

11204 3
N=U
2Ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

CORRELACION MORFOFUNCIONAL DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-TESTICULO

DR. ALBERTO ALVARADO DURAN
PROFESOR TITULAR

DR. JESUS PEREZ SEGURA
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA Y
EDUCACION PROFESIONAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION HUMANA
P R E S E N T A :
DRA. MIRNA GPE. ECHAVARRIA SANCHEZ

TUTOR: DR. CARLOS VILLANUEVA



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE CRIGEN



1994



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.

AGRADECIMIENTOS

AL DR. A. ALVARADO DURAN POR SU
APOYO COMO PROFESOR TITULAR DEL
CURSO.

A MI TUTOR: DR. C. VILLANUEVA D.
POR SU VALIOSA DEDICACION Y COLA
BORACION EN LA REALIZACION DE ES
TE TRABAJO.

A TODOS LOS MAESTROS ADJUNTOS DEL
CURSO POR SUS VALIOSAS ENSEÑANZAS

AL DEPARTAMENTO DE MICROSCOPIA -
ELECTRONICA Y PATOLOGIA POR SU -
APOYO.

A LOS PACIENTES
YA QUE SIN SU VALIOSA PRESENCIA NO
FUERA POSIBLE LA REALIZACION DE --
NUESTRO ANHELO MEDICO.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE
CREYERON EN MI Y ME BRINDARON
SU APOYO Y AMISTAD; ESPECIAL-
MENTE A LA DRA. E. CARBALLO Y
AL BIOLOGO R. BARRERA.

A MI ABUELA MATERNA, MI MADRE Y MIS
HERMANOS, COMO UNA FORMA DE DAR GRA
CIAS POR ESTAR CONMIGO EN LOS MOMEN
TOS BUENOS Y ESPECIALMENTE EN LOS -
MALOS.

A MI COMPAÑERO Y AMIGO:
DR. G. FLORES FLORES POR SU --
COMPRESION Y APOYO SENTIMENTAL
DANDO GRACIAS POR CONTAR CON EL

A DIOS POR DARME FUERZA DE VOLUNTAD
PARA ALCANZAR MI META.

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

TITULO: CORRELACION MORFOFUNCIONAL DE EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-TESTICULO.

AUTOR: MIRNA GPE. ECHAVARRIA SANCHEZ.

TUTOR: DR. CARLOS VILLANUEVA DIAZ.

INTRODUCCION

La capacidad de una célula para interactuar con células circundantes ha sido un fenómeno evolutivo a la par de la evolución de las especies, lo cual está relacionado en forma importante al proceso de embriogénesis, organogénesis y diferenciación. El conocimiento de la fisiología celular del testículo ha evolucionado a la par del desarrollo de la especie humana. En las culturas antiguas (Romanos, Griegos, Egipcios), ya se conocía el efecto de la castración en animales y en seres humanos. Más recientemente el estudio de la anatomía ha dado con detalle la naturaleza estructural del testículo, en la cual se han basado los estudios de su función.

El examen microscópico inicial de la espermatogénesis en el interior de los túbulos seminíferos fue realizado entre 1830 y 1860. Enrico Sertoli en 1865 describió la presencia de células especiales ramificadas en los túbulos seminíferos del testículo de humano que actualmente llevan su nombre y postuló: "...la función de las células ramificadas está ligada a la maduración de las células germinales (....) con formación final de espermatozoides".

En 1899 Peter corroboró este hallazgo y concluyó que el arreglo arquitectónico que caracteriza a las células germinales y a las de Sertoli representa un claro ejemplo de la importancia de la interacción ambiental entre las diferentes células del testículo.

En 1930 Smith observó que la remoción de la hipófisis inhibía el proceso de espermatogénesis lo cual inició una serie de investigaciones sobre la fisiología testicular que continúan hasta la fecha. La hipótesis original establecía que las hormonas actuaban directamente sobre las células germinales, pero posteriormente se demostró que el efecto primario hormonal se ejercía sobre las células somáticas.

Finalmente en 1978 Fritz sugirió la existencia de interacciones célula-célula en la regulación de la función testicular. En los últimos años esta área de investigación ha recibido gran atención y se ha documentado la existencia de una intrincada red de señales de regulación paracrina en el testículo (1).

ORGANIZACION ANATOMICA

El escroto está compuesto por una capa de epitelio escamoso estratificado, una suave capa muscular el Dartos, y una capa de tejido conectivo. La función principal del escroto es mantener la temperatura del testículo y del epidídimo alrededor de 33 °C.

El testículo humano es un órgano par que pesa en promedio entre 15-19 gr, es de forma oval y se encuentra localizado en la bolsa escrotal. El testículo derecho es usualmente 10% más grande que el izquierdo. De fuera hacia adentro el testículo se encuentra recubierto por varias capas de tejido, las tunicas vascular, vaginal y la albugínea. Macroscópicamente está dividido por septos en diferentes compartimentos en los que se encuentran los túbulos seminíferos.

A los túbulos seminíferos les corresponde el mayor porcentaje del volumen testicular (85%). El tejido intersticial, que incluye a las células de Leydig, células mioideas, vasos sanguíneos, y vasos linfáticos; forma la porción restante del volumen testicular. En contraste con el adulto, el tejido intersticial representa el mayor porcentaje de volumen testicular en la etapa prepuberal.

El volumen testicular se incrementa progresivamente durante la niñez siendo más rápido durante la adolescencia temprana. El diámetro de los túbulos seminíferos también se incrementa después de la pubertad. (2)

En el adulto es posible reconocer 4 tipos celulares principales en el testículo:

I. Intratubulares

1. Células de Sertoli. Estas proporcionan apoyo estructural y funcional para la maduración de células germinales.
2. Células germinales. Espermatogonias, espermátocitos primarios y secundarios, espermátides y espermatozoides.

Las células de Sertoli descansan en la membrana basal del túbulo seminífero y en su citoplasma se encuentran embebidas las células del epitelio germinal.

II. Extratubulares:

3. Células mioideas peritubulares localizadas en la superficie externa de los túbulos y extendiéndose hasta las porciones distales de la rete-testis y el epidídimo.

4. Células de Leydig se encuentran en el intersticio y son las responsables de la producción de andrógenos.

La barrera hematotesticular se establece durante la pubertad; y se forma de la unión especializada entre la célula de Sertoli y la membrana basal, logrando que el microambiente testicular sea similar en su contenido de iones, aminoácidos y proteínas, que el plasma o la linfa (1).

La formación de los gametos masculinos (espermatogénesis) ocurre en los túbulos seminíferos del testículo. El proceso es continuo en el adulto y envuelve eventos mitóticos y meióticos. Durante el desarrollo embrionario, las células germinales primordiales migran desde el saco vitelino hasta el botón germinal. El desarrollo testicular fetal requiere de las células germinales primordiales (gonocito) y del elemento somático del túbulo seminífero (célula de Sertoli). Durante el desarrollo fetal, elementos germinales y somáticos se dividen dentro del túbulo. En este período de rápida división celular, las uniones entre las células de Sertoli como se observan en la etapa adulta, no están formadas y no hay una diferenciación entre el compartimiento basal y el lumen. Durante el desarrollo prepuberal, las células de Sertoli no se dividen y la diferenciación de la espermatogonia ocurre como un rompimiento de una actividad mitótica y meiótica que resulta en muerte celular.

La espermatogénesis es un evento de maduración del epitelio germinal que se asocia con cambios morfológicos característicos. Los gonocitos se diferencian en espermatogonias al momento o poco

después del nacimiento, éstas son células grandes y redondas, con cromatina dispersa y alguna cromatina densa alrededor de la membrana nuclear. De acuerdo a su morfología se clasifican en 8 subtipos, la más importante es la tipo B que no está en contacto con la membrana basal y contiene varias masas de heterocromatina cercanas o unidas a su membrana nuclear. Al final de su mitosis da origen a los espermatocitos primarios que rápidamente sufren la primera división meiótica para formar los espermatocitos secundarios. Con la segunda división meiótica se forman las espermatídes, lo que va seguido del proceso de espermiación, que consiste en la liberación de espermatídes elongadas de la célula de Sertoli con producción de espermatozoides.

El espermatozoide deja el túbulo seminífero, penetrando en la rete testis y en los ductos eferentes para posteriormente entrar en el epidídimo. Dejando el epidídimo, el espermatozoide pasa a los ductos deferentes, y posteriormente al ampulla de los ductos deferentes y al ducto eyaculatorio durante la eyaculación (1,2).

EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-TESTICULO

En el hipotálamo basal medial se encuentran neuronas peptidérgicas que hacen sinápsis con grupos neuronales en diversas regiones del sistema nervioso central, cuya función es controlar directa o indirectamente la secreción del factor liberador de gonadotropinas (GnRH). El GnRH es un decapeptido que se sintetiza en el hipotálamo y se libera a la circulación del sistema venoso porta-hipofisario por donde es transportado a la hipófisis anterior liberando LH y FSH.

La secreción de GnRH al sistema portal-hipofisiario es episódica con una frecuencia que varía de 2 a 4 pulsos cada 6 hr. Esta es la razón de la liberación episódica de LH que de hecho se utiliza como un indicador de la secreción pulsátil de GnRH. La frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH y LH es modulada por los esteroides sexuales. (3)

Las hormonas luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH) son secretadas por las mismas células basófilas PAS-positivas de la adenohipófisis. FSH actúa en la célula de Sertoli principalmente y LH en la célula de Leydig. El resultado de la acción conjunta de ambas gonadotropinas es por una parte el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis; y por otra la producción de testosterona que tiene efecto dentro del testículo y en todos los tejidos de la economía. (3,4)

MARCO TEORICO

La compleja función del testículo ha sido estudiada exhaustivamente en modelos animales y los datos experimentales que establecen la relación funcional entre la gónada y el eje hipotálamo-hipófisis, así como la regulación parácrina dentro del testículo han sido extrapolados directamente al humano.

Uno de los estudios más importantes sobre pulsatilidad de GnRH fue realizado por Wildt y Cols. (5) en monos Rhesus ovariectomizados a los cuales se produjo daño a nivel hipotalámico para analizar mediante la aplicación de análogos de GnRH en forma de pulsos, la secreción selectiva de FSH y LH.

De acuerdo con los resultados de Wildt, se ha corroborado que la frecuencia y amplitud de liberación de GnRH son los elementos más importantes que modulan simultáneamente la secreción de las gonadotropinas; aunque aún se discute que existen sustancias sintetizadas y liberadas en los túbulos seminíferos que pueden regular de manera selectiva la secreción de FSH. También en el hombre se ha demostrado la secreción pulsátil de GnRH y la modulación por su frecuencia y amplitud de la secreción selectiva de FSH y LH (3,6,7). En la rata (8,9,10,11), en monos Rhesus (5) y en el hombre se ha determinado que testosterona y estradiol juegan un papel importante en el mecanismo de regulación de FSH y LH.

El tubo seminífero produce inhibina, una proteína que contribuye aproximadamente en un 22% a la supresión de FSH en forma conjunta con estradiol y testosterona.

FSH induce a la célula de Sertoli a la producción de diversas sustancias dentro de las que se encuentran: proteína fijadora de andrógeno (ABP), inhibina, transferrina (proteína transportadora de hierro), IGF-I (factor de crecimiento I) y activador del plasminógeno. Además es necesaria en la espermiogénesis y en la aromatización de la testosterona. (3,4,6)

La acción fundamental de LH es estimular la biosíntesis y secreción de testosterona en las células de Leydig. LH se une a receptores específicos que activan las unidades catalíticas de la proteína-quinasa, facilitando la conversión de colesterol a pregnenolona y mediante la acción de enzimas microsomales a testosterona. La expresión de los receptores membranales para LH en la célula de Leydig requiere de la participación de FSH. La mayor parte de testosterona se encuentra unida a la proteína transportadora de testosterona (TesBG) y albúmina.

El metabolismo de la Testosterona puede realizarse mediante 3 vías. Por conversión mediante la 5 alfa-reductasa a andrógenos de mayor potencia biológica, como la dihidrotestosterona, o menos potentes como la androstenediona o la dihidroepiandrosterona. Puede también ser convertida en androsterona y eticolanolona para ser excretados por la orina como glucurónidos y sulfatos. Finalmente puede convertirse en estradiol que tiene actividad biológica diferente a su precursor. (4,6,12,13)

La primera influencia parácrina testicular descubierta en la interacción célula-célula fue la producción y metabolismo androgénico a nivel de las células de Leydig y las células mioides

peritubulares. Se cree que ambas derivan de una célula pluripotencial mesenquimatosa, sin embargo a pesar de la íntima relación filogenética no existe un contacto íntimo entre ellas, teniendo ambas acceso a los nutrientes intravasculares. Otra característica común de estas células es que sus funciones reguladoras se llevan a cabo a través de andrógenos. (1)

Las células de Leydig son poligonales, miden de 15 a 20 micras y sus membranas plasmáticas frecuentemente se pliegan y/o forman microvellosidades. Su organelo más prominente es el retículo endoplásmico liso; otra característica particular es que en el citoplasma tienen gotas de lípidos, cristales de Reinke y lisosomas. Algunos factores de naturaleza no esteroidea, tales como la renina, la prodimorfina y oxitocina producidos en la célula de Leydig, pueden afectar a la función de la célula de Sertoli y a las células germinales. (1,4,14)

Las células de Sertoli son elementos somáticos del túbulo seminífero de forma contorneada y de estructura columnar con núcleo de forma irregular y nucléolos distintivos tripartitos, con citoplasma voluminoso que envuelve a las células germinales y que se extienden desde la membrana basal del túbulo seminífero hasta el lumen del mismo. Poseen receptores susceptibles de ser modificados por andrógenos y por FSH y pueden inhibir a la célula de Leydig a través de factores de crecimiento y/o estrógenos.

La membrana basal de los túbulos seminíferos impide el contacto entre las células de Sertoli y germinales en el compartimento tubular y las células de Leydig y mioides en el intersticial. Sin

embargo la cooperación sinérgica está bien demostrada desde el punto de vista bioquímico; siendo la prueba más clara la producción de andrógenos y la participación de los mismos en la espermatogénesis.

Estas interacciones celulares, en un arreglo complejo de señales autocrinas y paracrinas, regulan la maduración ordenada del epitelio germinal, la función de las estructuras del sistema nervioso central y los efectos sistémicos en la masa muscular y estructura ósea. (1,7,15,16)

Las concentraciones séricas de las hormonas producidas en la hipófisis y en el testículo son marcadores fieles de la integridad funcional de estas glándulas. El estudio global del eje hipotálamo-hipófisis-testículo desde el punto de vista endocrino requiere la medición de LH, FSH, PRL, testosterona, estradiol, dihidrotestosterona y la producción de espermatozoides por el testículo. (17)

La compartimentalización anatómica de este órgano permite en términos generales integrar ejes específicos de interacción entre las estructuras del sistema nervioso central y la gónada. Por ejemplo, la función del intersticio puede evaluarse por la medición simultánea de los niveles basales de LH y testosterona. En cambio el compartimento tubular se estudia midiendo las concentraciones basales de FSH y la densidad espermática en un análisis seminal. Recientemente se ha reconocido que inhibina podría funcionar también como un buen indicador de la función de la célula de Sertoli. (1,3,6,7).

La dependencia entre estas hormonas en mecanismos de retroalimentación hacen posible no solamente estudiar la producción hormonal de la hipófisis y la función testicular, sino que es posible inferir por sus concentraciones si existe alguna deficiencia en el órgano blanco (hipogonadismo primario) o en las estructuras del sistema nervioso central (hipogonadismo secundario). En el primer caso, la concentración de las hormonas hipofisarias se encuentra elevada y la de testosterona baja. Esto generalmente se acompaña de una producción inadecuada de espermatozoides. Cuando la falla es secundaria, tanto las gonadotropinas como testosterona se encuentran disminuidas con fallo en la maduración del epitelio germinal.

El hipogonadismo hipogonadotrópico que es el otro nombre que recibe el hipogonadismo secundario puede deberse a disfunción de la hipófisis o del hipotálamo. Desde el punto de vista clínico, algunas características podrían orientar acerca del nivel de afección pero esto no siempre es posible. Esto hace necesario el empleo de diversas pruebas de reserva funcional de los órganos del sistema hipotálamo-hipófisis-testículo para distinguir cual de ellos se encuentra afectado. (4)

PRUEBAS DINAMICAS

Las pruebas de reserva funcional se utilizan para medir la respuesta de un órgano endocrino o de una serie de glándulas que tienen relación funcional entre sí, con el propósito de investigar disfunción subclínica o para estudiar el nivel de afección. Para este fin se utilizan fármacos que actúan en un nivel específico de

los ejes endocrinos. En el hombre, el estudio dinámico del eje hipotálamo-hipófisis-testículo se lleva a cabo con GnRH, citrato de clomifeno (CC) y Ketoconazol (KCZ).

GnRH: La inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea o la aplicación intranasal del decapeptido o sus análogos sintéticos produce un estímulo directo a la hipófisis con la consecuente liberación de gonadotropinas y secundariamente de testosterona. Esta respuesta puede medirse en la sangre en un periodo de dos horas posteriores a la ministración por vía intravenosa. La prueba es de gran utilidad para descartar hipogonadismos de origen hipofisario. (3,5)

Citrato de clomifeno: Es un antiestrógeno que actúa ocupando los receptores estrogénicos en las neuronas de GnRH en el hipotálamo. De esta manera interfiere con la liberación pulsátil de GnRH, produciendo una mayor liberación de FSH y LH lo cual induce la elevación de los niveles séricos de testosterona en hombres normales. (19)

Ketoconazol: Este medicamento que surgió como un antimicótico disminuye la producción esteroideogénica testicular por inhibición de la actividad de enzimas dependientes del citocromo P-450, principalmente de la enzima 17-20 desmolasa. Su ingesta crónica reduce los niveles circulantes de testosterona, lo cual se acompaña de un incremento progresivo de LH y FSH en el suero por interrupción de la retroalimentación negativa de los andrógenos en el hipotálamo. (20,21)

ESTUDIO HISTOLOGICO DEL TESTICULO.

El estudio histológico es un método de gran utilidad en el diagnóstico de la patología testicular. Sus principales indicaciones son:

1. Para hacer diagnóstico diferencial entre la patología obstructiva y no obstructiva en casos de Azoospermia.
2. Como indicador pronóstico y terapéutico en casos de Oligospermia.

La valoración de la histología testicular se ha modificado con el tiempo. Actualmente existe la posibilidad de establecer correlaciones entre el estado de maduración del epitelio germinal y su expresión final, es decir la característica seminal. La identificación de espermátides tardías y espermatozoides, así como su relación con espermatocitos y espermatogonias parece ser un índice sensible de la integridad de la espermatogénesis. Sin embargo no existe hasta el momento alguna clasificación morfológica de la biopsia testicular que haga posible establecer correlaciones de tipo morfo-funcional. Las clasificaciones de Johnson, Rodríguez Rigau y otras donde se estudia de manera sistemática el contenido celular del túbulo seminífero pero en ninguna de ellas se toma en cuenta el estado del intersticio.

(22,23)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de la función gonadal en el hombre es un tema actual por sus implicaciones en el tratamiento de la esterilidad y el diseño de métodos anticonceptivos.

Debido a restricciones éticas, la función testicular ha sido estudiada principalmente en modelos animales a partir de los cuales se han extraído una serie de conceptos sobre la regulación endocrina intragonadal. Sin embargo, la extrapolación de estos datos a la función gonadal en el humano tiene limitaciones propias de las diferencias fisiológicas interespecies.

El diagnóstico diferencial preciso de las causas de Azospermia es difícil pero para fines didácticos pueden ser clasificadas como pretesticulares, testiculares y posttesticulares. Las causas pretesticulares son generalmente ocasionadas por falla endocrina, las testiculares implican la existencia de lesión del epitelio germinal por causas diversas y las posttesticulares se encuentran representadas principalmente por lesiones anatómicas de tipo obstructivo.

En la azospermia pretesticular la imagen endocrina es la de hipogonadismo hipogonadotrópico o bien de hipogonadismo normogonadotrópico con evidencia de disfunción tiroidea, suprarrenal, hepática, renal. En cambio la falla testicular primaria se caracteriza por la presencia de hipogonadismo hipergonadotrópico (niveles bajos de testosterona, deficiente o nula producción de espermatozoides y gonadotropinas aumentadas).

(4,24,25)

La compartimentalización propia del testículo hace posible la existencia de lesiones parciales de la gónada. En algunos casos se encuentra falla tubular exclusivamente y en otros falla pantesticular (intersticio y túbulo). La falla intersticial aislada es rara, solamente se ha reportado en el eunuco fértil (deficiencia aislada de LH).

La interrupción de las señales de retroalimentación negativa desde el testículo, bien sea del túbulo (inhibina, folistatina, activina) o del intersticio (testosterona, estradiol) es responsable de la elevación de los niveles de gonadotropinas circulantes. Esto último implica entonces que cualquier alteración anatómica o funcional de los elementos celulares del testículo se manifiesten con elevación de LH y FSH. (26,27,28)

Existe un grupo de pacientes con azoospermia por ausencia del epitelio germinal (síndrome de células de Sertoli solamente) que conservan la integridad funcional del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Esta es una entidad interesante desde el punto de vista de la endocrinología testicular en tanto que permite suponer que la comunicación entre las diferentes células en el compartimento intersticial y el túbulo seminífero está conservada.

En general, los pacientes que tienen daño selectivo del túbulo seminífero, muestran incremento en los niveles de FSH sin un efecto significativo en los niveles de LH o Testosterona. Esto se ha tratado de explicar en base a que podrían existir mecanismos de autorregulación inhibitoria selectivos para FSH que aún no se

han logrado esclarecer. Estos elementos regulatorios podrían ser producidos por las células del epitelio germinal puesto que se ha observado que existe una correlación inversamente proporcional entre el número de células germinales residuales y los niveles de FSH. (1,26,27,28,29)

La investigación en modelos animales ha demostrado que los niveles de LH y FSH pueden ser controlados separadamente por la frecuencia de la pulsatilidad del GnRH, ya que la disminución de la frecuencia de pulsos favorece la secreción de FSH y la pulsatilidad más rápida favorece la secreción de LH (5). En pacientes azoospermicos el incremento selectivo de FSH se asocia con disminución en la frecuencia de pulsos de GnRH y elevación de la relación FSH/LH. El decremento de la pulsatilidad de GnRH podría ser un fenómeno primario o secundario. Aun cuando esto no se ha aclarado lo más probable es que la falla testicular origine cambios en el sistema regulatorio hipotálamo-hipofisario. (26,27,28,29)

Uno de los aspectos más complicados actualmente es el poder definir los elementos principales de la regulación fina entre los diversos tipos celulares de la gónada masculina y el sistema psico-neuro-endocrino. Esto se refleja en la incapacidad tanto para diseñar métodos reversibles de anticoncepción como para definir esquemas terapéuticos en casos de infertilidad masculina. El uso de hormonales con el fin de interrumpir la espermatogénesis ha sido ineficaz, como también ha sido improductivo el tratamiento estimulador del testículo. A nuestro juicio esto se debe a que

no se conocen con certeza las bases de la regulación intratesticular de la producción hormonal y de la espermatogénesis.

Mientras la investigación básica avanza en el conocimiento de diferentes factores de crecimiento y hormonas polipeptídicas con acciones muy definidas en la comunicación célula-célula dentro del testículo, los elementos principales de regulación neuroendocrina en nuestra especie son desconocidos.

Esto se hace evidente en los estudios en pacientes con Oligospermia en los que se ha analizado la pulsatilidad de LH y las concentraciones de inhibina sin que hasta el momento se haya demostrado correlación con la función gonadal.

HIPOTESIS

La respuesta dinámica de las gonadotropinas (FSH/LH), depende del estado funcional de la gónada, por lo tanto en la patología testicular puede demostrarse correlación entre la imagen histológica en la biopsia testicular y los niveles de gonadotropinas en plasma tanto en condiciones basales como después de la estimulación del eje hipotálamo-hipófisis- testículo.

OBJETIVO

Estudiar la relación estructura-función de la gónada masculina en condiciones basales y con pruebas dinámicas del eje hipotálamo-hipófisis-testículo en pacientes con Azoospermia normogonadotrópica.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 20 pacientes estériles con azoospermia en 3 análisis seminales; con volumen testicular normal y niveles normales de gonadotropinas (LH/FSH). En todos los casos se descartó la presencia de eyaculación retrógrada y criptozoospermia. Los pacientes fueron sometidos al estudio de biopsia testicular y prueba dinámica con Citrato de Clomifeno (CC). El protocolo fue aprobado por el comité de ética de nuestro Instituto quedando para su manejo de la siguiente forma:

PRUEBAS DINAMICAS

Se obtuvieron muestras de 10 cc de sangre venosa en ayuno, antes y después de la administración de 100 mgrs de CC/día/7 días por vía oral. Las muestras de sangre fueron separadas por centrifugación a 3 000 rpm. durante 20 minutos a temperatura ambiente y el suero almacenado a -20GC hasta el momento del análisis.

Las alícuotas de suero fueron procesadas por radioinmunoanálisis para la determinación de hormona Luteinizante (LH), Foliculoestimulante (FSH), Prolactina (PRL) y Testosterona libre (TL) por método de doble anticuerpo. Las muestras pre y post-tratamiento de cada paciente fueron incluidas en el mismo ensayo para disminuir la variabilidad interensayo.

ESTUDIO HISTOLOGICO

Al final de la prueba dinámica, los pacientes fueron sometidos a biopsia testicular unilateral o bilateral en caso de que el volumen testicular mostrara diferencia mayor de 3 mL entre ambos

testículos.

El tejido fue obtenido por la técnica de ventana y fijado en Bouin para estudio de microscopía de luz y con glutaraldehído al 3% para estudio en corte semifino por dos patólogos en diseño cegado. Se registraron las características de los elementos tubulares e intersticiales de acuerdo a una clasificación arbitraria, basada en un puntaje de 0-4 para cada uno de los siguientes elementos: fibrosis peritubular, hialinización tubular, células de Leydig, engrosamiento de la membrana basal.

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados hormonales se analizaron estadísticamente por el método de varianza (ANOVA) con valor alfa de 0.05. Los datos del estudio histológico se calificaron y expresaron como variable cuantitativa discontinua.

RESULTADOS

ESTUDIO HISTOLOGICO

Se excluyeron 5 pacientes del análisis final por no contar con datos completos. En todos los casos (n=15) se demostró la presencia de síndrome de células de Sertoli (SCS) puro o mixto (fig.1 a,b); con grados variables de fibrosis peritubular con hialinización tubular. En 5 casos, además se observó hiperplasia de células de Leydig (HCL), las cuales contenían abundantes gránulos en su interior (fig.1 c,d).

En base a esta observación los pacientes fueron divididos en 2 grupos :

GRUPO 1 (n=5) pacientes con Hiperplasia de las células de Leydig.

GRUPO 2 (n=10) pacientes con células de Leydig normales.

Los pacientes del grupo 1 mostraron valores más altos en la calificación de daño testicular (Gráfica 1). En cambio los pacientes con imagen testicular en la que no se pudo demostrar hiperplasia de células de Leydig, tuvieron valores más bajos en nuestra clasificación histológica.

NIVELES HORMONALES BASALES

Los niveles basales de LH, FSH, y Tl, y el índice de FSH/LH en los grupos 1 y 2 se presentan en las tablas 1 y 2.

Los valores de LH en ambos grupos se encontraban dentro de los límites normales (4.2-14.5 mIU/mL). Los valores de FSH en el grupo 2 también estuvieron dentro de los límites normales (4-13 mIU/mL) con excepción de un paciente que tuvo 17 mIU/mL. En el grupo 1 se encontraron los niveles más elevados de FSH (9.2-32 mIU/mL).

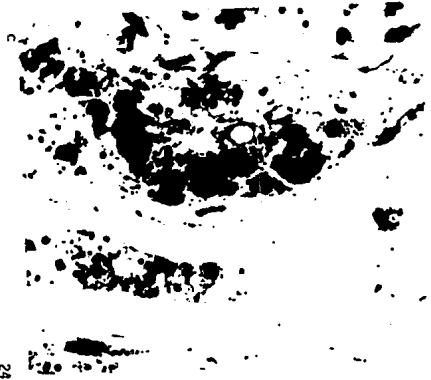
F I G U R A 1

FOTOMICROGRAFIAS EN LAS QUE SE MUESTRA:

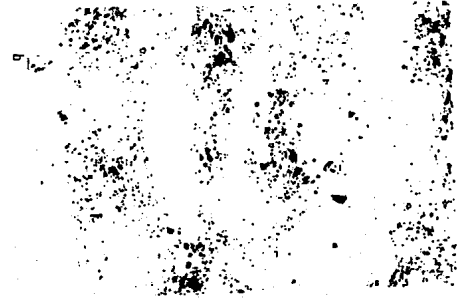
- A) SECCION DE UN TUBULO SEMINIFERO CON APLASIA GERMINAL, EN EL INTERIOR SOLO SE OBSERVA -
CELULAS DE SERTOLI (SINDROME DE CELULAS DE SERTOLI). (BARRA =11.5 μ M)
- B) TUBULOS SEMINIFEROS HIALINIZADOS POR FIBRAS DE TEJIDO CONECTIVO (*). (BARRA =58.0 μ M)
- C) IMAGEN TESTICULAR QUE PRESENTA HIPERPLASIA DE CELULAS DE LEYDIG, ENGROSAMIENTO DE LA -
MEMBRANA BASAL (FLECHAS) Y FIBROSIS PERITUBULAR. (BARRA = 11.5 μ M)
- D) INTERSTICIO TESTICULAR CON HIPERPLASIA DE CELULAS DE LEYDIG Y ACUMULO DE GRANULOS CITO
PLASMATICOS (FLECHAS). (BARRA 11.5 μ M).



B



C



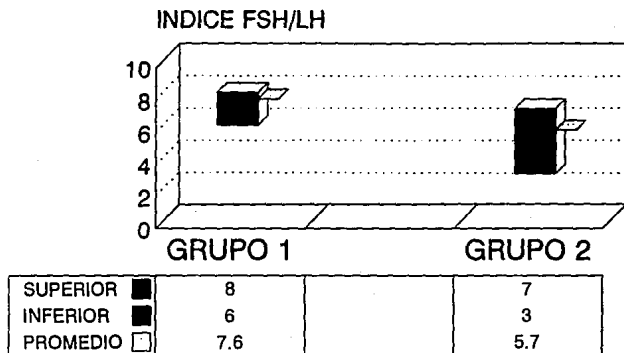
D



D

SINDROME DE CELULAS DE SERTOLI

IMAGEN HISTOLOGICA



GRAFICA 1 : CALIFICACION HISTOLOGICA DEL DAÑO TESTICULAR (INTERVALO DE 2 A 8). EN PACIENTES CON SINDROME DE CELULAS DE SERTOLI Y NIVELES NORMALES DE GONADOTROPINAS.

TABLA 1.

GRUPO I

No.	LH	FSH	T	FSH/LH	FSH/LH OMIFIN (%)	T OMIFIN (%)
1	160	225	80	14	-171	-170
2	42	92	225	22	644	600
3	60	200	220	33	-354	230
4	82	320	240	39	-154	1000
5	24	160	400	67	-826	-270

Tabla 1. Valores hormonales basales y posteriores a la administración de citrato de clomifeno en pacientes del grupo 1.

TABLA 2.

GRUPO II

No.	LH	FSH	T	FSH/LH	FSH/LH OMIFIN (%)	T OMIFIN (%)
1	35	23	150	.7	650	130
2	87	72	320	.8	170	437
3	34	30	270	.9	800	-132
4	145	130	180	.9	2500	560
5	54	59	290	1.1	-138	-104
6	36	40	220	1.1	-364	50
7	59	68	320	1.2	-26	438
8	18	25	180	1.4	-370	1555
9	100	170	200	1.7	41	400
10	118	64	190	1.8	-440	420

Tabla 2. Valores hormonales basales y posteriores al tratamiento con citrato de clomifeno en pacientes del grupo 2.

Al analizar la relación entre ambas gonadotropinas (Gráfica 2), se encontraron valores más altos del índice FSH/LH en el grupo 1 (2.9-6.66) en comparación con los del grupo 2 (0.89-1.84). Las concentraciones de testosterona libre fueron normales en ambos grupos (18-24 ng/mL).

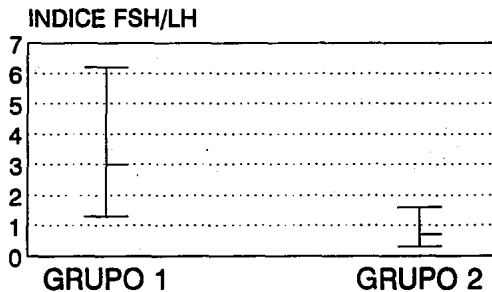
El estudio de la correlación entre los valores basales del índice FSH/LH con el grado de daño testicular mostró una relación directamente proporcional (correlación positiva) con valores de $r = 0.68$ (Gráfica 3).

RESPUESTA DINAMICA CON CC

La respuesta gonadotrópica a las prueba dinámica con CC fue distinta en ambos grupos (tablas 1 y 2).

En el grupo 1 la respuesta de FSH fue significativamente menor que la de LH después de la administración de CC ($P < 0.01$). Por el contrario en pacientes con células de Leydig normales (grupo 2), no se encontró diferencia en la respuesta hipofisaria de LH a la administración de CC ($p = 0.64$). El índice FSH/LH aumentó con CC en todos los pacientes que tuvieron valores basales menores de 1 (Gráfica 4); en tanto que en los pacientes con índice mayor de 1 (Gráfica 5), en los que se encontró hiperplasia de Leydig, los valores de la relación FSH/LH disminuyeron ($p < 0.02$). En relación a la Testosterona, la respuesta fue variable en ambos grupos (tablas 1 y 2). En 8 pacientes del grupo 2 (8/10) se incrementaron las concentraciones de Testosterona con CC. En el grupo 1 en cambio, la proporción de pacientes que respondió con aumento de las concentraciones de Testosterona con CC fue de 3/5.

SINDROME DE CELULAS DE SERTOLI



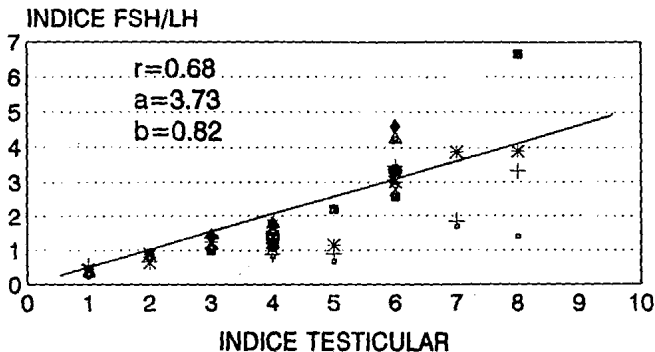
SUPERIOR	I	6.2		1.6
INFERIOR	I	1.3		0.3
PROMEDIO	-	3		0.7

GRAFICA 2: INDICE FSH/LH BASAL

VALORES DEL INDICE FSH/LH EN PACIENTES CON AZOOSPERMIA QUE MOSTRARON HIPERPLASIA DE CELULAS DE LEYDIG (GRUPO 1) Y CELULAS DE LEYDIG NORMALES (GRUPO 2).

SINDROME DE CELULAS DE SERTOLI

CORRELACION MORFO-FUNCIONAL

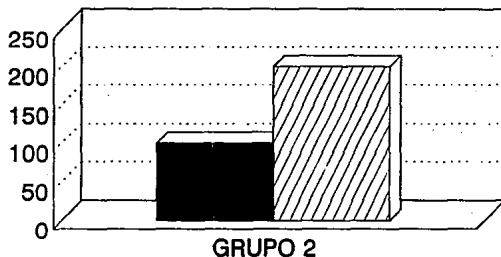


GRAFICA 3 VALORES DEL INDICE FSH/LH Y DE CLASIFICACION DE DAÑO TESTICULAR EN PACIENTES CON SINDROME DE CELULAS DE SERTOLI NORMOGONADOTROPICO.

RESPUESTA DINAMICA INDICE FSH/LH

SCS SIN HIPERPLASIA DE LEYDIG

PORCENTAJE DE RESPUESTA

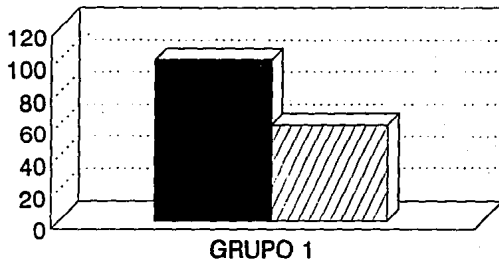


PREOMIFIN	■	100
POSTOMIFIN	▨	200

GRAFICA 4 : RESPUESTA HIPOFISARIA INTEGRADA (FSH/LH) A LA ADMINISTRACION DE CITRATO DE CLOMIFENO (100 mgRS/DIA/ 7 DIAS) EN PACIENTES CON SINDROME DE CELULAS DE SERTOLI NORMOGONADOTROPICO SIN HIPERPLASIA DE CELULAS DE LEYDIG. (GRUPO 2)

RESPUESTA DINAMICA INDICE FSH/LH SCS CON HIPERPLASIA DE LEYDIG

PORCENTAJE DE RESPUESTA



PREOMIFIN	■	100
POSTOMIFIN	▨	60

GRAFICA 5 RESPUESTA HIPOFISARIA INTEGRADA (FSH/LH) A LA ADMINISTRACION DE CITRATO DE CLOMIFENO (100MGRS/DIA/ 7 DIAS) EN PACIENTES CON SINDROME DE CELULAS DE SERTOLI - NORMOGONADOTROPICO CON HIPERPLASIA DE CELULAS DE LEYDIG. (GRUPO 1)

DISCUSION

Los resultados de la biopsia testicular y el estudio dinámico del eje hipotálamo-hipófisis-testículo en pacientes con síndrome de células de Sertoli hacen evidente la existencia de una relación funcional estrecha entre los elementos celulares intersticiales y tubulares dentro de la gónada, lo cual ha sido confirmado repetidamente en estudios previos en modelos animales. (1,7)

Por otra parte, la demostración de diferencias sutiles en la respuesta hipofisaria en pacientes con hiperplasia de las células de Leydig, aún en condiciones en las que los niveles basales de gonadotropinas son normales; habla de la regulación fina de la gónada hacia las estructuras del sistema nervioso central. Este hecho es relevante en el conocimiento de la función testicular en el humano porque pone al descubierto un fenómeno que no se ha reportado anteriormente.

En los pacientes con síndrome de células de Sertoli estudiados por nosotros es notoria la existencia de heterogeneidad no solamente morfológica sino funcional como se plantea más adelante.

Esto es explicable por cualquiera de dos factores: diferencia en la etiología del padecimiento o diferencia en el grado de afección de una enfermedad con la misma fuente etiopatogénica. Ocasionalmente podría pensarse en la combinación de ambos factores.

Clinicamente el SCS puede presentarse como una entidad congénita o ser adquirido como una lesión irreversible del epitelio germinal en la etapa postnatal. La definición etiológica más precisa podría

ser factible ya que recientemente se ha propuesto que el estudio cuidadoso del tejido testicular lleva a la caracterización de la etiología del daño tubular. (16,17,24,25) Sin embargo, para los objetivos iniciales de este trabajo este punto no resulta importante.

Otro fenómeno que amerita ser comentado desde el punto de vista morfológico es la asociación observada por nosotros de la hiperplasia de las células de Leydig en las etapas avanzadas de daño testicular (fibrosis, hialinización). Este hecho adquiere relevancia al contrastarse con lo que se ha reportado al respecto de la disfunción de la célula de Leydig en pacientes con daño tubular (14,17,27,28,29). Ambas son evidencias de las intrincadas relaciones funcionales que existen entre los elementos tubulares e intersticiales del testículo (1,7,12,15,16,17,18).

De acuerdo con lo que se observó en el análisis de la histología testicular en estos pacientes, a medida que se interrumpe la comunicación túbulo-intersticio (aparición de fibrosis peritubular), se desarrolla la hiperplasia de las células de Leydig. Es obvio que este es un estado avanzado de un proceso que debe iniciarse con manifestaciones de disfunción y que conduce al final a las alteraciones morfológicas antes descritas.

A este respecto resulta interesante plantear la posibilidad de que las anomalías funcionales del túbulo y/o de las señales túbulo-intersticio podrían conducir a un proceso irreversible de daño testicular en el que la ausencia o disminución del número de células germinales podría ser la alteración primaria.

Se ha demostrado en experimentos in vitro que el medio condicionado de espermatocitos en estado de paquiteno y espermátides en etapas tempranas de maduración tiene efectos estimulatorios en la función de las células de Sertoli. La disfunción de la célula de Sertoli sería la consecuencia de la falta de dicho estímulo.

Otra evidencia morfológica que revela la pérdida de la comunicación intercelular en estos pacientes, es la presencia de fibrosis peritubular; la cual aumenta en proporción al daño testicular. Aquí podría plantearse un modelo teórico que tiene como eje central la síntesis y degradación de la colágena. La síntesis de colágena, fibronectina, y otros elementos de la matriz extracelular se llevan a cabo en la célula de Sertoli y en la célula peritubular (1,7,12,15). La regulación de estas proteínas depende de metaloproteasas producidas en la célula de Sertoli y por sus inhibidores producidos por la célula peritubular. En condiciones normales el balance adecuado entre las metaloproteasas y sus inhibidores mantiene el nivel existente de matriz extracelular, por disminución de la síntesis de las metaloproteasas y/o aumento en la síntesis de sus inhibidores. Esta falta de coordinación entre las células de Sertoli y la células peritubulares promovería el engrosamiento de la membrana basal, aislando al túbulo de los elementos peritubulares intersticiales, y perpetuando el daño testicular.

La existencia de moduladores de las células de Leydig sintetizados y secretados por la célula de Sertoli, tanto inhibitorios

como estimulatorios, ha sido demostrada en estudios in vitro. Tal como ocurre en otros sistemas celulares, el balance adecuado de estos factores, junto con el estímulo gonadotrófico de LH es lo que finalmente permite la integridad funcional de la célula de Leydig. (12,15,16,18)

La relación funcional túbulo-hipófisis está bien establecida desde hace tiempo. Tanto sustancias proteicas como esteroideas producidas en el testículo se encargan de regular la producción y liberación hipofisaria de FSH (1,3,7,12). Ante la falla tubular, la pérdida de los mecanismos de retroalimentación origina un incremento de FSH (26,27,28).

La asociación entre la alteración morfológica del testículo y los cambios en la función del eje hipotálamo-hipófisis está clara al demostrarse un incremento progresivo de FSH aún cuando su nivel se encuentre dentro del rango considerado como normal.

Esto también se refleja en el índice FSH/LH, el cual se incrementa progresivamente a medida que aumenta el daño testicular. Esto implica la existencia de un nivel fino de regulación de la gónada sobre la función hipofisaria que no había sido descrito anteriormente.

La aplicación inmediata de este conocimiento podría enfocarse a pacientes con SCS y niveles normales de gonadotropinas en quienes se practican biopsias testiculares diagnósticas. Es válido decir en este caso, que el estudio histológico es innecesario si se cuenta con un mejor método para identificar el estado funcional del túbulo. Actualmente se toma como parámetro la elevación dos

a tres veces del nivel circulante de FSH como criterio de exclusión para la biopsia de testículo (28).

La sensibilidad y especificidad del índice FSH/LH calculados a partir de nuestros datos y de los valores hormonales de una población de hombres fértiles es de 70 % y 90% respectivamente.

La respuesta endocrina del eje hipotálamo-hipofisario en las pruebas dinámicas con citrato de clomifeno en los pacientes con SCS normogonadotrópico también mostró diferencias.

La clasificación arbitraria de los pacientes de acuerdo al índice FSH/LH sitúa un nivel de corte en 1.06. Por arriba de esta cifra, la respuesta hipofisaria de LH fue mayor (399 + 390 vs. 205 + 119; delta %); y la respuesta de FSH fue menor (148 + 65 vs 380 + 411; delta %). En consecuencia los valores del índice FSH/LH mostraron un incremento en pacientes con daño testicular moderado y disminución en pacientes con daño avanzado.

La respuesta integrada de la hipófisis a la prueba estimuladora con citrato de clomifeno puede explicarse por cambios en los mecanismos de regulación hipotalámica. Aún cuando se ha supuesto la existencia de regulación diferencial para LH y FSH a través de distintas señales, actualmente se acepta que la síntesis y secreción de estas gonadotropinas se lleva a cabo por modificaciones en la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH (3,5,6). De ser corroborado este hecho, se puede explicar que diferentes autores estudiando los mecanismos de regulación del eje gonadal en el hombre no hayan encontrado consistencia en la característica del patrón pulsátil de hombres con Oligozoospermia,

ni relación entre los niveles de inhibina y FSH en pacientes con falla gonadal (26). Un apoyo a lo anterior se encuentra en un reporte reciente en el que se documenta que los niveles de FSH e inhibina si muestran correlación negativa cuando se estudian subgrupos de pacientes con daño testicular. (28)

La hiperplasia de las células de Leydig se encontró asociada a los grados severos de daño tubular y a un índice FSH/LH elevado. Esta asociación ha sido reportada en distintas especies animales, en el humano con patología testicular y en el varón de edad avanzada. Además de estos hallazgos los estudios hechos en células de Sertoli in vitro, aportan más evidencias acerca de la comunicación entre el túbulo seminífero y las células de Leydig. En los pacientes con hiperplasia de las células de Leydig no se encontró elevada la Testosterona, lo cual podría explicarse hipotéticamente por un predominio de los efectos de TGFbeta que es capaz de promover el crecimiento de la célula de Leydig y simultáneamente inhibir la esteroidogénesis (26,27,28). La disfunción de la célula de Leydig en pacientes con daño testicular ha sido corroborada por otros autores (17,18,26,27,28,29).

Otro posible origen de las anomalías endocrinas del eje hipotálamo-hipófisis podría ser la relación Estradiol/Testosterona, que afectaría simultáneamente la espermatogénesis y la función de la célula de Leydig.

Para esclarecer el origen de las alteraciones morfo-fisiológicas de la gónada masculina en pacientes con Síndrome de células de Sertoli normogonadotrópicas es necesario determinar la

actividad biológica y el patrón de pulsatilidad de las gonadotropinas, la respuesta dinámica del eje hipotálamo-hipófisis a otros estímulos y el estudio de los metabolitos de la vía esteroidogénica en el testículo. Con estos estudios se podrá en el futuro obtener mayor información acerca de la regulación endócrina y parácrina del testículo humano para el diagnóstico de esterilidad y el desarrollo de anticonceptivos en el hombre.

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

CONCLUSIONES

En pacientes con síndrome de células de Sertoli y niveles normales de gonadotropinas se demostró diverso grado de alteración histológica.

La relación FSH/LH en pacientes con síndrome de células de Sertoli se incrementa proporcionalmente con el daño testicular.

La hiperplasia de las células de Leydig se encontró asociado a los grados severos de daño testicular. Esto corrobora la presencia de señales túbulo-intersticio.

La respuesta dinámica en términos de índice de FSH/LH fue diferente en los pacientes con hiperplasia de las células de Leydig, lo cual sugiere la existencia de una regulación fina distinta para cada una de las gonadotropinas.

REFERENCIAS

1. Skinner MK Cell-Cell Interactions in the Testis. *Endocrine Reviews* 1991; 12(1): 45-77.
2. Stevens RW III: Basic Spermatozoo Anatomy and Physiology for the Clinician. In Acosta A, Swanson RJ, Ackerman SB, (Eds): *Human Spermatozoa in Assisted Reproduction*. Williams & Wilkins, Baltimore, MA. 1990, p 1-24.
3. Veldhuis JD, Iranmanesh A, Johnson ML, Lizarralde G. Twenty-four hour rhythms in Plasma concentration of Adenohypophyseal Hormone peaks and Follicle-Stimulating Hormone, Alpha Subunit, Prolactin, and Gonadotropin Releasing Hormone pulsations. *J. Neuroendocrinol* 1989, 1:1-5.
4. C Wayne Badin y C Alvin Paulsen : El Testiculo. En Williams R.H. *Tratado de Endocrinología*. 6ª edición. Editorial Interamericana 1985, p 308-372.
5. Wildt L, Hausler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE, Knobil E. Frequency and Amplitude of Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulation and Gonadotropin Secretion in the Rhesus Monkey. *Endocrinology* 1981, 109:376-385.
6. Bain J. y Cols. LH and FSH response to Gonadotropin Releasing Hormone (GnRh) in Normospermic, Oligospermic and Azoospermic Men. *Arch Androl*. 1978, 1:147-153.
7. Verhoeven G, Cailleau J. Tubule-Leydig Cell Interactions. *Andrology* 1989, 53:227-233.

8. Marshall H, Decker, Loriaux D. Lynnand and Cutler Gordon B. A Seminiferous Tubular Factor Is Not Obligatory for Regulation of Plasma Follicle-Stimulating Hormone in the rat. *Endocrinology* 1981, 108:1035-1039.
9. Rich KA, de Kretser DM. Effect of differing the degrees of destruction of the Rats Seminiferous Ephemelium of levels of serum Follicle-Stimulating Hormone and Androgen Binding Protein. *Endocrinology* 1977, 101:959-964.
10. Rich KA, Kerr JB, de Kretser DM, Evidence for Leydig Cell Dysfunction in Rats with Seminiferous Tubule damage. *Mol Cell Endocrinol* 1979, 13:123-129.
11. Le Magueresse B, Jegou B. In vitro effects of Germ Cells on the secretory activity of Sertoli Cells recovered from Rats of different ages. *Endocrinology* 1988, 122:1672-1676.
12. Reventos J, Perrard-Sapori MH, Chatelain PG, Saenz JM. Leydig Cell and Extracellular Matrix effects on Sertoli Cell function. *Biochemical and Morphologic Studies. J Androl* 1989, 10:359-364.
13. Morera AM, Cochet C, Keramidas M, Chauvin MA, de Peretti E, Benahmed M. Direct regulating effects of transforming Growth Factor on the Leydig Cell steroidogenesis in primary culture. *J. Steroid Biochem.* 1988, 30:443-447.
14. Risbridger GP, Kerr JB, Peake RA and de Kretser DM. An Assessment of Leydig Cell Function after Bilateral or Unilateral Efferent Duct Ligation: Further Evidence for Local Control of Leydig Cell Function. *Endocrinology* 1981, 109(4): 1234-1241.

15. Skinner MK, Tung PS, Fritz IB. Cooperativity between Sertoli Cells and Testicular Peritubular Cells in the production and deposition of Extracellular Matrix components. J. Cell Biol. 1985, 100:1941-1945.
16. Kula K, Romer TH, Wlodarczyk WP. Somatic and Germinal Cell interrelationship in the course of Seminiferous Tubule maturation in Man. Arch Androl 1980, 4:9-14.
17. Neaves WB, Johnson L, Petty CS. Seminiferous Tubules and daily Sperm production in older adult men with varied numbers of Leydig Cell. Biol Reprod. 1987, 36:301-303.
18. Kerr JB and Sharpe RM. Follicle-Stimulating Hormone Induction of Leydig Cell Maturation. Endocrinology 1985, 116(6): 2592-2604.
19. Adashi Eli Y. Clomiphene citrate: Mechanism(s) and site(s) of action a hypothesis revisited. Fertil and Steril 1984, 42(3):331-344.
20. Glass Allan R. Ketoconazole-Induced Stimulation of Gonadotropin Output in Men: Basis for a Potential Test of Gonadotropin Reserve. J. Clin. Endocrinol Metab. 1986, 63:1121-1125.
21. Rajfer Jacob, Sikka Suresh C, Rivera Fabio and Handelsman DJ. Mechanism of Inhibition of Human Testicular Steroidogenesis by Oral Ketoconazole. J. Clin Endocrinol Metab 1986, 63:1193- 1199.
22. Charny Charles W. TESTICULAR BIOPSY its value in male sterility. J.A.M.A. 1940, 115(17):1429-1433.
23. Ansbacher Rudi and Gangai Mauro P. Testicular Biopsy: Sperm Antibodies. Fertil and Steril 1975,26(12):1239-1242.

24. Singer R, Sagiv M, Segenreich E, Zukerman Z, Levinsky H. Some Characteristics of Azoospermic Human Semen. *Int. J Fertil* 1992, 37:44-47.
25. Diaz-Castanos LR, Rivera H, Gonzalez Montes RM y Diaz M. Translocation (Y;19) (q12;q13) and Azoospermia. *Ann-Genet.*1991, 34(1):27-29.
26. Leonard John M, Leach Robert B, Couture Margaret and Paulsen Alvin. Plasma and Urinary Follicle-Stimulating Hormone Levels in Oligospermia. *J Clin Endocr* 1972, 34:209-214.
27. Booth John D, Merriam George R, Clark Richard V, Loriaux D.Lynn and Sherins Richard J. Evidence for Leydig Cell dysfunction in Infertile Men with a Selective Increase in Plasma Follicle-Stimulating Hormone. *J Clin Endocrinol* 1987, 64:1194-1198.
28. Kenneth M, Gross, Matsumoto Alvin M, Southworth Molly B, and Bremner William J. Evidence for Decreased Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Pulse Frequency in Men with Selective Elevations of Follicle-Stimulating Hormone. *J. Clin Endocrinol Metab* 1985, 60:197-202.
29. Giagulli VA and Vermeulen A. Leydig Cell Function in Infertile Men with Idiopathic Oligospermic Infertility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1988, 66(1): 62-67.