se lavaron con la solución amortiguadora de cacodilatos 0.1M con pH 7.4 y se postfijaron en una solución al 1% (v/v) de tetróxido de osmio durante una hora (Zetterquist, 1956). Al término de este lapso las muestras se lavaron con agua destilada, se deshidrataron en alcoholes graduales: 70%, 80%, 90% y 95%, diez minutos en cada uno, alcohol absoluto, dos cambios de 10 minutos, posteriormente se pasaron a óxido de propileno durante 20 minutos. Se impregnaron en una mezcla de Epon 812-óxido de propileno en proporción de uno a uno, durante una hora, Epon-óxido de propileno dos a uno y finalmente en Epon 812 durante dos horas. Tanto la deshidratación como la impregnación se realizaron a temperatura ambiente. Se incluyeron en Epon 812 y se dejaron doce horas a 60 grados centígrados para polimerizar la resina.

IV.3. ANALISIS DE MICROSCOPIA DE LUZ

Se realizaron cortes de $1\mu\text{m}$ de grosor en un ultramicrotomo III 8800 (LKB), los cuales se tiñeron por flotación con azul de toluidina al 0.5% y se montaron en portaobjetos para su estudio. Los parámetros a analizar fueron:

- EVALUACION DEL PROTOCOLO DE SINCRONIZACION. Se determinó la proporción de cada etapa por tubo con respecto al número total de tubos analizados por animal.

– EVALUACION DEL AREA DE LOS TUBOS SEMINIFEROS. Se llevó a cabo por medio de un equipo de digitalización de imágenes. Los resultados fueron analizados por medio del paquete estadístico SPSS, utilizando el análisis de varianza de una vía y prueba de Tukey, considerando las diferencias significativas a una p menor a 0.05.

–DESCRIPCION MORFOLOGICA. Se describieron las alteraciones morfológicas producidas por el gosispol, considerando las etapas del CES.

IV.4. AUTORADIOGRAFIA

Las muestras pertenecientes a los animales con tratamiento de tiempo de 13 y de 26 días, se cortaron en secciones de $1\mu\text{m}$ de grosor, y se montaron en portaobjetos. Se cubrieron con emulsión fotográfica (ILFORD Scientific Product de Polisciences INC), y se almacenaron en completa oscuridad a 4 grados centígrados por 15 días. Posteriormente se revelaron y se determinó la presencia de gránulos de plata sobre los diferentes elementos celulares.

Es importante señalar que el análisis de las autorradiografías, se realizó tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

- 1) Después de 9 semanas de dieta deficiente en vitamina A, los únicos elementos celulares que se conservan son las espermatogonias, células de Sertoli y los espermatocitos en preleptoteno. Al proporcionar retinol se reinicia la meiosis con estos espermatocitos.
- 2) El CES en la rata tiene una duración de 13 días.
- 3) Día en que se aplicó la timidina tritiada posterior a la inyección de retinol. Por ejemplo, si se aplica la timidina tritiada una semana después de la recuperación con retinol, las posibles espermatogonias o espermatocitos que incorporen la timidina tritiada se encontrarán en etapas mas avanzadas y por lo tanto después

del lapso establecido las marcas se localizarán en elementos celulares mas avanzados.

Con el proposito de determinar si en los animales tratados con gopol se altera la duración del CES y por consiguiente la espermatogénesis, se determinó el porcentaje de las etapas del CES y elementos celulares con marca radioactiva. Es decir, si por ejemplo, en un corte se observaron 15 tubos marcados, se determinó el porcentaje de aquellos en etapas I, II, III, IV etc., considerando los elementos celulares.

Se utilizó el análisis de varianza a una p menor a 0.05 del paquete estadístico SPSS, y se realizaron comparaciones entre los grupos DR y DRG a los 13 y 26 días.

IV.5. ANALISIS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

En aquellos bloques donde en cortes semifinos se observó algún tipo de alteración, se hicieron cortes finos, los cuales fueron montados en rejillas de cobre y contrastados con acetato de uranio y nitrato de plomo. Fueron analizados en un microscopio electrónico EM-9 (Carl Zeiss) obteniéndose placas fotográficas. Se describieron las alteraciones ultraestructurales del epitelio seminífero.

IV.6. OBTENCION DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN CELULAS DE LEYDIG

Se consideró para este estudio a dos animales por cada condición experimental y lapsos de tiempo establecidos.

El testículo izquierdo fue descapsulado y lavado con amortiguador de Krebs-Ringer adicionado con glucosa al 0.2%, para eliminar la mayor cantidad posible de sangre retenida en los vasos.

La fracción enriquecida en células de Leydig se obtuvo de acuerdo a lo propuesto por Bermúdez y col (1973,1988). El testículo fué tratado con colagenasa tipo IV a una concentración final de 1mg/ml en KRBG durante 18 minutos a 37 grados centígrados; la actividad enzimática fué suspendida por dilución con NaCl 0.9%. La suspensión celular se filtró a través de una malla de poro 50-1002 μm . El filtrado (fracción intersticial) fué empleado para la obtención de la fracción enriquecida en células de Leydig. Este se centrifugó y la pastilla obtenida se suspendió en KRBG la cual nuevamente se centrifugó através de una solución de KRBG-ficoll 400-BSA (13%-0.2% pH 6.5). La pastilla celular se suspendió en un medio esencial de Eagle modificado por Dulbecco CDME a una densidad celular final de 3×10^5 CL/ml.

La viabilidad celular fué determinada por el ensayo de exclusión de azul de tripano (Kruse y Patterson, 1973) y la pureza de cada fracción fué estimada por criterios morfológicos, previa tinción con colorantes de contraste.

IV.7 ANALISIS DE BIOTRANSFORMACION A PARTIR DE PREGNENOLONA

En una fracción enriquecida de células de Leydig (300 a 500 millones) en buffer de KRBG a pH de 7.4 se incubaron en pregnenolona marcada radioactivamente (110,000cpm) durante 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Para detener la reacción se congeló inmediatamente. El proceso de separación de detritus celulares se llevó a cabo adicionando 10ml de tolueno a la fracción enriquecida de células de Leydig y centrifugando. Se obtuvo una fase acuosa y otra de detritus celulares. Se congeló la fracción acuosa, separando así la fase orgánica, la cual posee esteroides y lípidos. Ya separada esta última fracción, se evapora el solvente a sequedad.

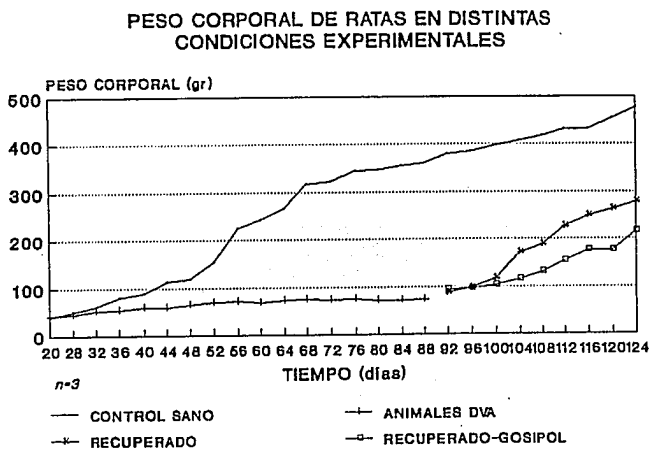
Purificada la fase organica, se transfirió a cromatoplasmas de silicagel. Se aplicó un microgramo de cada uno de los esteroides por determinar, que sirvieron como punto de referencia, así como las muestras problema.

Las cromatoplasas se corrieron en benceno 100%, y una vez secas, se transfirieron a un sistema de benceno:acetato de etilo 1/8:2; finalmenete el frente del solvente se llevó hasta el borde superior de la cromatoplasa en un sistema saturado de benceno:metanol 1/95:5.

Los esteroides de referencia se revelaron con reactivos de Oërtel (ácido sulfúrico:etanol 1/2:1). Se marcaron las zonas correspondientes a cada esteroide y de cada área se desprendió la silicagel, colectandose en pipetas pasteur empacadas con fibra de vidrio. Los esteroides fueron colectados en viales de centelleo y se determinó el porcentaje de biotransformación considerando a 110,000 cpm como 100% y determinando las cpm en los distintos tiempos midiendo diversos productos de biotransformación de la vía delta 4 (progesterona, 17 OH progesterona, androstendiona y testosterona).

V. RESULTADOS

Las curvas de crecimiento (gráfica 1) mostraron que a partir de 1.5 semanas de dieta DVA, el peso corporal se ve disminuído, comparandolo con el CS, y al momento de la recuperación el peso corporal aumenta. La regresión lineal fue expresada de la siguiente manera: $p = mt + b$ (donde p = peso (gr) y t = tiempo (días). La ecuación que representó al grupo de controles sanos fué $p = 4.37t - 50.76$) con una pendiente más marcada que la presentada en los animales deficientes en vitamina A durante las nueve semanas $p = 0.47t + 38.40$. Esto confirma que la vitamina A es necesaria para el crecimiento y buena salud del organismo. Durante la recuperación con retinol y recuperación-gosipol, los animales presentaron pendientes distintas, esto es: animales recuperados $p = 6.57t - 524.22$) y en animales recuperados-gosipol $p = 3.80t - 270.60$), haciendo notar que aquellos animales tratados con el gosipol presentaron una pendiente disminuída.



Gráfica 1.— Representación del peso corporal de ratas controles sanas, deficientes en vitamina A (DVA), recuperadas y recuperadas-gosipol.

V.1. PROTOCOLO DE SINCRONIZACION

La sincronización no fué la ideal, ya que en todos los tubos analizados no se logró observar únicamente a 3 etapas del CES, por el contrario, se obtuvo un sesgo de la etapa VI a I, con mayor proporción en las etapas VII a IX.

Al aplicar la inyección de retinol a los animales DVA, los espermatoцитos en preleptoteno reinician la meiosis, es decir, comienzan en la etapa VII a VIII, por lo cual después, del lapso de 13 días solo se logró observar a los elementos celulares del compartimento basal y espermatoцитos en paquiteno, esto nos impidió clasificar estos tubos en alguna de las etapas del CES al basarnos en el estado de desarrollo de la espermátida.

A los 26 días de recuperación se logró clasificar a los tubos dentro de las etapas VI a I, y con mayor proporción en las etapas VI y VIII. La dieta no afecta los espermatoцитos en preleptoteno por lo que la espermatogénesis se reinicia en el estado VII u VIII. Sin embargo, tal vez algunos tubos no respondieron al mismo tiempo al suministro de retinol, y se produjo algunos tubos en distintos estados del CES.

Para los 39 días de recuperación, los tubos se lograron clasificar en etapas VI a I, con mayor proporción en etapas VII a IX tanto para el grupo de DR como para el DRG. A los 52 días de recuperación, los tubos se clasificaron dentro de las etapas VI a I, con mayor proporción en las etapas VII, VIII y XII pertenecientes al grupo DR y VI, VIII y XI para el grupo DRG.

V.2. MICROSCOPIA DE LUZ

Los cortes transversales de los tubos seminíferos de ratas pertenecientes a los grupos CS, DR y DRG mostraron los siguientes resultados.

DIETA DEFICIENTE EN VITAMINA A (DVA)

El epitelio de los tubos seminíferos mostró únicamente a los elementos celulares que constituyen el compartimento basal (células de Sertoli, espermatogonias y algunos espermatoцитos en preleptoteno.

Las células de Sertoli presentaron grán número de prolongaciones citoplásmicas, las cuales llegan a bloquear la luz de los tubos, formando estructuras huecas. En la cauda del epididimo no se presentaron espermatozoides.



Figura 6. Tubos seminíferos de animales tratados durante 9 semanas con dieta deficiente en vitamina A. Célula de Sertoli (S), espermatogonia (G), espermatoцитo (E), prolongaciones sertolianas (P) Tec. Azul de Toluidina 25.6 X.

RECUPERACION CON RETINOL

13 DIAS DE RECUPERACION Y RECUPERACION GOSIPOL

Se observó a los pocos elementos celulares organizados y con gran número de espermatoцитos primarios en paquiteno los cuales mostraron una morfología normal. Sin embargo las prolongaciones sertolianas persisten ocupando parte de la luz del tubo y formando huecos. (fig. 7). No se observó diferencia morfológica clara entre los animales DR y DRG.



Figura 7. Tubo seminífero de un animal de 13 días de recuperación de la dieta DVA. Se observa desorganización de los elementos celulares. Célula de Sertoli (S), espermatogonia (G), espermatoцитo en paquiteno (E). Tec. Azul de Toluidina 25.6 X.

26 DIAS DE RECUPERACION Y RECUPERACION-GOSIPOL

El espacio que ocupaban las prolongaciones sertolianas se suplen por espermaticitos primarios, secundarios y espermátidas en distintos grados de desarrollo, los cuales se observan normales, tanto en el grupo DR como el DRG, (aunque ocasionalmente se presentaron tubos dañados en este último grupo) sin diferir de los elementos celulares del CS (fig 8). Tanto en el grupo DR como el DRG se presentó poca cantidad de espermatozoides en la cauda del epididimo, al compararse con el CS.



Figura 8. Tubo seminífero en etapa VIII del CES de un animal de 26 días perteneciente al grupo DRG. Se muestra a las células de Sertoli (S), espermogonias (G), espermaticitos (E) y espermátidas en estado 8 (T) Tec. Azul de Toluidina 32 X.

39 DIAS DE RECUPERACION Y RECUPERACION-GOSIPOL

Para este lapso de tiempo los tubos se observan completamente normales. No se logró observar diferencia morfológica entre los animales DR y DRG con respecto al CS, (aunque ocasionalmente se presentaron tubos alterados únicamente en el grupo DRG) (fig 9), sin embargo la movilidad espermática se vió disminuida al compararse el grupo DRG con el DR y CS.

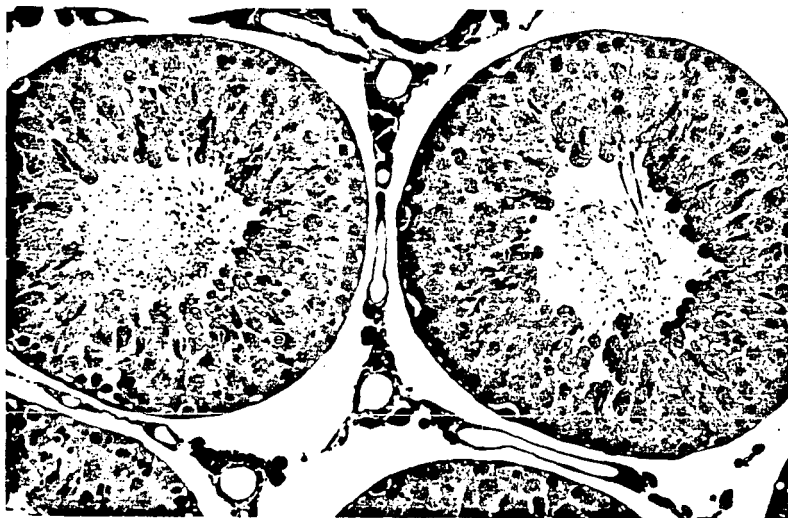


Figura 9. Tubos seminíferos en etapa XI del CES de un animal DR de 39 días. Se muestran células de Sertoli, espermatocitos (e), y espermátidas en estado 11 (t) Tec. Azul de Toluidina 20 X.

52 DIAS DE RECUPERACION Y RECUPERACION-GOSIPOL

Solo a partir de esta edad se lograron observar efectos morfológicos producidos por el gospol, el grupo DR no mostró diferencia morfológica con el grupo CS.

Los animales tratados con gospol presentaron inmovilidad espermática, espermatozoides con flagelos deformes, o decapitados.

Se presentaron alteraciones morfológicas en los estados del CES VI a XIV, pero la arquitectura general se vió más afectada en los estados VII a XI, como son desorganización del epitelio germinal, vacuolización, desprendimientos celulares de espermatoцитos en leptoteno, zigoteno, paquiteno, y espermátocitos secundarios, así como espermátidas en estados 6 a 19 con diversos grados de daño, que van desde núcleos picnóticos hasta células con licuefacción, así como sincicios conteniendo núcleos de espermátidas en estados 6 a 7. Aunque se llegaron a presentar algunos tubos poco dañados, siempre se observaron desprendimientos celulares, y en algunos casos solo de espermátidas. (figs 10-15). Cabe mencionar que este tipo de alteraciones fueron presentadas en el 98% de los tubos seminíferos, de animales DRG debido a la sincronización de la espermatogénesis.

IDENTIFICACION DE LAS ETAPAS DE LA OVA GENESIS

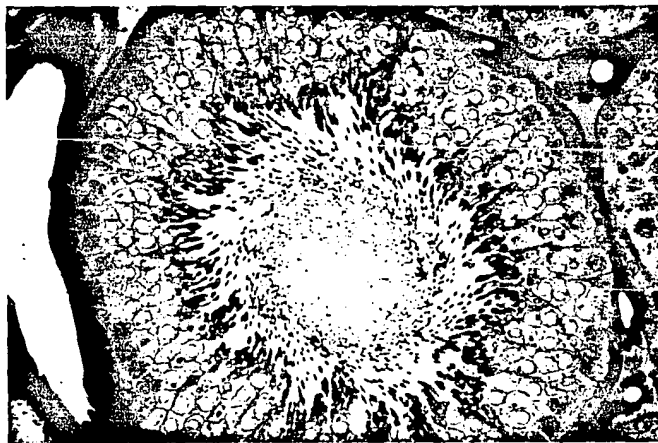
Se muestran alteraciones como sincicio celular (flecha), célula gigante (G), vacuolas (V), células picnóticas (punta de flecha) y espacios (e) Tec. Azul de Toluidina 25.6 X.

Figura 10. Tubo seminífero en etapa VIII de un animal de 52 días de recuperación y gosisol. Se muestran alteraciones como sincicio celular (flecha), célula gigante (G), vacuolas (V), células picnóticas (punta de flecha) y espacios (e) Tec. Azul de Toluidina 25.6 X.

Figura 11. Tubo seminífero en etapa VIII perteneciente a un animal de 52 días de recuperación. Se muestra la morfología habitual característica de esta etapa.



10



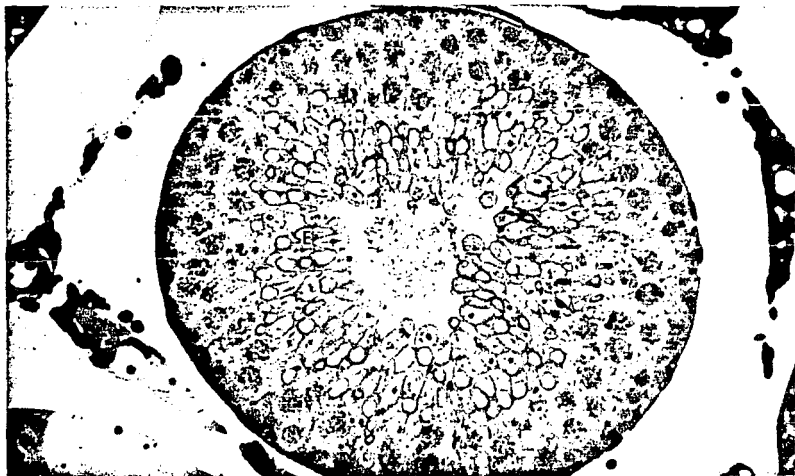
11

Figura 12. Tubo seminífero en etapa IX de un animal de 52 días del grupo DRG, se muestra el desprendimiento celular (asterisco), sincicio celular (flecha) y espermátidas en estado 9 (t) Tec. Azul de Toluidina 20 X.

Figura 13. Tubo seminífero en etapa IX del ciclo del epitelio seminífero perteneciente a un animal DR, donde se observa una morfología normal. (E) espermátidas en estado 9. Tec. de azul de toluidina 25.6X.



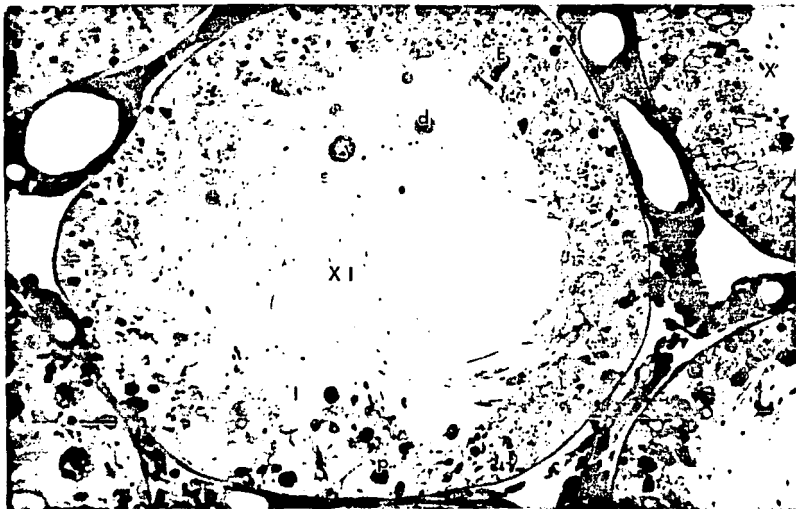
12



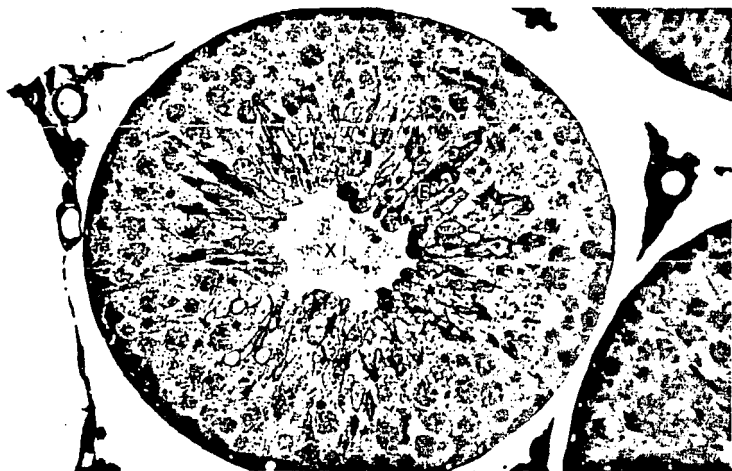
13

Figura 14 Tubos seminíferos en etapa XI de un animal de 52 días de tratamiento perteneciente al grupo DRG. Se muestran desprendimientos celulares (d), células picnóticas (p) y espermátidas en estado 11 (E). Tec Azul de Toluidina 20X.

Figura 15. Tubo seminífero en etapa XI del ciclo del epitelio seminífero de un animal DR de 52 días, donde se observa una morfología normal. (E) espermátidas en estado 11. Tec. azul de toluidina 25.6X.



14



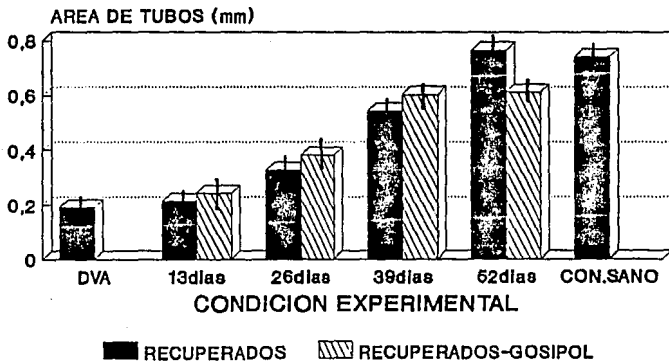
15

AREA DE TUBOS SEMINIFEROS

El área de los tubos seminíferos se vió alterado por la dieta DVA, (1.90mm) a diferencia del control sano (5.94mm) con una $p < 0.05$. A los 13 días de recuperación con retinol, el área aumenta pero no difiere del grupo DVA ($p > 0.05$). Durante 26 y 39 días de recuperación, el perímetro de los tubos se observa incrementado, tanto en el recuperado (2.59mm en animales de 26 días y 3.93mm en animales de 39 días) como recuperado gosispol (2.15mm en animales de 26 días y 4.94mm en animales de 39 días) sin alcanzar el tamaño del CS $p < 0.05$.

En los animales de 52 días de recuperación, el área (6.34mm) no difiere del CS (5.94mm), sin embargo en los animales DRG, esta área decaó a 2.68mm, siendo diferente de los grupos antes señalados. $p < 0.05$. (gráfica 2).

AREA DE TUBOS SEMINIFEROS DE RATAS DVA-RECUPERADAS, DVA-RECUPERADAS-GOSIPOL

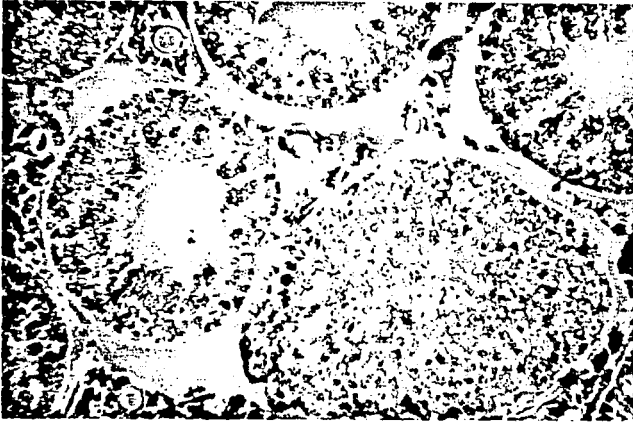


n=3
 CON.SANO= CONTROL SANO
 DVA=DIETA DEFICIENTE EN VITAMINA A

V.3. AUTORADIOGRAFIA

Los resultados de autorradiografía mostraron que en animales DR y DRG con un lapso de tiempo de 13 días los gránulos de plata se presentaron en el mismo elemento celular, es decir espermatocitos en paquiteno (fig 16). En aquellos animales con lapso de tiempo de 26 días, el grupo DR presentó los gránulos de plata en el 61.12% sobre espermátidas en estado 11, etapa del CES XI, a diferencia del grupo DRG, donde las marcas, en el mismo elemento celular y etapa del CES, se presentó en el 33.77% de los tubos analizados ($p < 0.05$) (fig. 17). Sin embargo también se presentaron marcas en espermátidas 7 etapa del CES VII en el 19.16% en el grupo DR y 37.79% en el grupo DRG, sin diferencia significativa entre estos ($p > 0.05$). Cabe hacer notar que el 10% de estas marcas en espermátidas 7 del grupo DRG, se observó sobre sincicios celulares desprendidos y células descamadas (fig. 18).

Las marcas sobre espermátidas en estado 4, etapa del CES IV, se presentaron en el 19.64% en el grupo DR y 28.42% en el grupo DRG, sin diferencia significativa entre ambos.

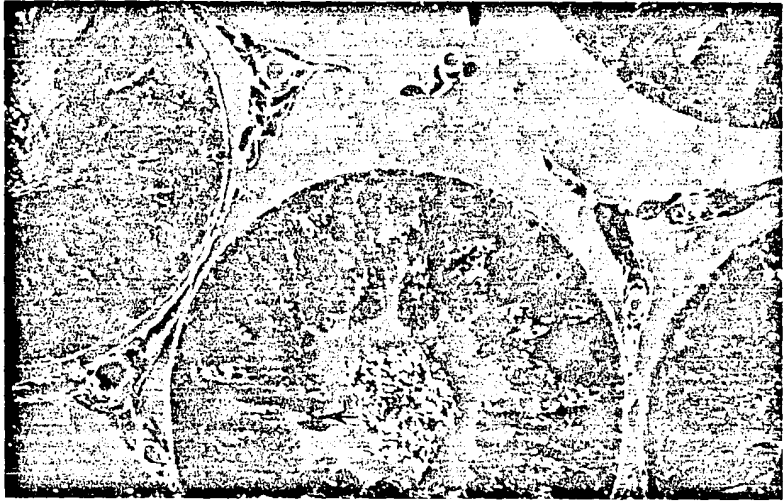


A

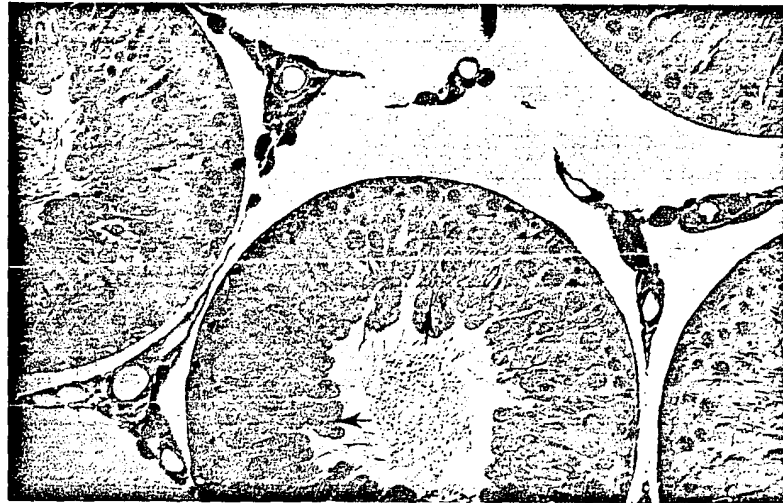


B

Figura 16 Tubos seminíferos de rata perteneciente al grupo DRG con lapso de tiempo de 13 días. Se puede observar a los gránulos de plata sobre espermatoцитos en paquiteno (flecha). A) Campo oscuro, B) Campo claro. Tec Gimsa 20 X.



A



B

Figura 17. Tubo seminífero en etapa XI de un animal del grupo DR con lapso de tiempo de 26 días. A) Campo oscuro. B) Campo claro. Gránulos de plata sobre espermátidas en estado 11 (flecha). Tec Gimsa 25 X.

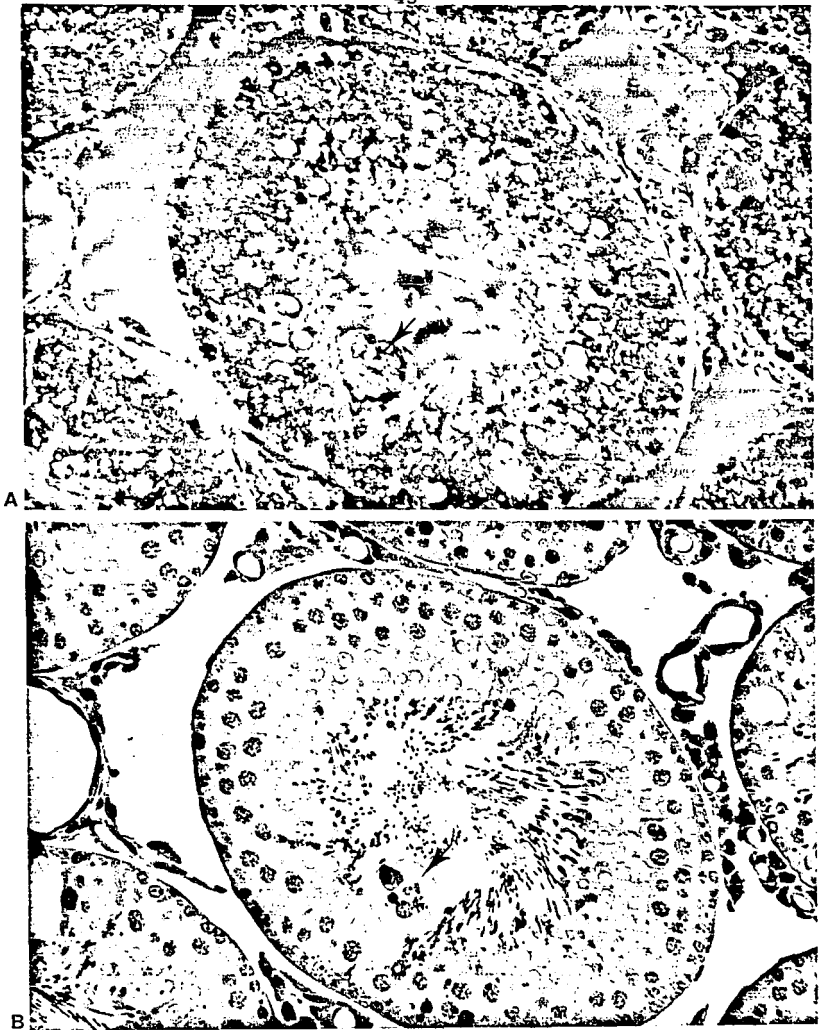


Fig 18. Tubo seminífero en etapa VII del CES de un animal tratado con gospol durante un lapso de tiempo de 26 días. A) Campo oscuro. B) Campo claro. Gránulos de plata sobre un sincio de espermátidas en estado 7 (flecha). Tec Gimsa 25 X.

V.4. MICROSCOPIA ELECTRONICA

En los animales tratados con una dieta deficiente en vitamina A durante 9 semanas, se pudo observar una gran cantidad de lisosomas en el citoplasma de la célula de Sertoli, lo cual nos muestra una gran actividad enzimática, debido a la muerte de espermatoцитos y espermátidas. La lámina basal se presentó plegada, incluso se presentaron invaginaciones hacia el interior del epitelio seminífero, lo cual trae consigo el desplazamiento de algunos elementos celulares.

Todas las estructuras denominadas en microscopía de luz como prolongaciones de las células de Sertoli, son proyecciones citoplásmicas de este elemento celular (Figura 19).

Las alteraciones más severas producidas por el gospol fueron observadas en animales de 52 días del tratamiento, razón por la cual se describirá este lapso de tiempo.

Los grupos CS y DR, con lapso de 52 días, mostraron una ultraestructura normal. Solo en el grupo DRG algunos cortes transversales del flagelo de las espermátidas en fase 18 y 19 mostraron mitocondrias alteradas, pero sin embargo el análisis de microscopía de luz mostró inmovilidad de espermatozoides.

El grupo DRG se llegó a observar con gran número de espacios intercelulares, los cuales, en algunas regiones, parecen ser distenciones de las uniones estrechas entre células de Sertoli (Figura 20).

Los espermatoцитos primarios se observaron con distintos grados de degeneración, con picnósis en el núcleo e incluso citoplasma y la lámina basal plegada (Figura 21).

Grán número de espermátidas en fase 7 de la espermiogénesis se presentaron exfoliadas hacia la luz del tubo, picnóticas e incluso formando sincicios de 2 a 4 células con las mitocondrias dispuestas en la periferia. (fig 22).

En aquellos tubos que mostraron daños severos, las células de Leydig adyacentes se vieron completamente alteradas, es decir con las cisternas del retículo endoplásmico liso muy abiertas, así como grán número de lisosomas (Fig 23).

Micrografía electrónica del epitelio seminífero de un animal deficiente en vitamina A, el cual muestra el citoplasma de la célula de Sertoli con lisosomas (L) y plegado (S) e incluso desplazando a una célula mioide invaginada hacia el interior del tubo seminífero (m) 1950 X.

Figura 19. Micrografía electrónica del epitelio seminífero de un animal deficiente en vitamina A, el cual muestra el citoplasma de la célula de Sertoli con lisosomas (L) y plegado (S) e incluso desplazando a una célula mioide invaginada hacia el interior del tubo seminífero (m) 1950 X.

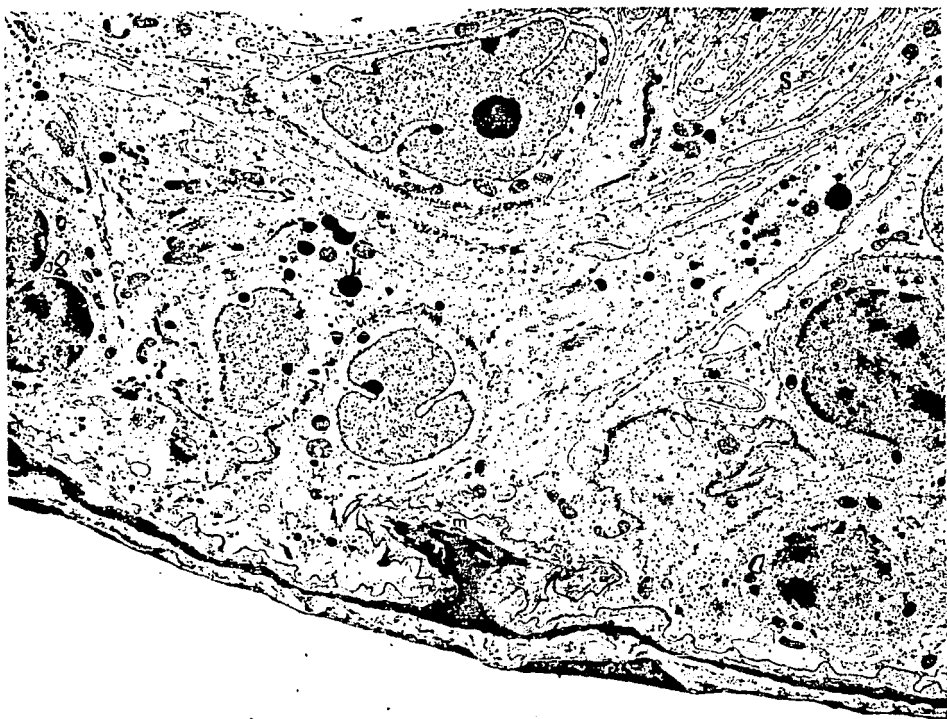


Figura 20. Micrografía electrónica del epitelo seminífero de un animal de 52 días, perteneciente al grupo DRG, el cual muestra una grán vacuola en una célula de Sertoli (V), se evidencia parte de la barrera hematotesticular (H), núcleo de la célula de Sertoli (S), espermatocito en preleptoteno (E) con su complejo sinaptonémico (flecha) 1950X.

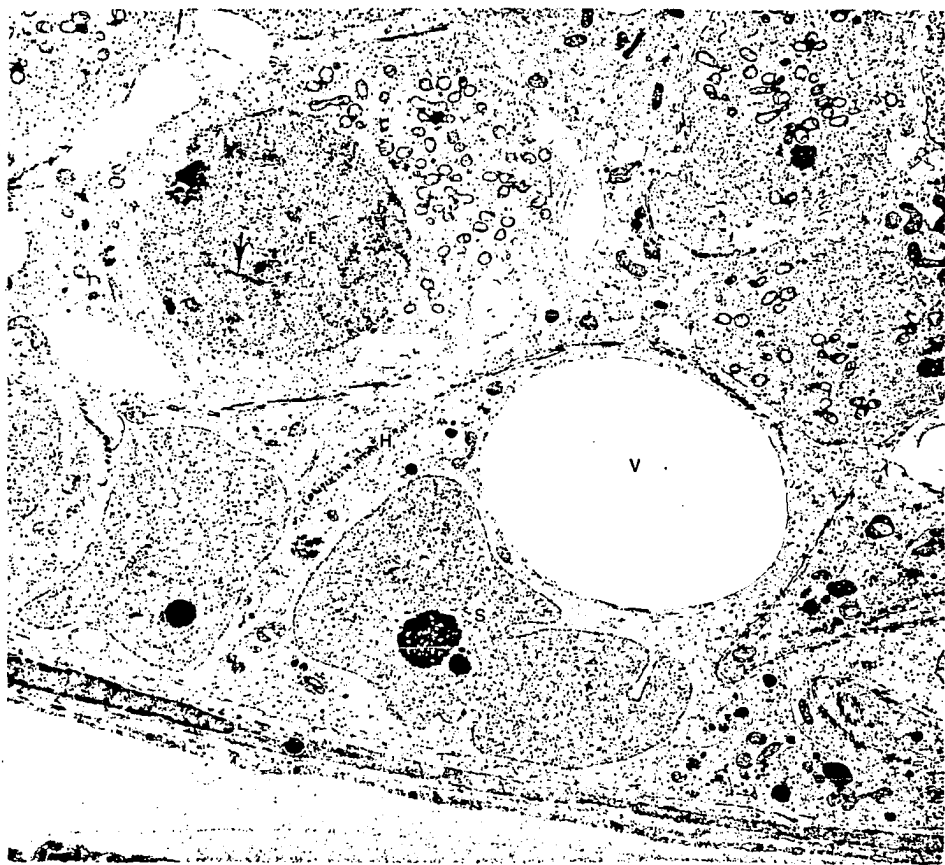


Figura 21. Micrografía electrónica del epitelio seminífero de un animal de 52 días perteneciente al grupo DRG, donde se puede observar un espermatozoido picnótico formando un gran fagosoma en el citoplasma de una célula de Sertoli (E), grandes espacios vacíos (V), núcleo de la célula de Sertoli (S) y la lámina basal plegada (flecha) 1950X.

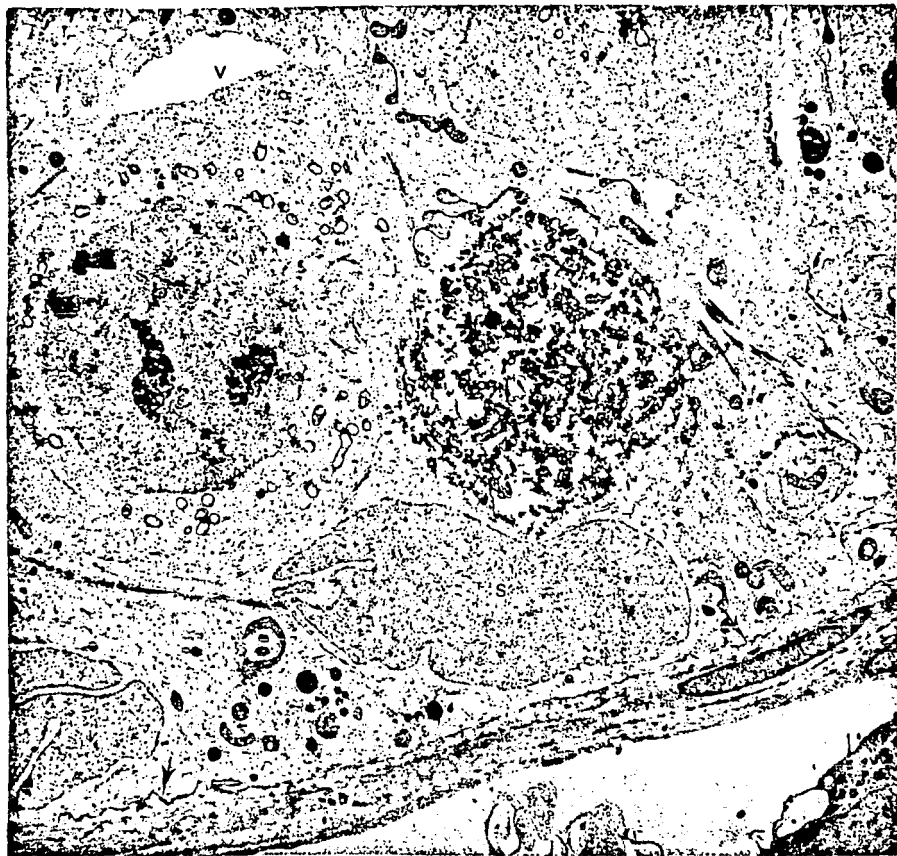


Figura 22. Micrografía electrónica de un animal de 52 días perteneciente al grupo DRG, donde se puede apreciar un sincicio celular desprendido, constituido por tres núcleos de espermátidas en fase 7 de la espermiogénesis, y parte del núcleo de otra célula, que debido al corte, no se pudo clasificar en alguna fase. Se observan lisosomas (L), núcleos ligeramente picnóticos y parte de las membranas plasmáticas en el citoplasma (m). Las mitocondrias comienzan a organizarse hacia la periferia (M), 1950X.

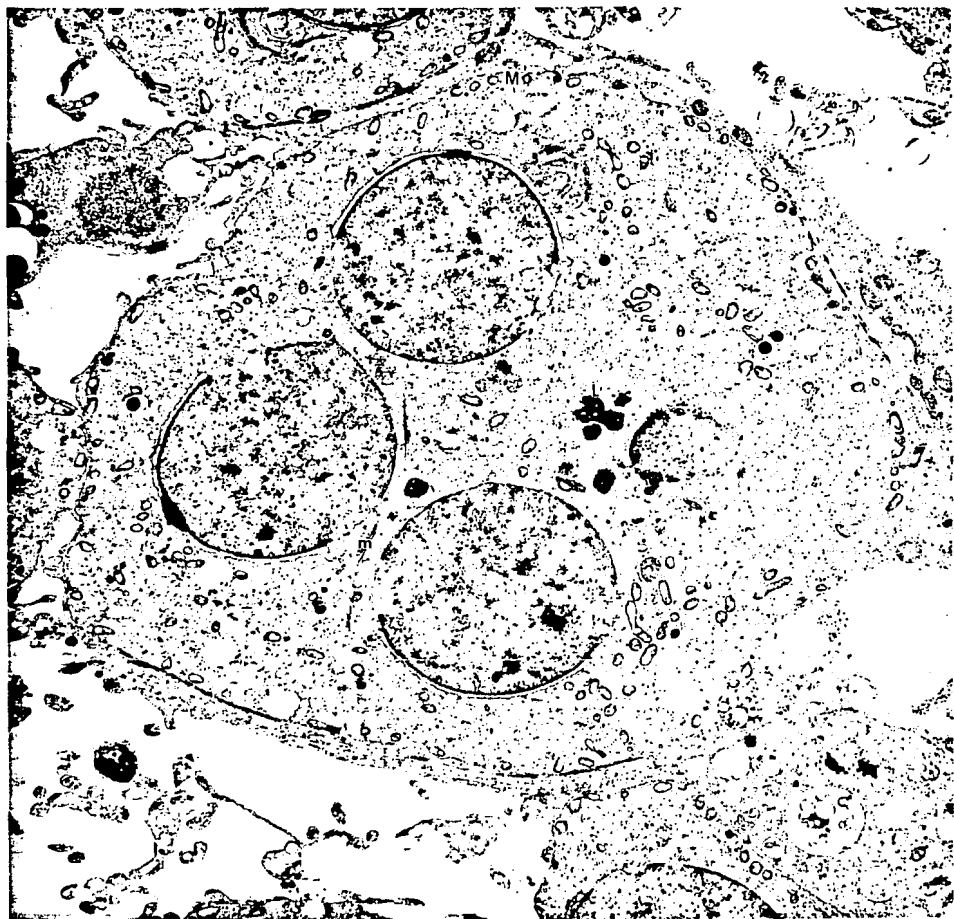
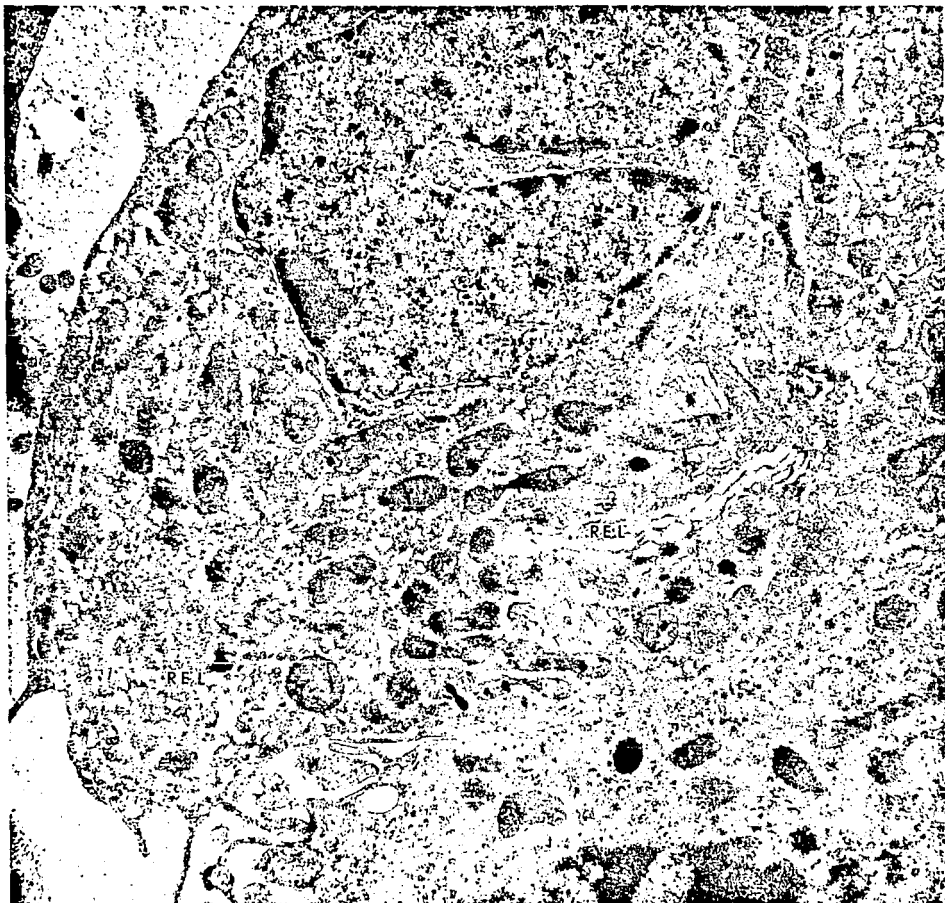


Figura 23. Micrografía electrónica de una célula de Leydig de un animal tratado con gospol durante 52 días. Se observan las cisternas del retículo endoplásmico liso abiertas (REL), a diferencia de lo observado en el grupo DR, 7500X.



V.5. ANALISIS DE BIOTRANSFORMACION

El análisis de biotransformación mostró la capacidad que tienen las células de Leydig para transformar la pregnenolona marcada a los distintos productos de la vía delta 4, como son la progesterona, 17OH progesterona, androstendiona y testosterona.

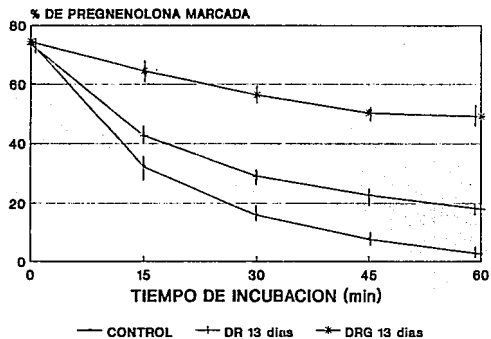
La biotransformación de la pregnenolona en los distintos grupos y lapsos de tiempo estudiados se describen a continuación.

A los 13 y 26 días tanto el grupo DR, como DRG presentan un comportamiento de biotransformación de la pregnenolona con velocidad disminuída, comparados con el grupo control sano. Sin embargo a los 39 y 52 días, la velocidad de biotransformación de este precursor es similar en los grupos DR y control sano, a diferencia del grupo DRG, el cual no alcanza la velocidad de los grupos antes descritos (Gráficas 3–6).

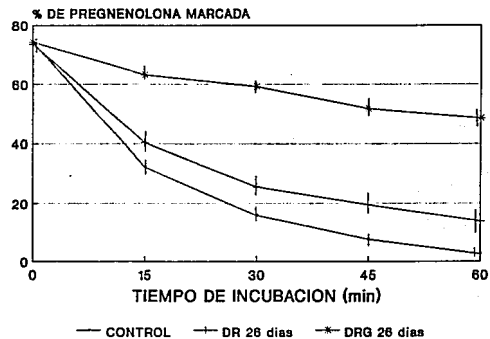
Se observó que el porcentaje de los productos de la biotransformación de la pregnenolona de la vía delta 4 (progesterona, 17OH progesterona, androstendiona y testosterona) en el grupo DRG se presentó menor, comparado con los grupos DR y control sano. Por consiguiente, el porcentaje de testosterona, como producto final de la biotransformación se observó con un incremento gradual a medida que se dió la recuperación en los grupos DR y DRG, sin embargo este último no alcanzó los niveles del control sano (Gráficas 7–10).

Los resultados mostraron que en el grupo DR la capacidad de biotransformación aumenta a medida que se da la recuperación. A 39 y 52 días de recuperación se alcanzan los niveles del grupo CS, a diferencia del grupo DRG.

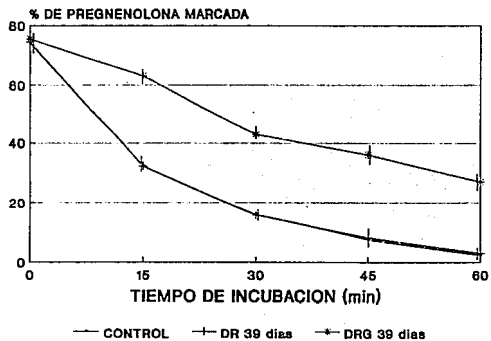
PORCENTAJE DE BIOTRANSFORMACION DURANTE DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACION CON PREGNENOLONA RADIOACTIVA



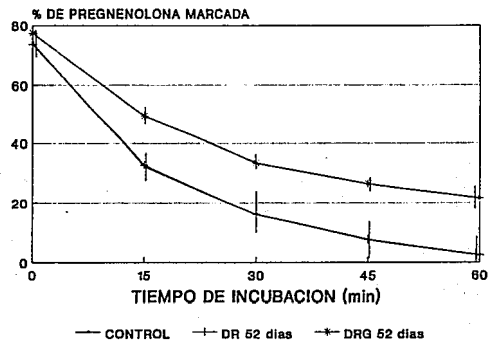
Grafica 3



Grafica 4

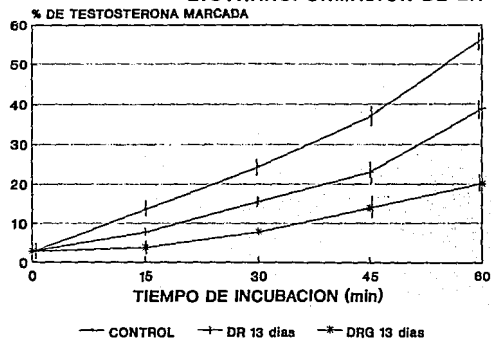


Grafica 5

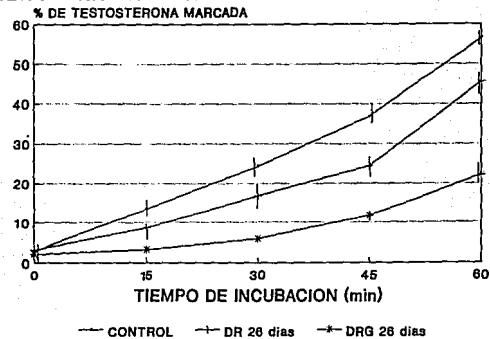


Grafica 6

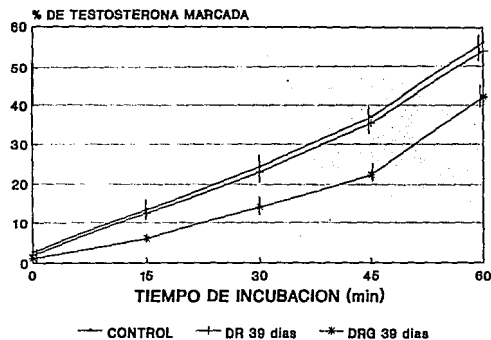
PORCENTAJE DE TESTOSTERONA COMO PRODUCTO FINAL DE LA BIOTRANSFORMACION DE LA PREGNENOLONA RADIOACTIVA



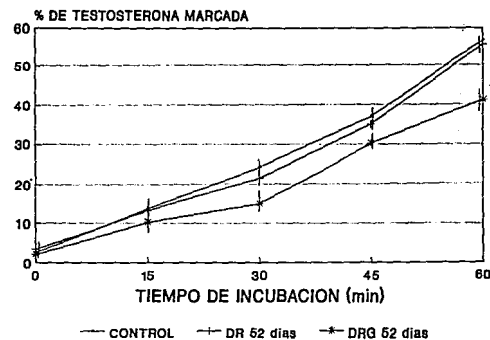
GRAFICA 7



GRAFICA 8



GRAFICA 9



GRAFICA 10

I. DISCUSION

Aunque el modelo de sincronización del CES no fué tal y como lo reporta Morales y Griswold 1987, nos permitió estudiar el efecto del gopipol sobre tubos seminíferos sincronizados, en términos de la espermatogénesis. Es por esta razón que los efectos del gopipol se presentaron más homogéneos, a diferencia de lo reportado por otros autores, quienes describen una heterogenidad de alteraciones que van desde tubos normales, hasta completamente dañados, incluso utilizando un tratamiento semejante al empleado en el presente trabajo (Hoffer, 1983; Kainz y col, 1988; Srivastava y col, 1989).

La dieta DVA confirmó que en un organismo con deficiencia de vitamina A, la meiosis no procede mas allá de los espermatoцитos en preleptoteno. Por esta razón los elementos celulares del compartimento basal se desprendieron y ante este hecho los tubos se colapsaron, disminuyendo el diámetro de éstos (Ranga y col, 1990; Vyas y col, 1990; Udoh y col, 1992; Dym y Fawcett, 1970). Conforme se da la recuperación con retinol, al paralelo con el gopipol, los animales DR y DRG prosiguen la meiosis, y las células originadas ocupan los espacios, provocando que el diámetro de los tubos aumente paulatinamente.

Los resultados de la autorradiografía mostraron un menor número de tubos marcados en etapa del CES XI, espermátidas en estado 11 en el grupo tratado con gopipol. Esto puede deberse a que las células de algunos tubos, no llegan a alcanzar esta etapa de maduración y la espermiogénesis es bloqueada en espermátida 7 etapa del CES VII. Aunque no se observó una diferencia significativa entre los porcentajes de la etapa VII como en la IV, existe una tendencia a incrementarse las marcas en la etapa del CES VII, espermátida en estado 7, en animales tratados con gopipol, pues como se mencionó, las marcas se presentaron sobre sincicios celulares o células desprendidas.

Pudiera ser que el gosispol no retrase el CES y por consiguiente la espermatogénesis; sino que este proceso es bloqueado, en algunos tubos, en espermátida 7, etapa del CES VII.

El hecho de presentarse inmovilidad de espermatozoides, como previamente se ha reportado (Chang y col, 1980; Ranga y col, 1990) coincide con lo descrito por Lu (1990), quién indica separación de la pieza media, tal y como se observó en microscopía de luz, y presentando espermatozoides con cabezas desprendidas. Sin embargo, en las imágenes ultraestructurales de las espermátidas en fase 18 o 19, solo ocasionalmente se presentaron mitocondrias alteradas en la pieza media. La inmovilidad se ha atribuido a la actividad disminuida de enzimas mitocondriales, como la malato deshidrogenasa, fumarasa, piruvato deshidrogenasa entre otras (Stephens y col, 1983; Srivastava y col, 1989). Sin embargo, de acuerdo con el presente estudio dicha alteración bioquímica parece que no se refleja morfológicamente, en los espermatozoides. La disminución del número de espermatozoides en el grupo DRG se debe a la muerte masiva de espermátidas y espermatoцитos.

La exfoliación de células germinales en los animales tratados con gosispol durante 52 días, trae consigo la disminución del área de los tubos y pueden ser la causa de la formación de espacios vacíos, así como el plegamiento de la lámina basal, como previamente lo han descrito otros autores (Chang y col, 1980; Hoffer, 1983; Srivastava y col, 1989; Singh y Rath, 1990;). Posiblemente el gosispol este afectando los mecanismos de unión de células de Sertoli hacia células germinales, o la muerte celular, por si misma, provoca el desprendimiento.

Las uniones estrechas entre células de Sertoli constituyen la barrera hematotesticular, las cuales crean un medio ambiente protegido para el desarrollo de células germinales en el compartimento adluminal (Dym y Fawcett, 1970). Se

observó que muchas de las vacuolas intercelulares son distenciones de estas uniones celulares, lo cual puede provocar la entrada de sustancias nocivas hacia este compartimento.

Pelletier y Friend, (1980) trabajando con cuyos tratados con gosipol y utilizando un antibiótico como marcador para determinar la integridad de la barrera hematotesticular, observó que el gosipol distiende las uniones estrechas entre las células de Sertoli.

La espermatogénesis en el tubo seminífero, es un proceso sincronizado entre las células de la misma etapa, en su inicio, y hasta espermátidas, estas células presentan complejos de unión (Dym y Fawcett, 1970). En los animales DRG (a diferencia de los DR) se observaron espermátidas en estado 7 unidas, formando sincicios celulares. Esto puede indicar que el gosipol retrasa o afecta el mecanismo de separación celular, lo cual lleva a la formación de estas estructuras, lo que algunos autores reportan como células gigantes (Chang y col, 1980; Hoffer, 1983; Ranga, 1990).

Con respecto a las células de Leydig, a diferencia de lo reportado por otros autores (Hoffer, 1983; Srivastava y col, 1989; Nair y Bhiwgade, 1990), y similar a lo encontrado por Udoh y col (1992), observamos a las células de Leydig con distintos grados de alteración, que van desde disminución del retículo endoplásmico liso hasta degeneración total.

Stupf y col (1988) al suministrar gosipol marcado con carbono-14 por vía intraperitoneal y/o intratesticular a ratas, determinó por autorradiografía la acumulación radioactiva, en gran parte, en las células intersticiales del testículo, con poca marca en las células de Sertoli, espermatogonias y espermatoцитos.

Algunos estudios realizados en diversas especies indican resultados controvertidos en la determinación de los niveles sericos de testosterona. Kalla y col (1990) trabajando con hamster, encontraron niveles normales. Sin embargo,

Peyster y Srebnik (1988) y Baba (1988) indican una disminución en los niveles de este esteroide; Gui y col (1989) determinaron que después de haber ingerido gisipol, en aquellos hombres que no han recobrado la espermatogénesis hay niveles bajos de testosterona.

En el hombre largos períodos administrando gisipol, se han asociado con daños irreversibles. La azoospermia permanente provoca una alteración de la función endócrina testicular, evidenciado por la disminución en la concentración de la testosterona sérica (Gui y col, 1989).

En el presente estudio el análisis de biotransformación nos muestra la capacidad que tiene la célula para transformar la pregnenolona en los distintos productos de la vía Delta 4, como es la progesterona, 17OH-progesterona, androstendiona y testosterona.

El hecho de que en las células de Leydig de los animales tratados con gisipol mostraron una disminución en la capacidad de biotransformación de hormonas esteroides de la vía delta 4 y distintos grados de daño ultraestructural, demuestra una clara alteración de estas células. El patrón de daño morfológico en el epitelio seminífero, como una consecuencia secundaria producida por anticuerpos contra LH o GnRH (Dym y col 1977; Rusell y col 1981; Huang y Nieschlang, 1986; Awoniyi y col, 1989) es similar al encontrado por nosotros en ratas tratadas con gisipol durante 52 días.

Algunos autores han descrito alteraciones producidas por el gisipol en espermatocitos en paquiteno o en espermátidas en estados 7, 16, 18 y 19 de la espermiogénesis (Chang y col, 1980; Hoffer, 1983; Srivastava y col, 1989; Ranga y col, 1990; Vyas y col, 1990; Kalla y col 1990; Nair y Bhiwgade, 1990). Nosotros observamos distintos grados de degeneración tanto en células pre como post meióticas, es decir en espermatocitos en preleptoteno, leptoteno, zigoteno, paquiteno y espermatocitos secundarios, así como espermátidas en estados 6 a

18 (etapas VI a XIV). Sin embargo la arquitectura general en los tubos seminíferos se vió mas alterada en las etapas VII–XI.

Parvinen y Ruokonen (1982) y Parvinen y col (1986) al realizar comparaciones de los distintos estados del CES aislados por microdissección y transiluminación, encontraron que la concentración de testosterona endógena es alta en los estados VII–XI. Es de interés hacer notar, que en el presente estudio, estos estados fueron los mas sencibles al tratamiento con gosipol. Sin descartar que las etapas VI, XII a XIV también presentaron alteraciones morfológicas pero de menor grado, debido, posiblemente, como una concecuencia directa de la deprivacion androgénica en las etapas VII a XI o la concentración endógena de esta hormona es menor en estas etapas.

La célula de Sertoli produce y secreta distintos agentes parácrinos secretados hacia el epitello seminífero, muchos de los cuales son indispensables para mantener la espermatogénesis (Jégou, 1992). Estas sustancias pueden estar involucradas en la comunicación entre Sertoli y germinales y entre una generación de germinales y otra, vía espacios intercelulares (Clermont y col, 1987). La secreción de muchas de estas sustancias es dependiente de la FSH, producida por la hipófisis; y la testosterona, producida por la célula de Leydig bajo estímulo de la LH hipofisiaria (Jegou y col, 1982, 1984). La deficiencia de ambas hormonas repercute en la maduración y diferenciación de las células germinales (Steinberger y Steinberger, 1975). Este hecho, probablemente altere los mecanismos de unión de Sertoli a germinal provocando la exfoliación y evitando el mecanismo de separación celular en espermátida, originando células gigantes.

Por lo cual, el gosipol provoca un abatimiento en la producción de la testosterona en las células de Leydig que probablemente influya en la célula de Sertoli para disminuir la producción de diversos agentes parácrinos necesarios para mantener la espermatogénesis.

Por lo tanto, la muerte masiva celular, la formación de sincicios celulares y la distención de las uniones estrechas entre las células de Sertoli observadas en el presente trabajo, pudiera ser un efecto indirecto del gosirol. Es decir, la alteración primaria en el testículo parece ser a nivel de las células de Leydig. La deficiente biotransformación de la pregnenolona hasta testosterona en los animales tratados con gosirol, mantiene un bajo nivel intratesticular de esta importante hormona. El efecto parece ser acumulativo, ya que las alteraciones morfológicas más dramáticas solo se hacen evidentes hasta los 52 días del tratamiento. Posiblemente en los lapsos de tiempo de 13, 26 y 39 días, las células de Sertoli subsisten produciendo agentes parácrinos, apesar de la baja capacidad de biotransformación de la pregnenolona por las células de Leydig; pero llegaría un momento en que sus reservas son disminuídas y requeriría de una cierta concentración de testosterona endógena, que no puede ser mantenida por las células de Leydig.

Aunque a los 26 y 39 días de tratamiento con gosirol se detectaron algunos tubos con alteraciones, fue evidente sin embargo, que la gran mayoría de los tubos tenían un aspecto similar a los animales cuya espermatogénesis se recuperaba normalmente en ausencia de gosirol. ¿Como explicar esta aparente paradoja?.

En nuestro modelo de tubos seminíferos sincronizados, es posible discernir entre un efecto indirecto antes mencionado y uno directo del gosirol.

Así, en algunos tubos seminíferos de 26 y 39 días de tratamiento, se hace evidente el efecto directo. Sin embargo, en la gran mayoría de los tubos seminíferos, las espermatídas marcadas, alcanzaron la misma etapa de maduración que en los animales control recuperados. Asimismo, el diámetro promedio de los tubos y su morfología general fué similar a los 26 y 39 días en presencia o ausencia del gosirol.

Al considerar que los daños mas severos se presentaron en el lapso de tiempo de 52 días, es decir la duración de un ciclo completo de espermatogénesis, podríamos también sugerir que el efecto del gosipol es, probablemente debido a un efecto directo acumulativo sobre espermatogonias, y pasando esta fase crítica, el gosipol no tiene efecto, tal y como se presentó en la mayoría de los tubos con lapso de tiempo de 13, 26 y 39 días.

VII. CONCLUSIONES

Se sugieren los siguientes efectos producidos por el gosirol:

- 1.-Indirecto acumulativo en la mayoría de los casos provocado por un daño ultraestructural y disminución en la capacidad de biotransformación de pregnenolona a testosterona en las células de Leydig.
- 2.-Directo, limitado a algunos tubos seminíferos con lapsos de tiempo de 26 y 39 días.
- 3.- Directo acumulativo sobre espermatogonias, y pasando esta fase crítica el gosirol no tiene efecto.

VIII. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, R; Geissman, T A; Edwards, JD 1960 Gossypol, a pigment of cottoseed
Chem Rev 60:555-574.

-**ACKRAND, FJ;** Neena, SB; Kelly, ME; Robin, DE 1992 Nonsteroidal sygnal
originating in the gonads Physiol Rev 72:731-775.

-**AWONIYI, CA;** Santoll, R; Chandrashekar, V; Schanbacher, BD; Zirkin, BR 1989
Quantitative restoration of advanced spermatogenic cell in adult male rats made
azoospermic by active immunization against luteinizing hormone or gonadotropin-
releasing hormone Endocrinology 125:1303-1309.

-**BABA, Y** 1988 Effect of HCG administration in the gossypol-treated male rats
Hinyokoka Kiyo 34: 643-647.

-**BAKER, G;** Murray, FT; Jefferson, LL; Bardin, C 1980 Perfusion of accesory sex
gland Cap 12; In Spring-mills and Hafez Elsevier, North Holland Biomedical Press
p 215-222.

-**BERMUDEZ, JA;** León, C; Herrera, J 1973 Fundamento y estudio comparativo
de dos métodos de análisis por saturación Rev Med IMSS 12:11-22.

-**BERMUDEZ, JA;** Mendieta E; Herrera, J 1988 Evaluación de los métodos de
aislamiento y purificación de células de Leudig y Sertoli Arch Inv Med 19:291-299.

-**CATT, KJ;** Harwood, JP; Clayton, RN; Danes, TF; Chan, V; Katikineni, M; Nozer,
K; Dufau, ML 1980 Regulation of peptide hormone receptor and gonadal
steroidogenesis Recent Prog Horm Res 36:557-622.

-**CHANG, MC;** Zhiping, GU; Saksena, SK 1980 Effects of gossypol on the fertility of
male rats, hamsters and rabbits Contraception 21: 461-469.

-**CHAKRABORTY, J;** Nelson, L; Jhunjhunwalas, J; Young, M 1976 Basal lamina
of human seminiferous tubule its role in material transport Cell Tiss Res 174:261-
271.

- CHEMES, E; Dym, M; Raj, HG** 1979 The role of gonadotropins and testosterone on initiation of spermatogenesis in the immature rat *Biol Reprod* 21: 241-249.
- CHRISTENSEN, AK; Gillim, SW** 1969 The correlation of fine structure and function in steroid-secreting cell with emphasis on those of the gonads In: Mc Kerns KW ed *The gonads* Appleton-century-crofts, New York p 415.
- CLERMONT Y** 1972 Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal *Physiol Rev* 52:198-236.
- CLERMONT, Y; Morales, C; Hermo, L** 1987 Endocytic activities of Sertoli cell in the rat In: Orgebin-Crist MC; Danzo BJ ed *Cell Biology of the testis and epididymis*. Vol 513, New York Academy of Sciences, New York p 1-15.
- CLERMONT, Y; Morgantaler, H** 1955 Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat *Endocrinology* 57:369-382.
- CORNELL, CJ** 1974 The sertoli cell of the sexually mature dog *Anat Res* 178: 333.
- DYM, M; Raj, HG; Chemes, HE** 1977 Response of the testis to selective withdrawal of LH or FSH using antigonadotropin sera In P Troen and HR Nankin ed *The testis in normal and infertile men* pp 97-101.
- DYM, M; Fawcett, W** 1970 The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium *Biol Reprod* 3: 308-326.
- FAWCETT DM** 1975 Ultrastructure and function of the sertoli cell. In Hamilton DW and Greep RO (eds) *Handbook of physiology endocrinology section 7, vol. V* Williams and Wilkins Baltimore, p 21-55.
- FAWCETT, DM; Itos; Slaughter-Back D** 1959 The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation *J Biophys Biochem Cytol* 5:453-460.

- GORE-LANGTON RE**; Armstrong, TD 1988 The Physiology of reproduction In: E Knobil and J Neil ed, Cap 10 Follicular steroidogenesis and its control New York, p331-369.
- GU, ZP**; Wang, YX; Sang, GW; Wang, WC; Chen, ZX; Zhao, XJ; Shao, QX; Jiang, Y 1990 Relationships between hormone profiles and the restoration of spermatogenesis in man treated with gossypol Int J Androl 13: 253-257.
- GUI, YZ**; Meng, CH J; Jin, LC; Wen, QY 1989 The effect of long-term treatment with crude cotton seed oil on pituitary and testicular function in men Int J Androl 12:404-410.
- HOFFER, A** 1983 Effects of gossypol on the seminiferous epithelium in the rat: A light and electron microscope study Biol Reprod 28: 1007-1020.
- HUANG, SFS**; Nieschlang, E 1986 Suppression of the intratesticular testosterone is associated with quantitative changes in spermatogonial populations in intact adult rats Endocrinology 118:619-626.
- JEGOU B** 1992 The sertoli cell Baillieres Clinical Endoc and Metab 6: 273-311.
- JEGOU,B**; Laws, AO; Kretser, DM 1984a Changes in testicular function induced by short-term exposure of the rat testis to heat: further evidence for interaction of germ cell Sertoli cell and Leydig cell Int J Androl 7:244-257.
- JEGOU, B**; Le Gac-Jégou, F; Krester, DM 1982 Seminiferous tubule and interstitial fluid production I. Effects of age hormonal regulation in immature rats Biol Reprod 27:590-595.
- KAINZ, V**; Frieck, J; Kainz, P; Kalla, NR; Rován, E; Adam, H 1988 The effect of gossypol acetic acid on the different stages on the spermatogenic cycle in the rat Int J Androl 11: 533-546.
- KALLA, NR**; Bisnooduth U; Ranga, A 1990 Response of hamster to the antifertility effect of gossypol Acta Eur Fertil 21:25-37

- KARNOVSKY**, MJ 1965 A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy *J Cell Biol*, 27: 137 A.
- KERR**, BJ; Rich, AK; Kretser, DM 1979 Alterations of the fine structure and androgen secretion of the interstitial cell in the experimentally cryptorchid rat testis *Biol Reprod* 20: 409-422.
- KRUSE**, PF; Patterson, MK 1973 *Tissue culture: Methods and applications* Academic Press, NY p 9-18.
- LEBLOND**, CP; Clermont, Y 1952 Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat *Ann NY Acad Sci* 55: 548-573.
- LIU**, GZ; Lyle, K; Cao, J 1985 Trial of gossypol as a male contraceptive. In: SJ Segal ed, *Gossypol a potential Contraceptive for men*, Plenum Press, New York. p 9-16.
- LOZA**, MC; Lemus, AL; Perez, PG (1988). Metabolismo de hormonas esteroides. In: Hicks y C Díaz, eds. *Bioquímica e Inmunología* vol II, Facultad de Medicina, UNAM, p 53-92.
- LU**, Q 1990 Comparative studies on antifertility mechanism and toxicology of tripterygium Wilfordii monomer T4 and gossypol *Chung-Kuo-I-Hsueh-Ko-Hsueh-Yuan-Hsueh-Pao* 12:440-444.
- MORALES**, C; Griswold, MD 1987 Retinol-induced stage synchronization in seminiferous tubules of the rat *Endocrinology* 121:432-434.
- NADAKAVUKAREN**, MJ; Sorensen, RH; Tone, JN 1979 Effects of gossypol on the ultrastructure of rat spermatozoa *Cell Tiss Res* 204: 293-296.
- NAIR**, IN; Bhiwgade, DA 1990 Effect of gossypol on pituitary reproductive axis: ultrastructural and biochemical studies *Indian J Exp Biol* 28: 724-732.
- NATIONAL** Coordinating Group on male antifertility agents 1978 Gossypol a new antifertility agent for male. *Chinese Med J*, 6: 417-428.

- NICANDER**, LI 1967 An electron microscopical study of cell contacts in the seminiferous tubules of some mammals. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 83:375-397.
- PARVINEN**, M; Ruokonen, A 1982 Endogenous steroids in rat seminiferous tubules. Comparison of different spermatogenic stage isolated by transillumination-assisted microdissection *J Androl* 3:211-220.
- PARVINEN**, M; Vinko, KK; Toppari, J 1986 Cell interaction during the seminiferous epithelial cycle *Int Rev of Cytology* 104:115-151.
- PELLETIER**, RM; Friend, DS 1980 Effects of the experimental contraceptive agent gossypol on guinea-pig sertoli-sertoli cell junctions *J cell Biol* 87:151a.
- PEREY**, B; Clermont, Y; Leblond, CP 1961 The wave of the seminiferous epithelium in the rat *Am J Anat* 108:47-77
- PEYSTER**, A; Srebnik, HH 1988 Reproductive endocrine function in gossypol-treated male rats *Int J Fertil* 33: 362-371.
- PRASAD**, MRN; Diezfasaly L 1982 Gossypol *Int J Androi Supp* 5:53-69.
- RANGA**, A; Kalla, NR; Kanwar, U 1990 Effect of gossypol on the fertility of male rats *Acta Eur Fertil* 21: 7-15.
- REGAUD**, C 1901 Etudes sur la structure des tubes seminiferes *Arch Anat Microscop* 4:101-156
- RIKIHISA**, Y; Lim, YC 1988 Ultrastructure of the testis and epididymis of japanese quail administered gossypol *Poult Sci* 67: 961-972.
- RITZEN**, EM; Hanssen, V; French, FS 1981 The sertoli cell, In: HG Burger and DH Krester ed, *The testis* Raven Press, New Ycrk, p 171-194.
- ROOSEN-RUNGE** L 1962 The process of spermatogenesis in mammals *Biol Rev* 47:343-377.
- RUSELL** LD 1978 The blood-testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult rat: a lanthanum tracer study *Anat Rec* 190:99-112.

- RUSELL**, LD; Clermont, Y 1977 Degeneration of germ cell in normal hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats *Anat Rec* 187: 347-366.
- RUSELL**, LD; Malone, JD; Karpas, S 1981 Morphological pattern elicited by agents affecting spermatogenesis by disruption of its hormonal stimulation *Tissue and Cell* 13: 369-380.
- SAMUELS**, LT; Bussman, L; Matsumoto, K; Huseby, RA 1975 Organization of androgen biosynthesis in the testis *J Steroid Biochem* 6: 291.
- SAMUELS**, LT; Matsumoto, K; Samuels, BK 1974 Localization of enzymes involved in testosterone biosynthesis by the mouse testis *Endocrinology* 94:55.
- SHARPE**, RM; Kerr, JB; Cooper, IB; Bartlett, JM 1986 Molecular and cellular endocrinology of the testis edited by M Stefanini M; Conti R Gerema y E Ziparo pp 15-26 *Excerpta Med Int Congr, Ser 716*, Elsevier, Amsterdam .
- SINGH**, SK; Rath, SK 1990 Histologic changes in the mouse testis after treatment with gossypol tetra-acetic acid *Arch Histol Cytol* 53: 393-396.
- SKINNER** KM 1989 Cell-cell interaction in the testis *Ann NY Acad Sci* 513: 158-164.
- SRIVASTAVA**, A; Gupta, G; Setty, BS 1989 Studies on mechanism (s) of fertility action of gossypol in rat and hamster *Contraception* 39: 337-351.
- STEINBERGER**, E; Steinberger, A 1975 Hormonal control of testicular function in mammals In:RD Greep and ER Astwood ed, *Handbook of physiology* sect 7 vol IV *Endocrinology* Williams and Wilkins Baltimore p 325-345.
- STEPHENS**, DT; Critchlow, LM; Hoskins, DD 1983 Mechanism of inhibition by gossypol of glycolysis and motility of monkey spermatozoa in vitro *J Reprod Fert* 69: 447-452.

- STUPF, WE**; Sar, M; Haider, SG; Xue, SP; Chen, KQ 1988 Sites of action of gossypol studied by autorradiography and enzyme histochemistry *Contraception* 37: 257-267.
- TAMAOKI, B** 1973 Steroidogenesis and cell structure biochemical pursuit of sites of steroid biosynthesis *J Steroid Biochem* 4:89.
- UDOH, P**; Patil, DR; Deshpande, MK 1992 Histopatological and biochemical effects of gossypol acetato on pituitary-gonadal axis of male albino rats *Contraception* 45:493-509.
- VYAS, RK**; Ranga, A; Kalla, NR 1990 Early event in rat testis after gossypol administration *Acta Eur Fertil* 21: 39-45.
- ZETTERQUIST, H** 1956 The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum Thesis Karolinska Institutet Estocolmo, Suecia.
- ZIRKIN, BR**; Ewing, LL; Kromann, N; Cochran, C 1980 Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure *Endocrinology* 6:1867-1874.