

Funcionalidad de las células de Leydig en criptorquidia y varicocele experimentales en ratas.

Leonor Hernández-Yáñez, Gladys Marín-López, Jesús Vilchez-Martínez y Walter Bishop.

Laboratorio de Investigaciones Hormonales, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Palabras clave: Células de Leydig, esteroidogénesis, varicocele, criptorquidia e hipertermia testicular.

Resumen. En este trabajo se estudió el número de células de Leydig y su respuesta a la Gonadotropina Coriónica humana (GCh) en ratas adultas con varicocele o criptorquidia experimentalmente inducidos. Para tal fin se aislaron células de Leydig de testículos provenientes de ratas adultas controles, con criptorquidia o varicocele inducidos quirúrgicamente. Estas células fueron contadas e incubadas en presencia o ausencia de GCh durante tres horas y los esteroides fueron cuantificados en el medio de incubación. Los animales con criptorquidia presentaron el menor número de células de Leydig, así como la mayor respuesta a la GCh de la progesterona, una ligera tendencia a aumentar en la respuesta de la testosterona y una menor en la del estradiol. Por el contrario, tanto los testículos izquierdos como los derechos de los animales con varicocele mostraron un mayor número de células de Leydig; con una respuesta menor de la progesterona, una tendencia de la respuesta de la testosterona a estar disminuida y la del estradiol a ser mayor que en los testículos criptorquídicos. Estos resultados muestran que estas dos condiciones de hipertermia testicular no afectan en el mismo grado el número y la funcionalidad de las células de Leydig, posiblemente debido a la diferencia de temperatura a que son sometidos los testículos en esas dos situaciones de hipertermia.

***In vitro* studies of the functionality of the Leydig cells in experimental cryptorchidism and varicocele**

Invest Clín 1999; 40(2): 95-108.

Key words: Steroidogenesis, Leydig cells, cryptorchidism, varicocele and testicular hyperthermia.

Abstract. Leydig cells were isolated from testes of normal, cryptorchid and induced- varicocele rats. These cells were counted and coincubated with and without human Corionic Gonadotropin (hCG) during 3 hours; thereafter, steroids were measured in the incubation media. Criptorchid animals showed the lowest number of Leydig cells, the highest Progesterone response to hCG, a slight increment of testosterone and a decrease of estradiol. On the contrary, both left and right testes from varicocele induced rats showed a higher cell number (per g of tissue), lower progesterone response, slightly higher response testosterone and lower testosterone response. These results demonstrate that these conditions of testicular hyperthermia do not affect the number and function of Leydig cells to the same degree. This may be due to differences in the testicular temperature reached with each procedure.

Recibido: 15-5-98. Aceptado: 30-11-98.

INTRODUCCIÓN

Es conocido que el aumento de la temperatura escrotal puede alterar la capacidad reproductora en el hombre, postulándose una acción directa del calor sobre el epitelio germinal que se traduce en una disminución del número de espermatozoides, un aumento de formas inmaduras y con anomalías de cabeza (1) acompañado de disminución de la motilidad de ellos (2). También en animales expuestos a una elevación del calor local, se ha descrito disminución del peso testicular con depleción en el número de los espermatoцитos primarios (3). Además, estudios *in vitro* cultivando tejido testicular a 37°C, han demostrado dis-

minución en el número de las espermatidas y de los espermatozoides, acompañado de retardo en la síntesis de ADN en las primeras (4). Más aún, en hombres que practican sauna frecuentemente, se han encontrado cambios ultraestructurales en la membrana de los espermatozoides, así como alteraciones metabólicas en los mismos (5). Por último, otros investigadores han observado aumento de la apoptosis de las células germinales testiculares en ratas a las cuales se les ha inducido experimentalmente criptorquidia (6).

Además de condiciones óptimas de temperatura la espermatogénesis también requiere de concentraciones adecuadas de testosterona (7); lo que implica necesariamente

una función normal de las células de Leydig (8). Así, Wisner y Gómez (9) reportaron que el aumento de la temperatura del testículo inhibe la actividad de ciertas enzimas implicadas en la esteroidogénesis gonadal. Incluso se ha demostrado que la hipertermia testicular altera la actividad secretoria de las células de Sertoli afectando la producción de la Proteína Ligadora de Andrógenos (ABP), la cual es requerida para garantizar la concentración normal de testosterona que necesita la espermatogénesis (10). Estos hechos sugieren que el calor podría ocasionar una disfunción de las células de Leydig, lo cual podría ser explicado por una acción directa sobre ellas o bien por una alteración del control paracrino que normalmente se establece entre estas células y los túbulos seminíferos (11).

Existen dos entidades nosológicas en el hombre, la criptorquidia y el varicocele, donde se han encontrado evidencias de trastornos en la espermatogénesis (12-14). En ambos casos se ha sugerido que la infertilidad que presentan algunos de estos pacientes, pudiera ser secundaria a un aumento de la temperatura testicular (1,15,16), que en el caso del varicocele, pudiera ser consecuencia del estasis venoso (17) y en la criptorquidia, estaría en relación con el tiempo durante el cual los testículos estén sometidos a la temperatura intraabdominal (2). Incluso, en la criptorquidia se han encontrado alteraciones en la morfología de las células de Leydig (18,19);

así como disminución en su número (20).

Por lo anteriormente expuesto, pareció de interés estudiar el número de las células de Leydig y su respuesta a la Gonadotropina Coriónica humana en ratas adultas con varicocele y criptorquidia inducidos experimentalmente.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratas Wistar machos de 3-4 meses de edad, las cuales fueron distribuidas en tres grupos : uno control y dos grupos experimentales a los cuales se les indujo quirúrgicamente a uno varicocele izquierdo y al otro criptorquidia. Para el grupo control se utilizaron 50 animales. La preparación del modelo con criptorquidia se realizó inicialmente en 60 animales, en todos ellos la técnica fue exitosa y 50 de estos animales se utilizaron para el experimento. La inducción del varicocele izquierdo experimental fue realizado en 120 animales, el éxito de la técnica sólo se logro en 105 de ellos y de estos últimos se utilizaron 100 para el experimento. Para la inducción de la criptorquidia bilateral, los animales fueron anestesiados con éter y se les practicó una incisión en la línea media abdominal y después de cortado el *gubernaculum testis*, los testículos fueron sacados del saco escrotal y colocados en la cavidad abdominal. El canal inguinal fue suturado internamente para prevenir el descenso de los testículos al escroto. La inducción de varicocele se realizó de acuerdo a la téc-

nica de Saypol y col (21), con ligeras modificaciones, para lo cual bajo anestesia con éter y mediante una incisión infracostal lateral izquierda, la vena renal se ligó parcialmente, posterior a la vena espermática. En el momento de la autopsia fue verificada la dilatación del paquete espermático y aquellos animales en los cuales no se observó esta dilatación fueron excluidos del estudio. En el caso de los animales controles se practicó una pseudoperación, sometiendo los animales al mismo estrés quirúrgico salvo que la vena renal izquierda fue aislada pero no ligada y el *gubernaculum testis* fue tocado pero no cortado y los testículos mantenidos en su saco escrotal.

Una vez realizados los distintos tratamientos quirúrgicos los animales permanecieron en nuestro bioterio por 8 semanas bajo un régimen de luz controlada (14h luz-10h oscuridad) y agua y comida a voluntad. En la mañana de los días de los experimentos, previo registro del peso corporal, los animales fueron sacrificados, y los testículos extraídos, pesados y colocados sobre hielo en una cápsula de Petri que contenía medio 199 (Sigma Chemical Co, St. Louis. Mo, USA). Los testículos fueron descapsulados y colocados en número de 4 en un tubo de ensayo. En el caso de los animales con varicocele inducido, los testículos izquierdos y derechos fueron procesados separadamente y para los fines de identificación de los resultados se presentan como Testículo Derecho y Varicocele Izquierdo.

Las células de Leydig fueron aisladas y purificadas mediante la técnica de Dufau y col (22) en la cual se modificó la velocidad de agitación a 60 ciclos por minuto. El conteo de las células de Leydig se realizó de acuerdo a la técnica de Levi y col (23) modificada por Sharpe y Cooper (24). La cuantificación de la pureza de las células de Leydig se basó en la acción de la enzima, marcadora de éstas (25), la 3β - Hidroxi-Esteroido- Deshidrogenasa, sobre el sustrato 5β - androstan- 3β -ol-17 ona (Sigma Chemical Co, St. Louis. Mo, USA). La viabilidad de las células de Leydig fue evaluada por su capacidad para excluir el tripán azul, para tal efecto volúmenes iguales de suspensión de células de Leydig y de colorante al 0,05 % fueron puestos en contacto y posteriormente se cuantificó el % de células viables (no coloreadas). De cada grupo se prepararon 5 mezclas de células de Leydig a partir de testículos provenientes de 10 ratas para cada mezcla, excepto para el grupo con varicocele izquierdo experimental para lo cual se utilizaron 20 ratas para cada mezcla.

Para investigar la capacidad de reserva funcional de las células de Leydig, se incubaron por duplicado volúmenes iguales de cada mezcla en presencia o en ausencia de 1 UI/ml de GCh (Profasi), esta hormona posee la peculiaridad de estimular la actividad esteroideogénica de las células de Leydig. El tiempo de incubación fue de 3h, en una atmósfera de 95% de O_2 y 5% de CO_2 con una agitación constante de 60

ciclos por minuto y a 34°C. Al final del período de incubación, se determinaron los niveles de Progesterona, Testosterona y Estradiol totales en el medio de incubación mediante radioinmunoanálisis, usando material comercial (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, C.A., U.S.A) y sus valores se expresaron en relación a una concentración de 10^6 células. La respuesta de las células de Leydig a la estimulación con la GCh fue cuantificada en base a las concentraciones de los distintos esteroides estudiados. Para los cálculos del porcentaje de respuesta, los niveles obtenidos para cada tipo de esteroide, sin estimulación con GCh, se consideraron como el 100%. Los porcentajes de respuesta de cada esteroide, a la estimulación con la GCh, provenientes de las 5 mezclas, para cada grupo de estudio, fueron resumidos en promedios \pm Error Estándar ($\bar{x} \pm E.E.$). El análisis de los resultados se realizó usando el análisis de varianza múltiple de Fisher y el test de Student, aceptando como significación estadística cuando los valores de p fueron iguales o menores a 0,05.

RESULTADOS

Pureza y viabilidad de células de Leydig

En la Tabla I se muestra el grado de pureza y de viabilidad de las preparaciones de las células de Leydig, provenientes de ratas adultas, en diferentes condiciones de hipertermia testicular. Como puede observarse estos dos parámetros fueron muy similares entre los distintos grupos estudiados.

Número de células de Leydig

Como puede apreciarse en la Fig. 1 el número de células de Leydig por gramo de tejido testicular, fue mayor en los animales controles que en los animales con criptorquidia ($p < 0,0001$) y que en los testículos derecho ($p < 0,003$) o izquierdo ($p < 0,01$) de las ratas a las cuales se les había inducido varicocele izquierdo.

El número de células de Leydig en los animales criptorquídicos también fue menor ($p < 0,0001$) que el observado en los testículos derecho e izquierdo del grupo de animales con varicocele. En este último gru-

TABLA I

PUREZA Y VIABILIDAD DE LAS PREPARACIONES DE LAS CELULAS DE LEYDIG

Grupo	Pureza % de células de Leydig	Viabilidad ($\bar{X} \pm E.E.$)
Control	38 \pm 2	76 \pm 5
Criptorquidia	42 \pm 4	70 \pm 2
Testículo derecho	41 \pm 6	80 \pm 9
Varicocele izquierdo	39 \pm 3	74 \pm 7

La pureza de las células de Leydig se determinó por el porcentaje de células 3- β -Hidroxi Esteroide Deshidrogenasa positiva y se consideraron células viables aquellas que excluyeron el Trián azul.

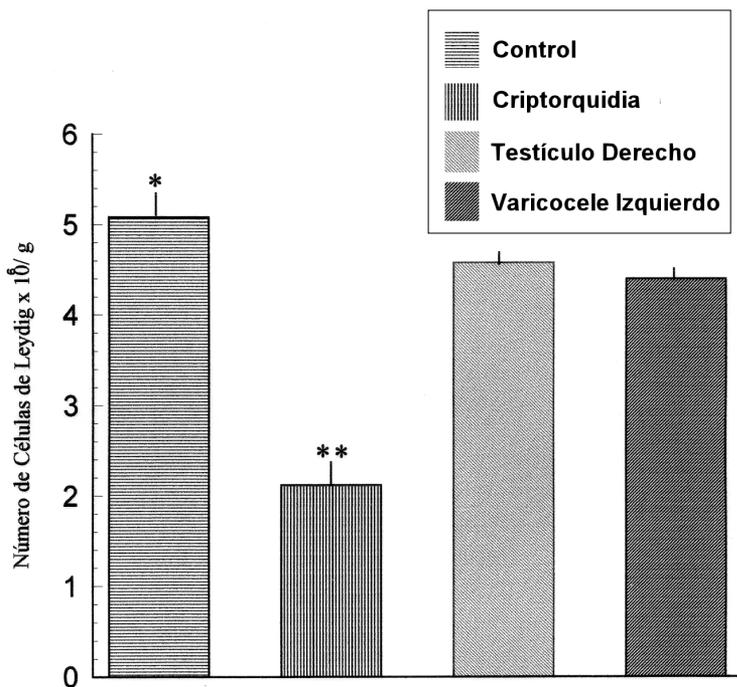


Fig. 1. Número de células de Leydig en diferentes condiciones de hipertermia testicular. El número de células de Leydig se expresa en millones/gramo de tejido testicular. Los resultados de cada grupo estudiado se presentan en $\bar{X} \pm E.E.$ * significativamente mayor que: criptorquidia ($p < 0,0001$), testículo derecho ($p < 0,03$) y varicocele izquierdo ($p < 0,01$), ** significativamente menor que todos los grupos.

po, el número de células de Leydig de los testículos derecho fue ligeramente mayor que el de los testículos izquierdo, aunque sin significación estadística.

Respuesta de los esteroides gonadales

Los resultados obtenidos de los esteroides gonadales en los dos sub-grupos de animales pseudoperados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, por lo tanto todos ellos fueron reunidos en un solo grupo control.

A) Progesterona: La respuesta de las células de Leydig a la GCh, expresada como el incremento de la producción de progesterona, fue mayor en los grupos experimentales que en los controles (criptorquídico: $p < 0,0004$; testículo derecho: $p < 0,002$; varicocele izquierdo: $p < 0,01$). La máxima respuesta fue obtenida en las células provenientes de los animales criptorquídicos, cuando se compararon con los demás grupos en estudio ($p < 0,0004$).

En relación al grupo de animales con varicocele la respuesta de las

células de Leydig provenientes de los testículos izquierdos mostró una tendencia a ser mayor, sin embargo la diferencia no alcanzó significación estadística (Fig 2).

B) Testosterona: La respuesta de las células de Leydig a la estimulación con GCh en relación a la producción de testosterona, no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos estudiados. Sin embargo, las células de Leydig pro-

venientes de los animales con criptorquidia inducida presentaron una tendencia a una mayor respuesta del andrógeno (Fig. 3).

C) Estradiol: La respuesta del estradiol por las células de Leydig a la estimulación con GCh fue similar en todos los grupos estudiados. Aunque cuando se observó que las células de Leydig provenientes de los animales controles mostraron una ligera tendencia a una respuesta mayor

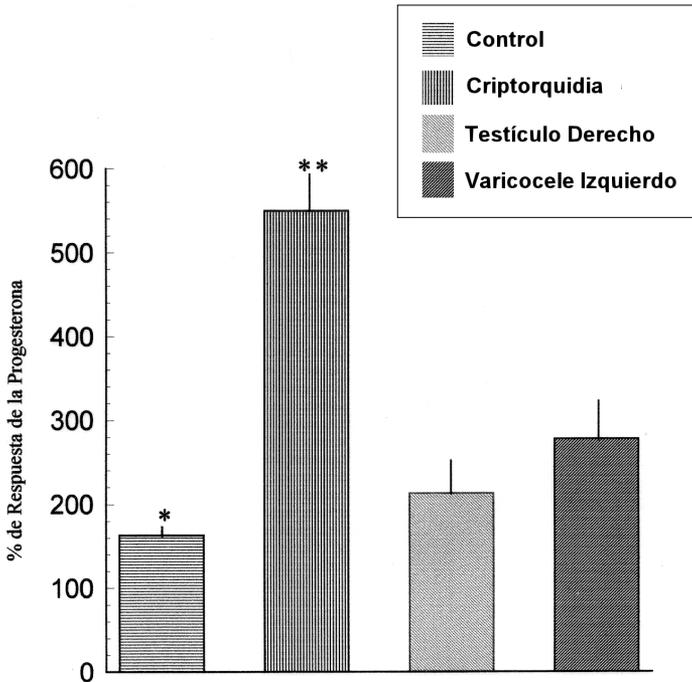


Fig. 2. Respuesta de la progesterona a la estimulación *in vitro* con GCh en diferentes condiciones de hipertermia testicular. La cuantificación de la progesterona fue realizada en el medio de incubación tres horas después de la estimulación de las células de Leydig con 1UI de GCh. Los niveles basales fueron considerados como el 100% para el cálculo del porcentaje de respuesta. Los resultados de cada grupo estudiado se presentan en $\bar{X} \pm E.E.$

* significativamente menor que: criptorquidia ($p < 0,0004$), testículo derecho ($p < 0,002$) y varicocele izquierdo ($p < 0,01$). **significativamente mayor que los otros grupos ($p < 0,0004$).

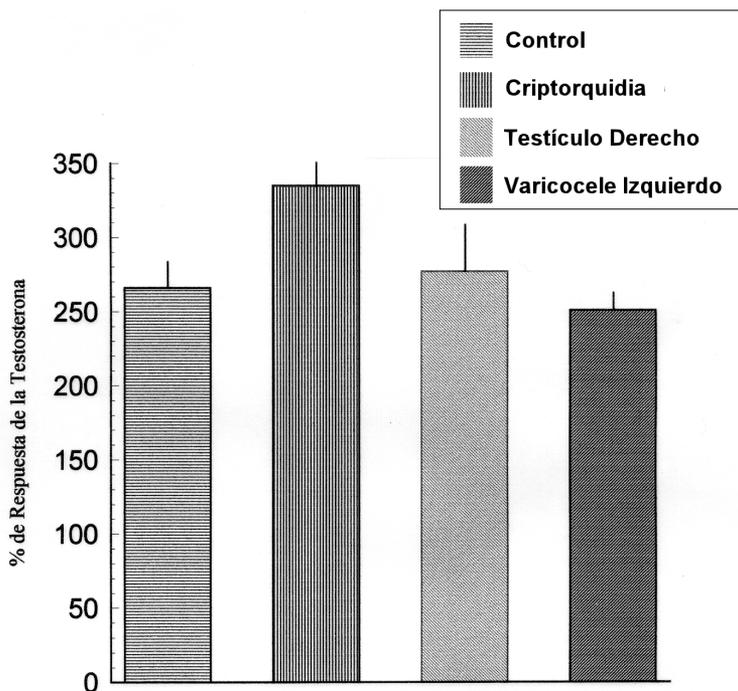


Fig. 3. Respuesta de la testosterona a la estimulación *in vitro* con GCh en diferentes condiciones de hipertermia testicular. La cuantificación de la testosterona fue realizada en el medio de incubación tres horas después de la estimulación de las células de Leydig con 1UI de GCh. Los niveles basales fueron considerados como el 100% para el cálculo del porcentaje de respuesta. Los resultados de cada grupo estudiado se presentan en $\bar{X} \pm E.E.$

de este estrógeno, y una respuesta menor en los animales criptorquídicos, las diferencias entre los distintos grupos no fueron estadísticamente significativas (Fig. 4).

DISCUSIÓN

El número de células de Leydig por gramo de testículo, en las ratas controles se mantuvo dentro de los rangos reportados por otros investigadores para animales de esta misma especie y con características similares a las usadas en nuestros ex-

perimentos (26). La disminución franca del número de células de Leydig en nuestros animales con criptorquidia bilateral también ha sido evidenciado por otros autores no sólo en condiciones de inducción experimental de criptorquidia en ratas adultas (27) sino también en animales con ocurrencia natural de esta patología (20). Por otro lado, se ha reportado en condiciones experimentales de criptorquidia una hipertrofia de esas células (28). Estas discrepancias podrían ser debidas a las diferentes condiciones experi-

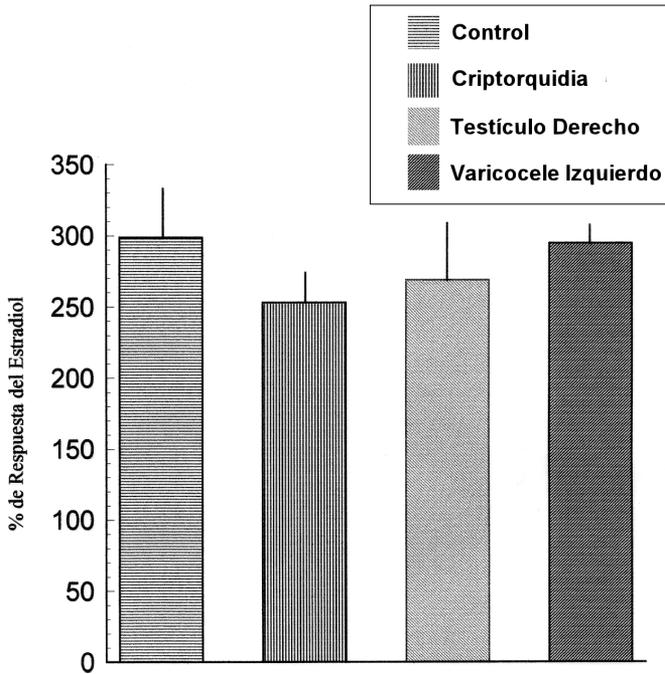


Fig. 4. Respuesta del estradiol a la estimulación *in vitro* con GCh en diferentes condiciones de hipertermia testicular. La cuantificación del estradiol fue realizada en el medio de incubación tres horas después de la estimulación de las células de Leydig con 1UI de GCh. Los niveles basales fueron considerados como el 100% para el cálculo del porcentaje de respuesta. Los resultados de cada grupo estudiado se presentan en $\bar{X} \pm E.E.$

mentales usadas por los distintos investigadores ya que en ratas normales se ha postulado que la actividad mitogénica no es uniforme para todas las poblaciones de las células de Leydig (29) y que además cambia con la edad del animal (30).

La disminución del número de células de Leydig, observada en ambos testículos de los animales con varicocele izquierdo inducido y la observación que el número de células de Leydig no varió significativamente entre los dos testículos también ha sido reportada en humanos

(31). Sin embargo otros autores han asociado hiperplasia de las células de Leydig al varicocele (32). Estas diferencias podrían ser explicadas por la metodología usada en la cuantificación del número de células de Leydig; y la alteración en el testículo derecho podría estar relacionada con una redistribución total de la hipertermia a nivel escrotal reportada en pacientes con varicocele (33). En todo caso si en estas condiciones de hipertermia ocurre hipertrofia de las células de Leydig, ésta podría ser consecuencia de una posible eleva-

ción de la LH, la cual ha sido reportada tanto en el varicocele (34) como en la criptorquidia (35).

El patrón de respuesta de las células de Leydig provenientes de los animales con criptorquidia inducida por la GCh, se caracterizó fundamentalmente por un aumento de la progesterona, con una tendencia al incremento de la testosterona y a la disminución del estradiol. Este incremento en la secreción de progesterona, que también ha sido reportado por otros investigadores en situaciones de criptorquidia (36), podría indicar que en esta condición, o bien está favorecida la producción de esta hormona o está dificultada su transformación hacia los andrógenos. Con respecto a lo primero, se ha reportado que las mitocondrias obtenidas de las células de Leydig de ratas con criptorquidia muestran una mayor velocidad de producción de pregnenolona, hormona precursora de la progesterona, que las preparadas de células de Leydig de testículos mantenidos en el escroto (37). Sin embargo, se ha encontrado que cuando se cultivan las células de Leydig a temperatura superior a los 33°C hay acumulación de gotas de grasa en su citoplasma lo que ha sido interpretado como evidencia de alteración en la esteroidogénesis testicular (38). Por otro lado en experimentos llevados a cabo con testículos no descendidos al escroto provenientes de humanos, se ha observado *in vitro* una metabolización normal de la progesterona hasta 17 OH-progesterona (39). Por los resultados obtenidos en esta

investigación, no se puede descartar que en la criptorquidia inducida ocurra una mayor producción de progesterona; sin embargo dado que la respuesta de la testosterona mostró sólo una ligera tendencia a un mayor incremento, mientras que el estradiol presentó una tendencia a una respuesta menor, se podría pensar que en la criptorquidia en realidad el defecto de la esteroidogénesis reside en una dificultad en la conversión de la progesterona a testosterona, e incluso podría existir la posibilidad que estas células de Leydig aromaticen menos este andrógeno. Esto último implicaría la existencia de una alteración en la actividad de algunas enzimas implicadas en la esteroidogénesis gonadal; lo cual ha sido también propuesto por otros autores (40) al encontrar una respuesta mayor de la progesterona y una menor de la testosterona a la GCh en testículos abdominales. También hay que señalar que se han reportado modificaciones en la actividad de otras enzimas testiculares por el aumento del calor tales como las que participan en la síntesis del ADN (41).

En cuanto a la funcionalidad *in vitro* de las células de Leydig provenientes de los animales con varicocele, la respuesta de los esteroides gonadales a la GCh se caracterizó por un mayor incremento de la progesterona en ambos testículos en relación con los normales, pero con una tendencia de la testosterona a ser menor que las mostradas por las células de Leydig criptorquídicas. Posiblemente ésto podría deberse a

una menor producción del andrógeno como se ha observado en incubaciones de testículos humanos con varicocele donde la producción *in vitro* de testosterona se suprime en un 90% a pesar que los niveles séricos de la misma se encuentran dentro de límites normales (42). Otro hecho que favorece la menor secreción de testosterona en los animales con varicocele podría ser la mayor respuesta del estradiol observada en estos animales, en comparación con los criptorquídicos. Un efecto positivo del varicocele sobre la aromatización de la testosterona a estrógeno también se ha reportado en hombres adolescentes con varicocele y ginecomastia (43). En todo caso, según resultados obtenidos en esta investigación, en el varicocele, la alteración de la esteroidogénesis parecería ser menor que la que ocurre en la criptorquidia. Esto podría estar en función del grado de hipertermia a nivel testicular. En este sentido se ha reportado que en el varicocele la hipertermia testicular alcanzada está por debajo de la temperatura a la cual están sometidos los testículos abdominales (21,44).

En conclusión, en estas condiciones experimentales, se observó en el animal con criptorquidia bilateral inducida, una disminución en el número de células de Leydig; así como también que este hecho tiende a presentarse en ambos testículos en los animales con varicocele inducido. Por otro lado las respuestas de las células de Leydig, aisladas, al estímulo con GCh fueron diferentes en los dos modelos experimentales, lo

cual podría estar relacionado al grado de calor al cual son sometidos los testículos en las dos situaciones estudiadas.

AGRADECIMIENTO

A los señores Rolando Lupi y Mauricio Pirela por su colaboración técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALÍ J., WEAVER D., WEINSTEIN S., GRIMES E.: Scrotal temperature and semen quality in men with and without varicocele. Arch Androl 1990 24:215-219.
2. MIEUSSET R., BUJAN L., MANSAT A., PONTONNIER F., GRAND-JEAN H.: Hyperthermia and human spermatogenesis: Enhancement of the inhibitory effect obtained by "artificial cryptorchidism". Int J Androl 1987; 10:571-580.
3. AMENDOLA R., CORDELLI E., MAURO F., SPANO M.: Effects of L-Acetylcarnitine (LAC) on the post-injury recovery of mouse spermatogenesis monitored by flow cytometry. 2. Recovery after hyperthermia treatment. Andrology 1991; 23: 135-140.
4. NAKAMURA M., MAMIKI M., OKUYAMA A., MATSUIT T., DOI Y., TAKEYAMA M., FUJIOKA H., NISHIMUNE Y., MATSUMOTO K., SONODA T.: Temperature sensitivity of human spermatogonia and sper-

- matocytes in vitro. Arch Androl 1987; 19:127-132.
5. BROWN-WOODMAN P., POST E., GASS G., WHITE Y.: The effect of a single sauna exposure on spermatozoa. Arch Androl 1984; 12:9-15.
 6. SHIKONE T., BILLIG H., HSUEH A.: Experimentally induced cryptorchidism increases Apoptosis in rat testis. Biol Reprod 1994; 51:865-872.
 7. De Kretser, D., Loveland, K., Meinhardt, A., Simorangkir, D., Wreford, N.: Spermatogenesis. Hum Reprod 1998; 13:1-8.
 8. ROMMERTS F., BRINKMAN A.: Modulation of steroidogenesis activities in testis Leydig cells. Mol Cell Endocr 1981; 21:15-28.
 9. WISNER J., GÓMEZ W.: Influence of experimental cryptorchidism on cholesterol side-chain cleavage enzyme and Δ^5 - 3β - hydroxysteroid dehydrogenase activities in rat testes. Steroids 1978; 31:189-203.
 10. SKINNER M.: Cell-cell interactions in the testis. Endocr Rev 1991; 12: 45-77.
 11. DE KRETSE D.: Sertoli cell-Leydig cell interaction in the regulation of testicular function. Int J Androl 1982; 5:11-17.
 12. CHEHVAL M., PURCELL M.: Deteroration of semen parameters over time in men with untreated varicocele: Evidence of progressive testicular damage. Fertil Steril 1992; 57: 174-177.
 13. GORELICK J., GOLDSTEIN M.: Loss of fertility in men with varicocele. Fertil Steril 1993; 59:613-617.
 14. GILL B., KOGAN S.: Cryptorchidism. Curret Concepts. Pediatr Clin North Am 1997; 44: 1211-1227.
 15. MIEUSSET R., FOU DA P., VAYSSE P., GUITARD J., MOSCOVICI J., JUSKIEWENSKI S.: Increase in testicular temperature in case of cryptorchidism in boys. Fertil Steril 1993; 59:1319-1321.
 16. Wright, E., Young, G., Goldstein, M.: Reduction in testicular temperature after varicolectomy in infertile men. Urology 1997; 50:257-259.
 17. Cockett, A., Takihara, H., Iwamura, M., Koshiba, K.: Pathophysiology of clinical varicoceles in infertile men. Int J Urol 1998; 5:113-115.
 18. FARRER J., SIKKA S., XIE H., CONSTANTINIDE D., RAIFER J.: Impaired testosterone biosynthesis in cryptorchidism. Fertil Steril 1985; 44:125-132.
 19. JÉGOU B., LAWS A., DE KRETSE D.: Changes in testicular function induced by short-term exposure of the rat testis to heat: further evidence for interaction of germ cells, Sertoli cells and Leydig cells. Int J Androl 1984; 7:244-257.
 20. ROZANSKI T., BLOOM D.: The undescended testis. Theory and managment. Urol Clin Nort Amer 1995; 22:107-118.

21. SAYPOL D., HOWARDS S., TURNER T., MILLER E.: Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature and histology in adult rats and dogs. *J Clin Invest* 1981; 68:39-45.
22. DUFAU M., MENDELSON C., CATT K.: A highly sensitive in vitro bioassay for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin, testosterone production by dispersed Leydig cells. *J Clin Endocr Metab* 1974; 39: 610-613.
23. LEVI H., RUBIN B.: Visualization of steroid-3- α deshydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* 1959; 65:932-943.
24. SHARPE R.; COOPER I.: Variation in the steroidogenic responsiveness of isolated rat leydig cells. *J Reprod Fert* 1982; 65:475-481.
25. LIANG J., SANKAI T., YOSHIDA T., CHO F., YOSHIKAWA Y.: Localization of testosterone and 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase/ delta 5- delta 4-isomerase in Cynomolgus Monkey (*Macaca Fascicularis*) testes. *J Med Primatol* 1998, 27: 10-14.
26. HARDY M., KIRBY J., HESS R., COOKE P.: Leydig cells increase their numbers but decline in steroidogenic function in the adult rat after neonatal hypothyroidism. *Endocrinology* 1993; 132:2417-2420.
27. BOUJRAD N., HOCHEREAU-DE REVIERS M., CARREAU S.: Evidence for germ cell control of sertoli cell function in three models of germ cell depletion in adult rat. *Biol Reprod* 1995; 53:1345-1352.
28. KERR J., RICH K., DE KRETZER D.: Alterations of the fine structure and androgen secretion of the interstitial cells in the experimentally cryptorchid rat testis. *Biol Reprod* 1979; 20:409-422.
29. KEENEY D., SPRANDO R., ROBAIRE B., ZIRKIN B., EWING L.: Reversal of long-term LH deprivation on testosterone secretion and Leydig cell volume, number and proliferation in adult rats. *J Endocrinol* 1990; 127:47-58.
30. WU N., MURONO E.: A Sertoli cell-secreted paracrine factor (S) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis of rat Leydig cell. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 106:99-109.
31. WEISS D., RODRÍGUEZ-RIOAN L., SMITH K., CHOWDMURY A., STEINBERGER E.: Quantitation of Leydig cells in testicular biopsies of oligospermic men with varicocele. *Fertil Steril* 1978; 30:305-312.
32. DUBIN L., HOTCHKISS R.: Testis biopsy in subfertile men with varicocele. *Fertil Steril* 1969; 20:50-62.
33. HSUING R., NIEVA H., CLAVERT A.: Scrotal Hyperthermia and varicocele. *Adv Exp Med Biol* 1991; 286:241-244.

34. PASCUALINI T.; CHEMES H.; COCO R.; DOMENÉ H.; CAMPO S.; NICOLAU J.; LAVIERE J.; RIVAROLA M.: Testicular function in varicocele. *Int. J. Androl* 1987; 3: 679-691.
35. WALSH P., SWERDLOFF R.: Experimental cryptorchidism: effect on serum LH and FSH in the rat. *Urol Res* 1973; 1:22-26.
36. HJERTUIST M., BERGH A.: The time-response and magnitude of HCG-induced vascular changes are different in scrotal and abdominal testes. *Int J Androl* 1993; 16:62-70.
37. ROMMERTS F., DE JONG F., GROOTEGOED J., VAN DER MOLEN H.: Metabolic changes in testicular cells from rats after long-term exposure to 37°C In vitro or in vivo. *J Endocr* 1980; 85:471-479.
38. DAMBER J., BERGH A., JANSON P.: Leydig cell function and morphology in the rat testis after exposure to heat. *Andrologia* 1980; 12:12-19.
39. LÄCGREN G., BERGH A.: In vitro metabolism of progesterone by the human undescended testis. *Int J Androl* 1983; 6:423-432.
40. HUHTANIEMI I., BERGH A., NIKULA H., DAMBER J.: Differences in the regulation of the steroidogenesis and tropic hormone receptors between the scrotal and abdominal testes of unilaterally cryptorchid adult rats. *Endocrinology* 1984; 115: 550-555.
41. FUJISAWA M., MATSUMOTO O., KAMIDONO S., HIROSE F., KOJIMA K., YOSHIDA S.: Changes of enzymes involved in DNA synthesis in the testes of cryptorchid rats. *J Reprod Fert* 1988; 84:123-130.
42. FREIRE F., NAHOUM C.: Endocrine evaluation in infertile men with varicocele. *Andrologia* 1981; 13:395-404.
43. CASTRO-MAGANA M., ANGULO M., UY J.: Elevated serum estradiol associated with increased androstenedione-testosterone ratio in adolescent males with varicocele and gynecomastia. *Fertil Steril* 1991; 56: 515-518.
44. TESSLER A., KRANHN H.: Varicocele and testicular temperature. *Fertil Steril* 1996; 17: 201-203.