



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE ZERANOL
SOBRE LA MORFOLOGÍA TESTICULAR DE CHINCHILLAS (*Chinchilla
lanígera*) DE USO COMERCIAL.

Carolina Andrea Santibáñez Araya

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal.

PROFESOR GUÍA: DR. FRANCISCO CARVALLO
Departamento de Patología Animal

Proyecto FIV 2012, N°12101401.9102.013

SANTIAGO, CHILE
AÑO 2014.

INTRODUCCIÓN

La chinchilla es un roedor endémico en Chile (Mella *et al.*, 2002) perteneciente a la familia chinchillidae dentro de la cual existen 4 géneros: *Dinomys*, *Chinchilla*, *Lagidium* y *Lagostomus*. *Lagidium* y *Lagostomus* son conocidos como vizcachas (Galaz, 2005). Dentro del género *Chinchilla* se reconocen dos especies de chinchillas: *Chinchilla lanígera* y *Chinchilla brevicaudata* (Busso *et al.*, 2012).

En Chile, *Chinchilla lanígera* es criada en cautiverio para su uso en la industria peletera (Holzer y Lara, 2004). Entre las cualidades del pelaje de la chinchilla destacan: pelo que alcanza una longitud de 2,5 cm. en promedio, con una sedosidad inimitable y una alta densidad ya que produce desde 20 a 80 pelos por folículo piloso. Estas características la convierten en una especie de gran valor para la industria peletera (Badillo *et al.*, 1999). La obtención de pieles de alta calidad es el objetivo de todo productor peletero, razón por la cual se utilizan anabólicos para asegurar tanto calidad como mayor tasa de crecimiento del pelaje. Además, la utilización de anabólicos permite disminuir los costos de mantención de los animales que, sin la aplicación del producto, tardan mayor tiempo en madurar su pelaje.

En la *Chinchilla lanígera* el crecimiento del pelo tarda aproximadamente 4 meses en alcanzar su maduración (Toso *et al.*, 1999). De manera empírica los criadores de chinchillas utilizan implantes de Zeranol (Ralgro ®¹) con el propósito de inducir estimulación de los folículos pilosos, así como de los estratos celulares de la piel, logrando por esta vía reducir el tiempo de maduración del pelaje para la obtención de un acabado uniforme (Figuroa *et al.*, 2001). Por otra parte, la administración de estos implantes permite el crecimiento integral del animal independiente de la época en que alcance su maduración, aumentando así el crecimiento del pelo (Badillo *et al.*, 1999). Esto debido a que el Zeranol no sólo estimula el crecimiento del pelo sino que además aumenta la síntesis proteica, mejorando así la conversión del alimento (Toso *et al.*, 1999).

¹ Ralgro: Implante promotor del crecimiento para ganado, fabricado por laboratorio MSD ANIMAL HEALTH, Bogotá, Colombia.

El Zeranol no tendría únicamente un efecto sobre el crecimiento del pelo. También se describen efectos relacionados con el aumento de la producción de glucocorticoides a nivel de corteza adrenal, por estimulación directa de este tejido, o en forma indirecta, al incrementar la liberación de la hormona adrenocorticotrofica (ACTH), que estimula el anabolismo y regula el metabolismo basal, así como la actividad de la glándula tiroides. Es por esto que existiría un incremento de la secreción de la hormona estimulante de la tiroides que posiblemente desplaza a los glucocorticoides de su receptor celular, con lo cual elimina su efecto catabólico (Toso *et al.*, 1999).

Estudios realizados en terneros y ratas con aplicación única de Zeranol (Riquelme, 1983; Shidaifat *et al.*, 2013), demuestran la existencia de alteraciones permanentes en el desarrollo de órganos sexuales, mediada principalmente como producto de degeneración testicular. El daño sobre el epitelio seminífero en ratas se ha relacionado con la acción supresora del Zeranol sobre la transcripción de enzimas que participan en la biosíntesis de testosterona por las células de Leydig (Shidaifat *et al.*, 2013).

En el caso de las chinchillas implantadas se esperarían efectos similares a los reportados en ratas. Es por esto que se propone describir los efectos del Zeranol sobre características testiculares, macroscópicas y microscópicas, de chinchillas implantadas con la finalidad de mejorar la calidad del pelaje.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 36 chinchillas (*Chinchilla lanígera*) machos sexualmente maduros, de entre 9 y 36 meses de edad, clínicamente sanos. Todos los individuos se mantuvieron en cautiverio bajo iguales condiciones de manejo (ciclos de luz de 12 horas, humedad 55%, T° 20° Celsius, alimentación alfalfa y pellet de alimentos Cisternas). Nueve individuos fueron mantenidos sin implantes de Zeranol como grupo control y 27 individuos fueron tratados con la hormona a dosis total de 6 mg por una vez, administrada vía implante subcutáneo en la base de la cola entre los 10 y 18 meses de edad.

Información Individual

Cada chinchilla posee un registro individual de información, el cual contiene el número de registro, peso al nacimiento, peso al destete, peso al sacrificio, fecha de nacimiento, fecha de implante de Zeranol y fecha de sacrificio.

Obtención de muestras

Las muestras fueron obtenidas durante la rutina normal de trabajo del criadero. El sacrificio de las chinchillas fue realizada por el criador, utilizando electronarcosis como método de insensibilización y posteriormente dislocación cervical. Los cadáveres fueron recuperados y trasladados a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Las necropsias de los animales fueron realizadas en el Departamento de Patología Animal, procedimiento mediante el cual los testículos fueron recuperados y mantenidos en formalina para su posterior procesamiento.

Características macroscópicas.

A los animales se les removieron ambos testículos, para determinar las diferencias macroscópicas del desarrollo testicular. Se registró el peso, largo, ancho y la medición del perímetro de cada testículo. Además se estimó el peso corporal al momento del sacrificio de cada animal con lo cual se determinó el Índice Órgano-Somático (IOS):

$$IOS(\%) = \frac{PT(g)}{PC(g)} \times 100$$

Donde:

PT: Peso testicular en gramos.

PC: Peso corporal en gramos.

Características microscópicas

Una vez concluidas las mediciones macroscópicas, se realizó un corte sagital a los testículos dividiendo el órgano en dos. Los testículos cortados fueron incluidos en una solución de formalina al 3,7% y mantenidos en esta solución por al menos 24 horas. Una vez medidos, los testículos se procesaron con una técnica histológica rutinaria descrita por Lynch *et al.* (1972) que consta de: inclusión en parafina, cortes de 5 micras de grosor de aproximadamente 3 secciones por testículo, tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E) y Ácido Peryódico-Schiff-Hematoxilina (PASH), para apreciar la morfología general del tejido y diferenciar los distintos tipos celulares.

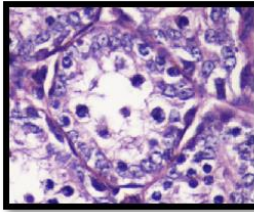
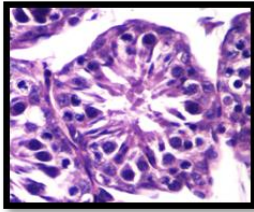
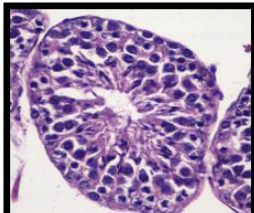
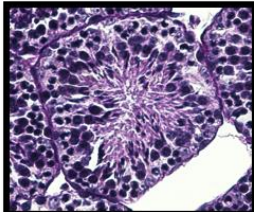
De las características microscópicas se registró:

- a) Diámetro en micrómetros. de cortes transversales de 10 túbulos seminíferos (al azar) de cada testículo.
- b) Cantidad de espermátidas elongadas del borde apical de los túbulos en estadios 5, 6 y 7.
- c) La cantidad de espermátidas fue evaluada de manera porcentual con respecto al grupo control. Para esto se realizó un conteo de las espermátidas del grupo control asignando el 100% a la mayor cantidad de espermátidas promedio de este grupo (el conteo se realizó en 10 túbulos por cada individuo) y en base a este 100% se otorgó un porcentaje al conteo de espermátidas del grupo tratado de acuerdo a la metodología empleada por Campion *et al.* (2013). La clasificación semi-cuantitativa del número de espermátidas se muestra en la Tabla 1 y 2.

Tabla 1. Evaluación semi-cuantitativa de la cantidad de espermátidas utilizada para la evaluación de la histología testicular en chinchillas tratadas con Zenarol y controles.

Cantidad de Espermátidas	Puntaje
0-25% del control	0
26-50% del control.	1
51-70% del control.	2
71-100% del control	3

Tabla 2. Descripción de los cambios visualizados a nivel histológico de acuerdo al puntaje asignado para la evaluación semi-cuantitativa en testículos de chinchillas tratadas con Zenarol y controles.

Puntaje	Conteo Espermátidas	Descripción
0		<p>Pérdida de gran parte del epitelio seminífero. Se observan células de Sertoli con citoplasma de aspecto vacuolar. Se aprecian sólo algunas espermatogonias, pero no se logran ver estadios primarios o secundarios de espermatocitos, ni espermátidas en el extremo apical del epitelio seminífero. El lumen del túbulo se encuentra en su mayor parte vacío.</p>
1		<p>Se logra ver la estructura del epitelio seminífero, con células de Sertoli en su parte basal, espermatogonias y muy pocos espermatocitos 1, no es posible visualizar bien espermatocitos 2, y las espermátidas elongadas casi no están presentes. En el lumen se logra ver un material proteináceo en baja cantidad.</p>
2		<p>Estructura normal del epitelio seminífero con toda su línea germinal, se ven células de Sertoli, espermatogonias, espermatocitos 1 y 2 pero existe un desarrollo medio de la cantidad de espermátidas elongadas a nivel de la parte apical del epitelio. El lumen es más estrecho, ya que el material proteináceo ocupa más espacio.</p>
3		<p>Estructura normal del epitelio seminífero con toda su línea germinal desde la membrana basal del túbulo hacia el borde apical se visualizan en primer lugar células de Sertoli, espermatogonias, espermatocitos 1 y 2 culminando con normalidad en la cantidad de espermátidas elongadas, además de un lumen casi inexistente.</p>

Normas de Bioética

El proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Análisis estadístico

Todas las variables continuas (peso, circunferencia, volumen, diámetro tubular) fueron analizadas a través de una Prueba T de Student para dos muestras. Las variables semi-cuantitativas (cantidad de espermátidas elongadas en estadios 5, 6 y 7 de 10 túbulos al azar) fueron evaluadas por métodos no paramétricos a través de la prueba de U de Mann-Whitney. Para ambas pruebas se utilizó el programa estadístico Statistix 8.0 ®.

Se consideró como significativo un valor de $p < 0,05$ para todas las pruebas estadísticas.

RESULTADOS

Los resultados de este estudio muestran que la exposición a Zeranol produce cambios significativos en los individuos tratados respecto del grupo control. En la Tabla 3 se observa la existencia de diferencias significativas para las variables del individuo edad de sacrificio y peso de sacrificio ($p < 0,05$).

Tabla 3. Resumen de los valores promedios y rangos para las variables individuales determinadas en testículos de chinchillas tratadas con Zenarol (n=9) y controles (n=27).

Variables	Grupo Control n= 9	Grupo tratado n= 27	P	T/W
Edad sacrificio (días)	371,77 (284-532) ^a	538,03 (350-735) ^b	0,0009	75,5
Peso Nacimiento (gr)	47,94(40-75) ^a	56,48(41-83) ^a	0,340	-0,99
Peso destete (gr)	261(219-352) ^a	271,4(162-398) ^a	0,339	0,99
Peso sacrificio (gr)	563,875(514-656) ^a	631,96(528-757) ^b	0,023	-2,58

Superíndices distintos (letras a, b) denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos para cada variable.

T= prueba de t-student, W= prueba de medianas.

Al analizar las variables testiculares macroscópicas, se observó que el peso, largo, ancho y perímetro, además del IOS mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$), al ser comparadas con el grupo control (Tabla 3).

Tabla 4. Resumen de los valores promedios y rangos para las variables macroscópicas testiculares en testículos de chinchillas tratadas con Zenarol (n=9) y controles (n=27).

Variables	Grupo Control n= 9	Grupo tratado n= 28	P	Valor de la prueba W/T
Peso testicular (gr)	3,01(2,05-3,8) ^a	1,75(2,15-4,05) ^b	0,0005	263
Largo testicular (mm)	2,03(2,4-1,82) ^a	1,53(0,96-2,2) ^b	0,0003	265
Ancho testicular (mm)	1,26(1,1-1,49) ^a	1,07(0,7-2,2) ^b	0,019	252
Perímetro testicular (mm)	4,07(3,5-4,5) ^a	3,22(4,5-2,1) ^b	0,00	5,10
IOS	0,54(0,34-0,67) ^a	0,28(0,13-0,63) ^b	0,001	273

Letras distintas corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos para cada variable. T= prueba de t-student, W= prueba de medianas

Tabla 5. Clasificación de las chinchillas (número y porcentaje) de acuerdo a su puntaje de conteo de espermátidas, en testículos de chinchillas tratadas con Zenarol (n=9) y controles (n=27).

Puntaje*	Grupo Control	Grupo Tratado
0	0 (0%)	16 (59,3%)
1	1 (11,1)	7 (25,9%)
2	1 (11,1)	2 (7,4%)
3	7 (77,7%)	0 (0%)

*Puntaje descrito en Tabla 2.

La cuantificación de espermátidas presentada en la Tabla 4, muestra una gran disminución del número de estas en el grupo tratado, estando la mayoría de los individuos (59,3%) en el puntaje 0 y ninguno en con puntaje 3. Para el grupo control la mayoría de las chinchillas se clasificaron en el puntaje 3 (77,7 %) sin presentarse individuos con puntaje 0.

Con respecto a las características microscópicas en especial el diámetro de los túbulos seminíferos difiere entre el grupo tratado y control ($p < 0,05$), esto se muestra en Figura 1.

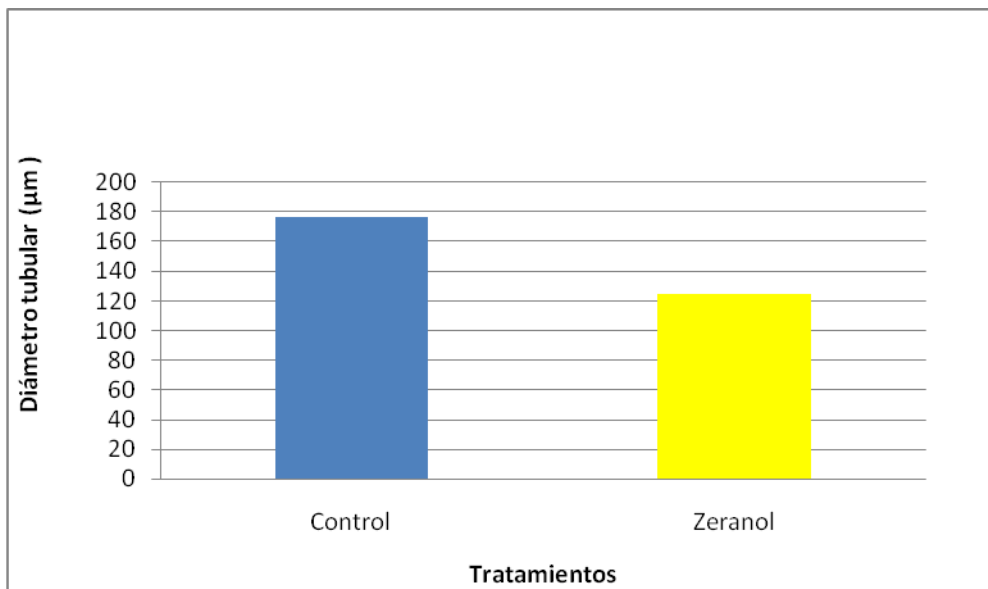


Figura 1. Promedio de diámetro tubular (µm) en testículos de chinchillas tratadas con Zenarol (n=9) y controles (n=27)

DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó que la administración de Zeranol en chinchillas tiene manifestaciones a nivel testicular, las que se evidencian macroscópicamente a través de la disminución del tamaño, largo y ancho de los testículos de individuos tratados. Además, en estos individuos se determinó una disminución del diámetro de los túbulos seminíferos y del conteo de espermátidas en el estudio histopatológico. No existe información con respecto al efecto del Zeranol a nivel testicular en chinchillas, es por esto que el objetivo principal de este estudio fue determinar los cambios que ocurren a nivel testicular en individuos tratados con Zeranol respecto a individuos no tratados. Los resultados de este estudio corresponden a un primer acercamiento a los efectos del Zeranol en chinchillas, permitiendo visualizar cambios macroscópicos y microscópicos en los individuos tratados y sus diferencias con el grupo control.

En relación a las características de las chinchillas incluidas en el estudio no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y tratado en los pesos al nacimiento y pesos al destete (Tabla 3). Esto era esperable ya que a ambas edades ningún individuo había sido tratado con Zeranol y por otra parte demuestra la homogeneidad de los animales criados por el productor. Sí se registraron diferencias significativas en el peso al sacrificio, ya que los individuos tratados presentaron pesos al sacrificio significativamente más altos que los individuos del grupo control (Tabla 3). Dichas diferencias se explican por el efecto anabólico del Zeranol, el cual aumenta la síntesis de nitrógeno favoreciendo el desarrollo de los tejidos del animal, efecto que también se ha reportado en especies como ovinos, bovinos y ratas (Sinnott-Smith *et al.*, 1983; Toso *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2007).

A pesar que aumentos en la ganancia de peso de los animales no corresponde al efecto principal del Zeranol buscado por los criadores peleteros, sí favorece la calidad de sus productos, ya que individuos más grandes generan pieles de mayor tamaño, con lo cual pueden aumentar el precio de venta ya que este es por unidad. Por otra parte el Zeranol promueve el crecimiento del pelo existente, pero no promueve el desarrollo de nuevos folículos. Esto significa que si el animal posee zonas sin pelo, el Zeranol no actúa en la zona alopecica pero sí en la zona con pelo, ayudando a que este crezca en un tiempo menor al habitual. Esta característica del Zeranol resulta en que los individuos implantados posean mayor grosor de la piel y mayor densidad del pelo (Badillo *et al.*, 1999).

Las diferencias en las edades al sacrificio encontradas en el presente estudio, siendo estas significativamente mayores en el grupo tratado (Tabla 3), podrían deberse a que la chinchilla doméstica guarda características de su vida salvaje tal como la caída estacional del pelo, siendo en invierno cuando la calidad del pelo alcanza su máximo de densidad (Badillo *et al.*, 1999), y momento óptimo para obtener pieles de mejor calidad. Existen individuos que no logran desarrollar una óptima calidad de pelo a la edad de 10-12 meses (edad de sacrificio), por lo que los productores optan por aplicar Zeranol en estos individuos, acelerando así el crecimiento y evitando esperar un nuevo ciclo completo de crecimiento del pelo, si no más bien un par de meses, resultando en individuos de mayor edad al momento del sacrificio.

En relación a las características testiculares macroscópicas, todas presentaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Tabla 4) es decir, los individuos tratados presentaron testículos de menor tamaño (peso, largo, ancho y circunferencia testicular) que aquellos del grupo control. Estos resultados pueden relacionarse al efecto que se le otorga al Zeranol. En este sentido se han postulado diversas teorías respecto al mecanismo de acción del Zeranol a nivel testicular. Estudios postulan que el mecanismo de acción del Zeranol podría estar basado en un efecto supresor sobre la transcripción de enzimas que participan en la biosíntesis de testosterona por las células de Leydig, específicamente por disminución de la expresión de la proteína P450scc (desmolasa) (Yang *et al.*, 2007). La proteína P450scc es un tipo de enzima perteneciente al grupo de las P450 que tiene como objetivo cortar la cadena lateral de 6 carbonos del colesterol, dando origen a ácido isocaproico y pregnelonona (Díaz, 2004). Por lo tanto el Zeranol al bloquear esta vía estaría disminuyendo la síntesis de testosterona evitando el desarrollo normal de los testículos además de su funcionalidad. Por otra parte estudios recientes (Shidaifat *et al.*, 2013) le otorgan al Zeranol similitudes estructurales y funcionales a los estrógenos naturales y sintéticos, lo cual podría explicar su efecto. Estos resultados provienen de ensayos de unión a receptores, los cuales revelan que el Zeranol tiene una fuerte afinidad de unión a los receptores de estrógeno α y β , exhibiendo una potencia similar a la del 17 β -estradiol (Shidaifat *et al.*, 2013).

En el presente estudio el efecto adverso del Zeranol se evidenció microscópicamente a nivel tubular (Figura 1), observándose una disminución del diámetro tubular en el grupo tratado. Esto se corresponde con el daño a nivel del epitelio seminífero mostrado en la Tabla 5, donde la mayor parte del grupo tratado se ubica en el puntaje 0. Este puntaje comprende túbulos con ausencia de todo el epitelio seminífero a excepción de algunas espermatogonias y células de Sertoli. Al existir una menor población celular y en consecuencia un lumen sin células es posible que esta desorganización lleve a disminución del diámetro del lumen.

En estudios realizados en bovinos tratados con Zeranol, los animales presentaron túbulos seminíferos severamente afectados, la mayor alteración producida fue la falta de desarrollo tubular (disminución del diámetro tubular) con detención del ciclo espermatogénico,

además de disminución de las células de la línea germinal y vacuolización citoplasmática intraepitelial (Riquelme, 1983). Estos cambios microscópicos coinciden con aquellos observados en ratas maduras tratadas con Zeranól, en las cuales se registró atrofia de los túbulos seminíferos, lúmenes desprovistos de espermatozoides por la interrupción de la espermatogénesis, además de disminución de la testosterona sérica (Shidaifat *et al.*, 2013). Si bien el presente estudio coincide con estudios anteriores con respecto al efecto del Zeranól en otras especies, en chinchilla no existen estudios a nivel de marcadores celulares que demuestren el efecto sobre la síntesis de testosterona por las células de Leydig o la afinidad por los receptores de estrógeno que demuestran otros estudios científicos. Sin embargo se puede inferir que el Zeranól presentaría en chinchillas mecanismos de acción similares a los descritos en estudios realizados en ratas debido a que los cambios observados se asemejan (Yang *et al.*, 2007).

A pesar que en estos animales, al ser productos terminales, no reviste mayor importancia las anomalías del desarrollo testicular, si es importante evaluar su uso en individuos con fines reproductivos, ya que los cambios vistos a nivel microscópico (ausencia de espermátidas, espermatoцитos 1 y 2) no permitirían la reproducción del individuo.

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio confirman que el uso de implantes de Zeranól en chinchillas resulta en cambios similares a aquellos reportados para otras especies. El Zeranól es un potente destructor de la integridad estructural del testículo en chinchillas, siendo el presente estudio el primero en describir el daño a nivel histológico y macroscópico en esta especie.

BIBLIOGRAFÍA

BADILLO, I.; FERNÁNDEZ, R.; ULLOA, R. 1999. Efecto del Zeranol sobre la maduración de piel en *Chinchilla lanígera*. Vet. Mex. 30(001): 63-66.

BUSSO, J; PONZIO, M; FIOL DE CUNEO, M; RUIZ, R. 2012. Reproduction in chinchilla (*Chinchilla lanígera*): Current status enviromental control of gonadal activity and advances in reproductive techniques. Theriogenology 78:1-11.

CAMPION, S.: CARVALLO, F.: CHAPIN, R.: NOWLAN, W.: BEAUCHAMP, D.: JAMON, R.: KOITZ, R.: WINTON, T.: CAPPON, G.: HURTT, M. 2013. Comparative assessment of the timing of sexual maturation in male Wistar Han and Sprague-Dawley rats. Reprod. Toxicol. 38:16-24.

DÍAZ, B. 2004. Bioquímica Básica de las Hormonas Esteroideas: Biología y Clínica del Cáncer. Biocáncer N°2 disponible en: <http://www.biocancer.com/journal/1018/3-colesterol-el-origen-de-las-hormonas-esteroideas>.

FIGUEROA, S.; FERNÁNDEZ, R.; ANZALDUA, S.; PÉREZ-MARTÍNEZ, M. 2001. Cambios en la estructura histológica del útero de Chinchillas (*Eryomis laniger*) jóvenes y adultas implantadas con Zeranol. Vet. Méx. 32 (1): 7-12.

GALAZ, J. 2005. Plan nacional de conservación de la Chinchilla chilena, *Chinchilla laniger* (Molina, 1782), En Chile. Corporación Nacional Forestal, CONAF, Chile. 52 pp.

HOLZER, G.; LARA, G. 2004. Crianza de Chinchillas. **In:** Cría en cautividad de fauna chilena. Servicio Agrícola y Ganadero; Parque Metropolitano, Zoológico Nacional; Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 387-401 pp.

LYNCH, M. RAPHAEL, S. MELLOR, L. SPARE, P. INWOOD, M. 1972. Tinción de los cortes. **In:** Metodos de laboratorio. 2° Edición. Nueva editorial Interamericana. Mexico D.F.. pp. 1152-1164.

MELLA, J; SIMONETTI, J; SPOTORNO, A; CONTRERAS, L. 2002. Mamíferos de Chile. Universidad Central de Chile. Escuela de Ecología y Paisajismo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias; Facultad de Medicina. Forestal Salvia. Santiago de Chile. pp. 151.

RIQUELME, R. 1983. Efecto de Zeranól sobre la ganancia de peso y estructura testicular en terneros. Arch. Med. Vet. 15(2):80-86.

SHIDAIFAT, F.; KULP, S.; LIN, Y. 2013. Zeranól induces deleterious effects on the testes and the prostate gland of mature rats. Endocr. Res. 1532-4206.

SINNETT-SMITH, P.; DUMELOW, N.; BUTTERY, P. 1983. Effects of trenbolone acetate and Zeranól on protein metabolism in male castrate and female lambs. J. Nutr. 50: 225-234.

TOSO, R.; TORIBIO, M.; MORINI, L.; MAGALHAES, H. 1999. Efectos de la administración neonatal de Zeranól sobre testículos de terneros y peso corporal. Revista de Ciencia Veterinaria (1): 15-19.

YANG, J.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; CUI, S. 2007. Toxic effects of zearalenone and α -zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. Toxicol. in Vitro 21:558-565.