

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Estudio morfológico y ultraestructural de los efectos del  
benzoato de estradiol sobre el testículo de la rata adulta**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**María Josefa Blanco Rodriguez**

DIRECTOR:

**Luis Zamorano Sanabra**

Madrid, 2015

TP  
1984  
-----  
059

María Josefa Blanco Rodríguez



\* 5 3 0 9 8 6 3 5 1 5 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-006615-6

ESTUDIO MORFOLOGICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE LOS EFECTOS DEL BENZOATO  
DE ESTRADIOL SOBRE EL TESTICULO DE LA RATA ADULTA

Departamento de Histología  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid  
1984



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 59/84

© M<sup>a</sup> Josefa Blanco Rodríguez  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1984  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-10313-1984

**JOSEFA BLANCO RODRIGUEZ**

**ESTUDIO MORFOLOGICO Y ULTRAESTRUCTURAL  
DE LOS EFECTOS DEL BENZOATO DE ESTRA-  
DIOL SOBRE EL TESTICULO DE RATA ADULTA.  
La célula de Sertoli en la regulación  
de la función testicular.**

**Director: D. Luis Zamorano Sanabra  
Catedrático de Histología y  
Embriología General  
Director del Departamento de  
Histología y Embriología General**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Departamento de Histología y Embrio-  
logía General.  
Facultad de Medicina.  
1982.**



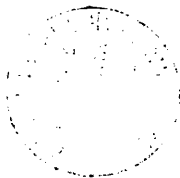
FACULTAD DE MEDICINA  
DE MADRID  
CATEDRA DE HISTOLOGIA

D. LUIS ZAMORANO SANABRA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.-

C E R T I F I C A : Que la presente Tesis Doctoral,  
sobre " ESTUDIO MORFOLOGICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE  
LOS EFECTOS DEL BENZOATO DE ESTRADIOL SOBRE EL TES  
TICULO DE RATA ADULTA. La Célula de Sertoli en la  
regulación de la función testicular", ha sido rea-  
lizada bajo mi dirección por D<sup>a</sup>. Josefa BLANCO  
RODRÍGUEZ, en el Departamento de Histología, de la  
Facultad de Medicina de la Universidad Complutense  
de Madrid.

Para que así conste, firmo el presente en Madrid,  
a veintidos de Septiembre de mil novecientos ochenta  
y dos.

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO



*Luis Zamorano Sanabra*



## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todos aquéllos que, de una u otra forma, ayudaron a que esta Tesis se realizara.

Muy especialmente, quiero manifestar mi gratitud al Prof. Zamorano, a quien debo el haber podido dedicarme a la Histología. Incorporándome a su Departamento, me brindó la oportunidad de aprender las técnicas necesarias para iniciarme en el camino de la investigación histológica.

Al Dr. García Poblete, que sugirió el tema de esta Tesis siguiendo una línea de investigación abierta por el Prof. Zamorano y él hacía algún tiempo-, y que, posteriormente, me ayudó con sus consejos.

Al Prof. Gayoso, por su ayuda en la orientación de la bibliografía, por haber hecho posibles nuestras observaciones de microscopía electrónica y por las oportunas puntualizaciones que nos hizo tras la atenta lectura de la primera redacción del texto.

Al Prof. Campos, que nos acogió en su Departamento mientras duró el estudio con microscopía electrónica de nuestras preparaciones.

A todos los compañeros de los Departamentos de Histología de Madrid, Granada y Valladolid que me alentaron, en particular la Srta. Segunda de Nicolás, que me ayudó en la preparación de los ejemplares.



En último término, cualquier problema,  
se reduce a un problema científico.



V O L U M E N I



### III

#### INDICE

	<u>Pg.</u>
INTRODUCCION .....	1
I. HISTOLOGIA DEL TESTICULO	
I.1. Introducción histórica .....	2
I.2. Revisión y puesta al día de los conocimientos histológicos actuales .....	5
I.2.1. Túbulo seminífero.	
- Lámina propia .....	6
- Células de la línea germinal. La esper miogénesis .....	8
- Ciclo del epitelio seminífero. La ola espermatogénica .....	24
- Duración del proceso espermatogénico.	26
- Célula de Sertoli .....	26
. Barrera hemato-testicular .....	35
. Funciones de la célula de Sertoli ...	37
I.2.2. Espacio intertubular .....	56
- Organización del espacio intertubular .	58
- Componentes celulares .....	62
II. FUNCIONES DEL TESTICULO Y SU REGULACION	
- Introducción histórica .....	66
- Las hormonas gonadotropas y el eje testículo-hipo fisario.....	69
- Esteroidogénesis	
. La célula de Leydig .....	70
. La célula de Sertoli .....	72
III. LOS ESTROGENOS TESTICULARES .....	76

#### IV

III.1. Origen celular del estradiol testicular .....	77
III.2. Significación funcional de los estrógenos en el testículo .....	80
III.2.1. Interacción de los estrógenos con otras hormonas implicadas en la regulación de la función del testículo..	81
III.2.2. Expresión morfológica de la inhibición del testículo por la presencia de niveles elevados de estrógenos...	89
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS .....	97
MATERIAL Y METODOS .....	101
- Animales de experimentación .....	102
- Hormona utilizada .....	102
- Dosis y pautas de tratamiento .....	103
- Técnica operatoria .....	104
- Técnicas histológicas:	
. Microscopía óptica .....	105
. Microscopía electrónica .....	108
- Métodos bioquímicos .....	109
RESULTADOS .....	111
I. Examen macroscópico. Volumen y peso testicular .....	112
II. Microscopía óptica .....	122
III. Microscopía electrónica .....	141
IV. Niveles de testosterona en sangre circulante .....	156
DISCUSION .....	160
CONCLUSIONES .....	190
BIBLIOGRAFIA .....	193

INTRODUCCION

## I.- HISTOLOGIA DEL TESTICULO

### I.1. INTRODUCCION HISTORICA

Los primeros conocimientos histológicos del testículo se adquieren antes del nacimiento de la Histología como ciencia, puesto que su principal producto de secreción, los espermatozoides, son observados con el microscopio óptico en el siglo XVII por Hamm y Leeuwenhoek. Desde la publicación de los trabajos de Kölliker en 1841 y 1847 (ver Brökelmann, 1963), la morfología y función del epitelio seminífero atrajeron a muchos investigadores.

Leydig, en 1850, describe la célula que lleva su nombre, pensando en una posible función trófica de la misma con respecto al epitelio germinal.

En 1865, Sertoli informa de la existencia de una "célula ramificada" en el túbulo seminífero del testículo humano, y durante el último tercio del siglo se hacen aportaciones tan importantes como las de Von Ebner (1871) que, al examinar el túbulo seminífero de la rata en toda su longitud, describe una serie de asociaciones celulares que aparecen ordenadas, observando en un trabajo posterior, que éstas se repiten cada 3,2 cm. (Von Ebner, 1888), y las de Brown (1885) y Regaud (1900) que especulan sobre la idea de que las transformaciones que tienen lugar en la línea germinal, están en íntima asociación con la célula de Sertoli, a la que, por otra parte, Maximow (1899) ya había asignado también la función de

célula fagocítica que ingiere activamente las células germinales muertas.

Durante la primera mitad del presente siglo se continuó haciendo descubrimientos importantes: Regaud (1901), utilizando el microscopio óptico, describe detalladamente la estructura del túbulo seminífero, estudiando la membrana limitante que lo envuelve y el complicado proceso de la espermatogénesis, e informa de la existencia de dos tipos de espermatogonias, de los que el uno es precursor del otro, y describe los cuerpos residuales, como estructura cuya morfología va a variar dependiendo del estado funcional del túbulo.

Allen (1918), confirma la existencia de dos tipos de espermatogonias, a las que llama A y B, puntualizando que las A originan por mitosis las del tipo B.

Se inicia así el camino hacia una mejor comprensión de la organización de las células del testículo y su misión en el proceso de la espermatogénesis.

La aplicación de técnicas histoquímicas y de detección de enzimas, junto con la búsqueda de nuevos métodos de tinción (como en el caso de Elftman -1950-, que utiliza la impregnación argéntica -empleada hasta entonces para visualizar el aparato de Golgi- para impregnar las células de Sertoli, lo que proporciona una idea más clara de la citoarquitectura del túbulo) que permitan una mejor observación de los distintos tipos celulares

y sus componentes, proporcionan gran cantidad de datos que van a ayudar a la mejor comprensión del proceso.

Los años cincuenta van a suponer un avance importante. Por una parte Leblond y Clermont (1952) a) y b) publican sus trabajos, en los que establecen la existencia de catorce asociaciones celulares diferentes, que corresponden a otras tantas etapas en el ciclo de maduración del epitelio seminífero de la rata. Además, en el mismo año se publica el primer trabajo en el que se aplican las técnicas de microscopía electrónica al estudio de la espermatogénesis en la rata (Watson, 1952), detectando la existencia de puentes citoplásmicos entre las células de la línea germinal, hecho que resultará de la máxima importancia para la comprensión del proceso de formación de los espermatozoides.

Burgos y Fawcett (1955), confirman este hecho, estableciendo la existencia de puentes citoplasmáticos a todos los niveles entre las células germinales y, posteriormente, Fawcett y Burgos (1956), hacen otro descubrimiento también trascendente: las células de Sertoli no forman un sincitio, como se creía, sino que se trata de células independientes.

Wilke y Schendhardt (1958) aplican por primera vez el microscopio electrónico al estudio de la célula de Leydig.

Fawcett (1958), estudia la ultraestructura de los es-

permatozoides de mamíferos.

Clermont (1958), estudia los componentes de la membrana limitante del túbulo seminífero.

Kingsley y Lacy (1959), estudian los cuerpos residuales, observando que éstos son fagocitados por las células de Sertoli y que sufren cambios en su ultraestructura, acoplados a los que se producen en el citoplasma de la célula de Sertoli y en la localización de los lípidos en las diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero.

Otro descubrimiento importante que ha contribuido de forma decisiva al mejor conocimiento de la función del testículo, ha sido el de la existencia de la barrera hemato-testicular, situada a nivel de la célula de Sertoli, entre la membrana basal y las células germinales (Vilar y cols., 1962). La barrera hemato-testicular separa el túbulo seminífero en dos compartimentos: basal y luminal (Dym y Fawcett, 1970 y Fawcett y cols., 1970), y se localiza a nivel de las uniones ocluyentes existentes entre las células de Sertoli (Dym, 1973).

## I.2. REVISION BIBLIOGRAFICA Y PUESTA AL DIA DE LOS CONOCIMIENTOS HISTOLOGICOS ACTUALES.

En la actualidad el testículo se considera como una glándula que consta de una porción exocrina: los tubos semi-

níferos, y otra endocrina: las células de Leydig, que se disponen en grupos en los espacios intertubulares.

#### I.2.1. TUBULOS SEMINIFEROS

Facilmente dissociables entre sí, se les considera hoy en día como una glándula citógena, cuya secreción, de naturaleza holocrina, está contituida por los espermatozoides.

El epitelio seminífero, apoyado sobre la lámina propia, es un epitelio estratificado complejo, formado por dos estirpes celulares diferentes: las células de la línea germinal o células espermatogénicas y las células de sertoli, somáticas o de soporte, cuyas funciones todavía no son totalmente comprendidas.

#### LAMINA PROPIA

La arquitectura de la lámina propia, que envuelve a cada túbulo seminífero, varía de una especie animal a otra.

La describe Regaud (1901) por primera vez en la rata, como una "lámina sencilla y continua dispuestas entre dos capas concéntricas de una subtancia homogénea" similar a las membranas basales.

La microscopía electrónica ha demostrado que, de

ellas, la más interna, está compuesta a su vez por tres subláminas: una interna, de material homogéneo y de moderada densidad a los electrones, otra intermedia, que contiene fibrillas colágenas de dirección aproximadamente paralela al eje del túbulo y, la más externa, aparentemente, similar a la interna. (Fig. nº 1).

En estas membranas basales se ha detectado, como era de esperar, glicoproteínas, ácido hialurónico y condroitín sulfatos, pero está prácticamente libre de lípidos (Courot y cols., 1970).

Alrededor de la membrana basal interna y a partir de los 7 a 10 días de edad en la rata, empieza a visualizarse una lámina de células poligonales (Ross, 1957). En el citoplasma de estas células aparecen gran cantidad de microfilamentos, y su membrana está tachonada de vesículas de pinocitosis (Burgos y cols., 1970) y presenta gran cantidad de diferenciaciones de unión del tipo zónula ocludens (Dym y Fawcett, 1970). La naturaleza de esta estirpe celular aún sigue siendo tema de controversia, aunque por su semejanza con las células musculares lisas y su organización epitelioide, casi todos los autores en la actualidad se refieren a ellas con el nombre de células mioideas.

También es controvertida la naturaleza de las células

lulas que se apoyan sobre la membrana basal externa. A pesar de que hasta ahora se habían descrito como una lámina de células de naturaleza conjuntiva.-probablemente fibroblastos derivados del mesénquima peritubular (Ross, 1967; Courot, y cols., 1970; Burgos y cols. 1970)-, los últimos estudios indican que su naturaleza parece ser endotelial (Clark, 1976 y Neaves, 1977). Esta lámina de células endoteliales, junto con la que rodea al tejido intersticial, delimitaría un espacio linfático o sinusoides linfáticos peritubular (Clark, 1976).

#### CELULAS DE LA LINEA GERMINAL. LA ESPERMATOGENESIS

##### . ESPERMATOGONIAS

El término es acuñado en 1876 por La Valette St. George, pero refiriéndose a la célula de Sertoli. La primera descripción detallada de la espermatogénesis aparece en el trabajo de Regaud (1901), informando ya de la existencia de dos tipos de espermatogonias claramente diferenciados a partir de su cromatina nuclear; finamente granular y de aspecto pulverulento en unas, y condensada en grumos en la otra, lo que será confirmado por Allen (1918), llamando a las primeras espermatogonias A y a las últimas espermatogonias B. Roosen-Runge y Giesel (1950) establecen que, a medida que las espermatogonias ti

po B se desplazan hacia la luz del túbulo, se diferencian originando los espermatocitos I.

Cuando en 1952 Watson aplica por primera vez el microscopio electrónico al estudio de la morfología del testículo, confirma todos estos datos, observando, además, que en la última mitosis sufrida por las espermatogonias, la división citoplásmica es incompleta, quedando unidas entre ellas por puentes intercelulares, lo que más tarde será confirmado también por Fawcett (1961).

En la actualidad, la clasificación de espermatogonias en dos grandes grupos, las A y las B, se mantiene, pero, además, dentro de las espermatogonias tipo A, se han establecido dos grandes categorías: la primera la constituyen las llamadas espermatogonias A<sub>0</sub>, que permanecen sin diferenciarse y que, en la rata adulta normal, raramente entran en mitosis, participando poco, por tanto, en la producción de espermatocitos. Son células madre de reserva y se corresponden con las espermatogonias Ad (dark) u oscuras de la terminología antigua. La segunda son las que van a entrar en mitosis y diferenciarse para seguir el proceso de espermatogénesis. Dentro de estas últimas se pueden diferenciar cuatro generaciones diferentes: las A<sub>1</sub> (que pueden diferenciarse, o funcionar como células

madre), las A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y A<sub>4</sub>. Son las también llamadas Ap (pale) o claras. Además, Regaud describió una célula de características intermedias entre las A y las B, llamadas por ello espermatogonias In o intermedias (Clermont y Leblond, 1953), de las que parece ser que en la rata sólo existe una generación, (Leblond y Clermont, 1952), pero que en otras especies pueden haber dos o más generaciones. De cualquier forma, son difíciles de diferenciar sobre bases exclusivamente morfológicas, incluso con microscopía electrónica.

El citoplasma presenta características semejantes en todos los tipos de espermatogonias. En general, es un citoplasma relativamente escaso, que se dispone alrededor del núcleo, con pocas organelas y de baja densidad a los electrones. Aparecen algunos perfiles de retículo endoplásmico, un aparato de Golgi pequeño y algunos gránulos densos a los electrones. Las mitocondrias, redondas u ovales, poseen pocas crestas que son bastante rectas y paralelas entre sí: (Brökelmann, 1963).

Hoy día está perfectamente establecido que sólo la espermatogonia más primitiva completa la división citoplasmática. En el resto la citocinesis es incompleta, quedando las células hijas unidas entre sí por puentes

citoplasmáticos, a cuyo nivel la membrana celular aparece engrosada (Watson, 1952, Fawcett, 1961 y Dym y Fawcett, 1971).

Las células de Sertoli rodean a las espermatogonias cubriéndolas con sus expansiones citoplásmicas (Neaves, 1977). En las regiones de contacto entre la membrana plasmática de la espermatogonia y la de la célula de Sertoli, aparecen especializaciones de unión, descritas primero por Brökelmann (1963), y posteriormente por Nicander (1967) y Russell (1977), quienes indican que estas uniones son semejantes a desmosomas, aunque el espacio intercelular es más estrecho y el material electrodensoso que aparece en él no llega a formar un disco. (Kaya y Harrison, 1976).

#### . ESPERMATOCITOS

Los espermatoцитos I, resultantes de la división mitótica de las espermatogonias B, antes de entrar en división, aparecen como espermatoцитos en reposo (Clermont y cols., 1959). Estos espermatoцитos preleptoténicos son muy parecidos a las espermatogonias de las que proceden, y con las que es fácil confundirlos. Todavía aparecen muy cerca de la lámina propia (Dym y Clermont, 1970), aunque ya empiezan

a perder contacto con ella, por interponerse una prolongación citoplasmática de la célula de Sertoli.

Las primeras células que aparecen totalmente separadas de la lámina propia mediante una prolongación citoplasmática de la célula de Sertoli, son los espermatoцитos leptoténicos. Su citoplasma, más grande, se diferencia por una proliferación del retículo endoplásmico, así como por un mayor desarrollo del aparato de Golgi. (Burgos y cols., 1970). Las mitocondrias adquieren el aspecto característico que presentan en los espermatoцитos: crestas irregulares que, a menudo se ramifican. (Brökelmann, 1963).

En los espermatoцитos zigoténicos, a causa del apareamiento y formación de bivalentes, la tinción es más intensa y los cromosomas se pueden observar mejor que en la etapa anterior. Los complejos sinaptonémicos sirven como marcador morfológico de estos espermatoцитos y de los paquiténicos. El aparato de Golgi comienza a aumentar y las mitocondrias inician su desplazamiento hacia la periferia de la célula. Ambos procesos continúan en los espermatoцитos paquiténicos.

Coincidiendo con la etapa VIII (según Leblond

y Clermont, 1952) del ciclo del epitelio seminífero, en los espermátocitos paquiténicos aparece un corpúsculo que, aunque descrito hace más de noventa años por Benda (1891), su origen, composición química y función no están todavía dilucidados (Parvinen y Parvinen, 1979). El desarrollo del retículo endoplásmico, del aparato de Golgi y del cuerpo cromatoideo, caracterizan la evolución del citoplasma de los espermátocitos paquiténicos, diploténicos y diacinéuticos.

Las mitocondrias de los espermátocitos II son muy parecidas a las de las espermátidas, y el cuerpo cromatoideo presenta un aspecto muy similar al que tiene en las espermátidas tipo I. El aparato de Golgi está muy desarrollado.

Todos los espermátocitos quedan envueltos totalmente por las prolongaciones citoplasmáticas de las células de Sertoli, con las que se mantienen unidos por diferenciaciones de sus membranas plasmáticas similares a desmosomas, al igual que las espermatogonias (Kaya y Harrison, 1976 y Russell, 1977 a.).

#### • ESPERMATIDAS

Además de la formación del acrosoma, caracte-

riza a las espermátidas la morfología de sus mitocondrias -cuyas crestas aparecen como hinchadas, rechazando la matriz hacia la periferia, en donde se observa como una lámina electrodensa y la localización periférica de éstas. (Brökelmann, 1963). El retículo endoplásmico está muy desarrollado y algunas cisternas del mismo aparecen estrechamente aplicadas a la cara convexa del aparato de Golgi, separadas de él por una región que contiene numerosas vesículas pequeñas y túbulos, ocasionalmente interconectados entre sí. (Susi y cols., 1971).

En las cercanías del núcleo se sigue apreciando, en las primeras etapas evolutivas, el cuerpo cromatoideo, con los dos componentes que le caracterizan: una masa compacta e irregular que encierra zonas de densidad más baja, y un grupo de gránulos laxamente dispuestos de unos 150 Å (ribonucleoproteínas). Estudios realizados con uridina tritiada, indican que el RNA sintetizado en el núcleo haploide se transporta a este orgánulo (Söderström y Parvinen, 1976), lo que se acompaña de movimientos del cuerpo cromatoideo a lo largo de la membrana nuclear, con contactos con el aparato de Golgi, lo que ha sido demostrado por cineautorradiografía (Parvinen y Parvinen, 1979). Además del RNA, parece ser que el cuerpo cromatoideo con

tiene proteínas básicas ricas en arginina.

Las gotas lipídicas, escasas en las espermato gonias y en los espermatoцитos, van aumentando en las espermátidas, hasta formar grandes vacuolas.

#### ESPERMIOGENESIS

Las pequeñas vesículas ligeramente PAS positivas, cuya aparición en el seno del complejo del Golgi marca el comienzo de la espermiogénesis, vistas al microscopio electrónico, suelen observarse asociadas a cisternas del R.E.R. y su contenido es moderadamente denso a los electrones. En las cisternas del Golgi se aprecia un material de densidad similar y los sáculos más internos contienen un material algo más denso. Son los gránulos proacrosómicos, cuya coalescencia originará el gránulo acrosómico. Este gránulo es rico en carbohidratos y se adhiere a la cara externa de la membrana nuclear, en una región donde la cara interna aparece como reforzada por un material electrónico. (Burgos y cols., 1970 y Courot y cols. 1970).

En el citoplasma se empiezan a apreciar los microtúbulos cuya organización dará lugar más tarde a la formación del manguito.

El REL está bien desarrollado, en forma de cisternas cortas que parecen anastomosarse entre sí, existiendo con frecuencia zonas de continuidad entre ellas y el aparato de Golgi, lo que se ha confirmado en cortes gruesos de material tratado con Ur-Pb-Cu y observación con microscopía electrónica de alto voltaje. (Dym y Cavicchia, 1978). También, ocasionalmente, se observan cisternas de retículo endoplásmico entre los sáculos del aparato de Golgi, que parecen como cisternas colaterales de las que cubren la cara cis del aparato de Golgi. Asimismo, aparecen cisternas de retículo endoplásmico en la región central del aparato de Golgi, interconectadas unas a otras por estrechos puentes, formando un sistema continuo. Algunas de estas cisternas están en íntima asociación con la cara trans del aparato de Golgi, aunque siempre quedan separadas de éstas por un espacio de unos 12 nm. (Hermo y cols., 1979).

Por ello, se ha asignado al R.E.L. un papel activo en la formación de los componentes del acrosoma (Dym y Cavicchia, 1978), lo que concuerda con su localización entre la membrana plasmática y la cara convexa del aparato de Golgi. (Hermo y cols., 1979). A nivel de los puentes intercelulares, el retículo endoplásmico parece continuarse con el de las espermátidas adyacentes.

Después de la adhesión del gránulo acrosómico a la membrana nuclear, el complejo del Golgi continua contribuyendo a la formación del sistema acrosómico, apareciendo nuevas vesículas.

Parece que el cuerpo cromatoideo interviene en las primeras etapas de formación del sistema acrosómico, a través de las relaciones que establece con el aparato de Golgi (Parvini y Parvini, 1979).

Una vez formado el acrosoma, toda la superficie de contacto de éste con la membrana nuclear aparece engrosada. Los microtúbulos del manguito parecen dirigir el desplazamiento del citoplasma en la elongación de la espermátida. Durante la elongación, el cuerpo cromatoideo aparece generalmente cerca del aparato de Golgi, yendo a localizarse en las inmediaciones de la zona de arranque del flagelo en formación, en lo que, posteriormente, será el cuello del espermatozoide.

Parece ser que la síntesis de RNA se para cuando el núcleo de la espermátida comienza a elongarse. Sin embargo, la síntesis de proteínas continúa y es en este momento cuando van a tener lugar los cambios morfológicos más notables. Se ha asignado al cuerpo cromatoideo un papel de lugar de almacenamiento y conserva-

ción del RNA, habiéndose demostrado que la mayor parte de éste está en forma especial de RNA Hn estable (Söderström y Parvinen, 1976).

En la fase de maduración, el citoplasma, totalmente desplazado en sentido caudal, se localiza de tal manera que parte del axonema queda cubierto por él y parece flotar en la luz del túbulo. El retículo endoplásmico presenta claros signos de regresión, con disolución de sus túbulos. Las cisternas tubulares que quedan tienden a acumularse alrededor del flagelo, formando una lamela anillada periflagelar que termina por desaparecer.

Al principio de la fase de maduración el cuerpo radial se observa particularmente bien desarrollado y aún podemos verlo después de la regresión masiva de todo el retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, pero al final sólo quedan algunos restos, en forma de vesículas aisladas.

Durante la maduración de la espermátida, el cuerpo cromatoideo se condensa y parece que participa en la formación de una estructura subacrosómica densa, la lámina densa postnuclear que, posiblemente, interviene en la activación del oocito (Reger y cols., 1977 y Parvinen, 1979).

La eliminación del citoplasma que no necesita el espermatozoide maduro, se va a producir por dos mecanismos:

- a) Eliminación progresiva de pequeñas cantidades de citoplasma, a través de complejos túbulo-bulbosos, que mantienen unida la espermátida a la célula de Sertoli por la cara ventral y el cuello de aquélla. La desaparición de estas uniones, va a suponer la liberación del espermatozoide a la luz del túbulo, como más adelante describiremos.
- b) Eliminación masiva, al desprenderse la gota citoplásmica, mediante un proceso activo por parte de las células de Sertoli. (Fawcett y Phillips, 1969).

Las espermátidas, unidas entre sí por puentes citoplasmáticos, se encuentran además rodeadas por las prolongaciones de las células de Sertoli, con las que establecen uniones especiales. En la prolongación citoplasmática de la célula de Sertoli que rodea la espermátida, la membrana plasmática aparece más fina que la de la espermátida. Algunos autores opinan que las relaciones que se establecen entre las células de Sertoli y las de la línea germinal, semejantes a desmosomas, se modifi

can cuando comienza la elongación de la espermátida (Kaya y Harrison, 1976), aunque otros interpretan que se trata del mismo tipo de unión.

Cuando el núcleo de la espermátida comienza a condensarse, en el citoplasma de la célula de Sertoli aparecen las vesículas y cisternas de retículo endoplásmico alineadas entre sí, a una distancia de unos 800 Å de la membrana plasmática que rodea la zona del acrosoma (Brökelmann, 1963), delineando una región en el citoplasma de la célula de Sertoli que contiene un material más electrodensó, por la presencia de haces de microfilamentos.

La superficie de contacto se extiende un poco más allá de la región acrosómica, para cubrir también la parte anterior del manguito. (Ross, 1976).

Brökelmann, 1963, observa que en el citoplasma de la célula de Sertoli, situado debajo de la zona ventral de la cabeza de la espermátida, existen varias estructuras tubulares, que presentan dos o más membranas, rodeadas de cisternas, en el seno del citoplasma de la célula de Sertoli. Nicander, 1967, indica que de las espermátidas alargadas emergen evaginaciones tubulares que contactan con las células de Ser

toli. Russell y Clermont, 1976, son los primeros que describen el complejo túbulo-bulbar, como una serie de evaginaciones que emergen de la región ventral de la cabeza de la espermatida, para hundirse en la prolongación citoplasmática de la célula de Sertoli, terminando en un ensanchamiento o formación bulbosa. Estos autores atribuyen al complejo una función de anclaje, y su disolución contribuiría a la espermiación. Las membranas que rodean estas evaginaciones son más finas y no poseen gliocalix. El túbulo sigue un trayecto sinuoso y la longitud del complejo entero es de 3 a 4 nm., teniendo un diámetro aproximado de 1 nm. en la zona tubular y de 2,5 nm. en la bulbosa. La mayoría contienen un material floculoso disperso y algunos una sustancia densa homogénea. A veces, después del bulbo se aprecia un nuevo estrechamiento tubular. En yuxtaposición a los bulbos aparecen gran cantidad de vacuolas y vesículas. El material floculoso disperso corresponde a túbulos digeridos por lisosomas de la célula de Sertoli. (Russell, 1979, a). Al existir varias generaciones sucesivas de complejos túbulo-bulbosos, éstos constituirían una forma de eliminación progresiva del citoplasma de las espermátidas, que fluiría por ellos hasta la célula de Sertoli. Durante la formación de los complejos túbulo-bulbosos, se elimina así hasta un 70% del citoplasma (Russell, 1979 b) que, de otra

forma, impediría el movimiento del espermatozoide (Regaud, 1901). Esto explicaría la disposición del retículo endoplásmico asociado, descrito por Clermont y cols. (1980).

#### . ESPERMATOZOIDE

Los espermatozoides se encuentran entre los primeros elementos que llaman la atención de los microscopistas. Henle (1843), en su Tratado de Histología, siguiendo a Kölliker, les da el nombre de "filamentos espermáticos" o "espermatozoarios" (ya que entonces se incluían en la clasificación de los protozoarios), para expresar "de una forma positiva que no los considera habitantes accidentales del esperma", y cita a Leeuwenhoek quien, en sus Transacciones Filosóficas (1677) atribuye su descubrimiento a Hamm, al estudiar la "materia gonorreica en la cual encuentra animales dotados de cola que, según él, eran producidos por la putrefacción".

El análisis de su estructura con el microscopio de luz se realiza a lo largo del siglo XIX (Eimer, 1874, Retzius, 1881, Benda, 1887, Jensen, 1887, Ballowith, 1891 y Lenhossek, 1898).

Sin embargo, debido a su pequeño tamaño, la

mayor parte de los conocimientos que poseemos acerca de la estructura del espermatozoide los debemos, casi exclusivamente, a los estudios realizados después de la aplicación de la microscopía electrónica. (Anberg, 1957 y Fawcett, 1958).

Durante los años de 1960 a 1970 numerosos autores estudian la ultraestructura de los espermatozoides de varias especies animales (Bloom y Nicander, 1961, Hadek, 1963, Bedford, 1964, Fawcett, 1965, Fawcett e Ito, 1965, Nicander y Bane, 1966, Fawcett y Phillips, 1969), lo que crea cierta confusión en la terminología. Para unificar criterios, Fawcett (1975) publica una revisión que recoge todos los conocimientos que se tienen hasta ese momento acerca de la ultraestructura del espermatozoide de los mamíferos y que sintetizamos en la figura nº 2.

No hemos encontrado en la bibliografía trabajos posteriores que aporten nuevos datos morfológicos de interés, y ello a pesar de que aún quedan muchas parcelas oscuras, tanto en relación con el origen y significación de algunas estructuras, como en cuanto a la morfología de éstas.

CICLO DEL EPITELIO SEMINIFERO. LA OLA ESPERMATO  
GENETICA.

Von Ebner, en 1871, examinando el túbulo seminífero, encuentra series ordenadas de asociaciones celulares que se repiten y que su longitud en el túbulo seminífero de la rata es de 3,2 cm., llamando a cada serie completa ola del epitelio seminífero. (Von Ebner, 1888).

Regaud (1901), observó que en un punto determinado del túbulo se desarrollan simultáneamente varias generaciones de células germinales. Esta sucesión de las distintas asociaciones celulares hasta la reaparición de la primera en un punto dado del túbulo, constituye el ciclo del epitelio seminífero, y, cada una de ellas, se corresponde con una etapa diferente del ciclo.

Utilizando la técnica del PAS, Leblond y Clermont (1952), diferencian en la evolución del acrosoma de las espermátidas 19 estadios diferentes; correspondiendo los tres primeros a la fase de Golgi, los cuatro siguientes a la del casquete, siete más a la fase acrosómica y los cinco restantes a la fase de maduración. (Figura nº 3).

Tomando como base los diferentes tipos de espermátidas que aparecen en cada asociación celular, Leblond y Clermont (1952), establecen las cator

de etapas del ciclo del epitelio seminífero de la rata (Figura nº 4).

La puesta en marcha del desarrollo de una nueva generación está acoplada, de forma preestablecida, con el desarrollo de las precedentes (Courot y cols., 1970).

Desde el trabajo de Leblond y Clermont éste ha sido el método más utilizado para establecer una clasificación de las distintas etapas por las que atraviesa el ciclo del epitelio seminífero, y será el que utilizemos en nuestro trabajo.

Sin embargo, se han descrito otros métodos como, por ejemplo, el que toma como base los cambios morfológicos que ocurren a nivel del núcleo de las células germinales en su proceso de maduración (Roosen-Runge y Giesel, 1950), estableciéndose en este caso ocho etapas diferentes. O el que utiliza las claras diferencias existentes en la distribución de los lípidos y de las fosfatasas ácidas y en la actividad de la sorbitol deshidrogenasa, de la fosfamidasa y de la glicerofosfatodeshidrogenasa en el acrosoma de las espermátidas, para establecer, por métodos histoquímicos, la etapa evolutiva del ciclo.

#### DURACION DEL PROCESO ESPERMATOGENETICO.

La organización del epitelio seminífero implica una coordinación en el desarrollo de las diferentes células germinales.

La duración del ciclo del epitelio seminífero varía con factores tales como la edad, la temperatura ambiente, factores hormonales, la raza, etc. Así, dentro de una misma especie animal, como por ejemplo la rata, en la cepa Sherman la duración de un ciclo completo es de 12 días, en la Sprague-Dawley de 12,9 y en la Wistar de 13,3 días. (Coutrot y cols., 1970).

La duración total del proceso espermatogénico también varía con la especie: 32 días en el conejo, 74 días en el hombre y unos 48 días en la rata, según Clermont y cols., 1959. (Figura nº 5).

#### CELULA DE SERTOLI

Cuando Sertoli en 1865 describe esta célula por primera vez como una célula ramificada que existe en el túbulo seminífero, ya indicaba que, posiblemente, las transformaciones que se producían en las células de la línea germinal debían estar en íntima asociación con ella.

A partir de este momento, y en lo que queda del si glo XIX, varios autores van a dedicar su atención a esta célula. La Valette St. George (1876, 1878) las llama células foliculares. Prenant (1887) habla de ellas como de pequeñas células epiteliales. Maxmow (1899) informa de su capacidad para fagocitar células muertas y agentes de tinción. También Regaud (1901) trata de ellas e informa de que, efectivamente, su aspecto varía de forma paralela a las transformaciones sufridas por las células de la línea germinal.

A pesar de que es una célula que se describe muy pronto, debido a las dificultades que presenta su estudio con el microscopio óptico, durante toda la primera mitad de nuestro siglo se avanza muy poco en la aportación de nuevos datos y será una célula mal conocida hasta prácticamente la segunda mitad de nuestro siglo.

La primera aportación importante la hace Eftman (1950), utilizando para la visualización de las células de Sertoli técnicas de impregnación con plata, que hasta entonces se habían utilizado para el estudio del aparato de Golgi. Eftman describe la célula de Sertoli como si fuese un "árbol" que se insertara directamente en la membrana basal, y cuyas ramas se extienden hacia la luz del túbulo, internándose entre las células de la línea germinal, a las que sirve de soporte. La

aplicación de esta técnica permite a Elftman publicar en 1963 sus hallazgos acerca de la citoarquitectura del epitelio seminífero, en la que el papel que juegan la forma y disposición de la célula de Sertoli son fundamentales. En un corte tangencial que afecte al cuerpo celular (tronco, en la comparación que se hace de su forma con la de un árbol), aparece con un contorno poligonal, alrededor del cual se disponen los espermatocitos paquiténicos según un patrón regular, formando un anillo de seis espermatocitos rodeando a cada célula de Sertoli. Cada dos anillos, correspondientes a células de Sertoli vecinas, comparten tres espermatocitos entre sí. A medida que en etapas sucesivas los espermatocitos I aumentan de tamaño, no caben en los espacios que quedan entre las prolongaciones del citoplasma de la célula de Sertoli que los mantiene en posición, por lo que aparecen con sus caras facetadas y en dos capas, una dispuesta sobre la otra. Las espermatidas a que dan lugar, por el mismo motivo, se dispondrán en cuatro filas, apiladas unas sobre otras, también envueltas en las prolongaciones citoplasmáticas de las células de Sertoli.

El primero que estudia la célula de Sertoli con microscopio electrónico es Watson (1952), y el descubrimiento de que las células de Sertoli no forman un sincitio se produce poco después, gracias a los trabajos de Fawcett y Burgos (1956).

La aplicación sistemática a partir de este momento del microscopio electrónico en el estudio de la morfología de la célula de Sertoli, hace que se hayan aportado gran cantidad de datos, que nos dan una idea más clara de su ultraestructura y de las funciones que la están encomendadas.

Se trata de una célula columnar, alta, que se extiende desde la base del epitelio hasta la luz del túbulo, emitiendo prolongaciones citoplasmáticas laterales, que rodean directamente a las células germinales (Dym y Cavicchia, 1978), y cuya morfología parece ser que varía dependiendo del estado funcional del epitelio seminífero. Así, desde que el espermatozoide se libera a la luz del túbulo hasta la formación de nuevas espermátidas, el núcleo aparece de forma más o menos triangular y con una posición cercana a la membrana basal; mientras que cuando las espermátidas empiezan su elongación, algunos núcleos de las células de Sertoli aparecen como bastones entre las células germinales. (Courot y cols, 1970).

En el citoplasma, los orgánulos se localizan preferentemente en la región basal o perinuclear. El R.E.L. es más abundante que el R.E.R., y suele estar conectado a él. En cada momento, el aspecto que adopta está en relación con la etapa del ciclo del epitelio seminífero. (Clermont y cols., 1980). El aparato de Golgi aparece normalmente desarrolla

do. En cortes ultrafinos y a microscopía electrónica convencional, se observa como unos cuantos sáculos paralelos asociados a una serie de vesículas aisladas, distribuidas fundamentalmente por las regiones basal y supranuclear. En cortes gruesos, y con microscopía electrónica de alto voltaje, los elementos de la cara cis aparecen comunicados entre sí. Utilizando técnicas especiales de tinción con Ur-Pb-Cu, a pocos aumentos y con microscopio electrónico de alto voltaje, aparece como una estructura citoplasmática densa, que se diferencia fácilmente de las cisternas del retículo endoplásmico, y que nunca llega hasta las prolongaciones citoplasmáticas. A mayores aumentos se ven zonas amplias, correspondientes a cisternas interconectadas por túbulos, apareciendo como una estructura esponjosa y fenestrada en forma de cono y, a menudo, penetrada por elementos del retículo endoplásmico, con el que existen relaciones frecuentes a nivel de los sáculos de la cara trans, sin que se haya podido comprobar la continuidad entre ambas estructuras. (Rambourg y cols., 1979). (Figura n° 6).

La variabilidad con que aparecen las gotas lipídicas depende también del estado funcional en que se encuentra el epitelio seminífero. De tal manera que, cuando la gota citoplasmática fagocitada por la célula de Sertoli se desplaza hacia el polo basal en forma de cuerpo residual, encontramos en esta región grandes cantidades de lípidos que,

a medida que la espermiogénesis progresa, se fragmentan y movilizan hacia el citoplasma y sus ramificaciones (Von Ebner, 1888), seguramente para ser reutilizados en el siguiente ciclo.

Las vesículas de pinocitosis son frecuentes. Ocasionalmente, se encuentran también gránulos de lipofucsina, de RNA y de un material PAS positivo que, seguramente, en su mayor parte, corresponde a gránulos de glucógeno.

Se ha comprobado el paso de gránulos de RNA, lípidos y glucógeno a las células germinales, siguiendo un ciclo acoplado a la espermiogénesis, lo que podría ser prueba de la mediatización del metabolismo de las células germinales por las células de Sertoli.

Su complicada forma se mantiene por la presencia de un citoesqueleto constituido por microtúbulos y filamentos de tamaño intermedio de vimentina y de actina (Toyama, 1976). Los microfilamentos están implicados en el mantenimiento de la forma celular (Chevalier y Dufaure, 1981), en la formación de la barrera hemato-testicular (Neaves, 1977), en la translocación de las células germinales (Toyama, 1976) y en la secreción de proteínas. Los microtúbulos intervienen también en la secreción de proteínas. Parece ser que, tanto la síntesis de microfilamentos, como la de microtúbulos, es-

tán bajo el control de la pituitaria, disminuyen do éstos en animales hipofisectomizados (Chevalier, 1979).

La célula de Sertoli cuenta además con un equipo enzimático importante, formado por: fosfatasas ácidas, 5-nucleotidasas, mono, bi y trifosfatasas, DPB y TPN diaforasas, citocromo oxidasas, Heshidrogenasas, sulfatasas, esterases, lipasas, etc., que podrían estar asociadas al intercambio metabólico con las células germinales.

Especializaciones de membrana de la célula de Sertoli. La barrera hemato-testicular.

El contorno de la célula de Sertoli es muy irregular, por las numerosas prolongaciones y criptas en las que se alojan las células de la línea germinal y los cuerpos residuales. Además, este contorno no es estático, sino que varía continuamente en el ciclo del epitelio seminífero, como veremos posteriormente.

Las prolongaciones del citoplasma de las células de Sertoli son fundamentalmente de dos tipos:

- 1 - Prolongaciones laterales, que surgen del tronco celular, como láminas que se extienden entre las espermatogonias, espermatocitos y las espermátidas jóvenes

nes, a las que cubren.

- 2 - Prolongaciones apicales, que van a alojarse a las espermatidas en maduración, hasta su liberación a la luz. (Gravis, 1978).

Tanto unas como otras, establecen contactos con las células germinales a todos los niveles. La morfología y auténtica naturaleza de estos contactos, así como su significación, es tema de controversia. Fawcett (1975), opina que las células germinales (con excepción de las espermatidas), están libres de adherencias a las células de Sertoli, lo que facilitaría su movilidad. Por el contrario, para Russell (1977), las uniones existen a todos los niveles, siendo su complejidad progresiva con la maduración de las células germinales. Otros autores establecen diferencias entre las uniones de la célula de Sertoli con las espermatogonias, espermatoцитos y espermatidas todavía esféricas y las que existen entre las células de Sertoli y las espermatidas en fase de maduración. (Brökelmann, 1963, Burgos y cols., 1970).

Estructuralmente, se han descrito como formadas por un material electrodense, amorfo y homogéneo, que aparece a ambos lados de las membranas yuxtapuestas (Brökelmann, 1963 y Nicander, 1967), habiéndose comparado con los desmosomas (Nicander, 1967

Kaya y Harrison, 1976 y Russell, 1977) y que, a medida que evolucionan, en el citoplasma de la célula de Sertoli subyacente irían apareciendo haces de filamentos y cisternas de retículo endoplásmico paralelas a la superficie de contacto.

Las medidas que se dan para el espacio intercelular a nivel de las uniones también varían, aunque todos los autores están de acuerdo en la existencia de un estrechamiento, pero que puede oscilar entre los 20 nm y los 3 a 5 nm. Burgos y cols. (1970) son los primeros en advertir que, a veces, es posible distinguir en el citoplasma de la célula de Sertoli adyacente a una espermatogonia una diferenciación similar a la mitad de un complejo de unión del tipo de las que se encuentran entre células de Sertoli (véase más adelante). Ross (1976), también interpreta de esta forma el tipo de uniones que halla sobre la superficie de la espermátida recién formada, e indica que, si en ocasiones da la impresión de que no existe ningún tipo de unión especializada, podría ser porque el plano de corte no hubiera incluido esa zona.

A nivel de la espermátida tipo 19 y la prolongación apical que le sirve de soporte, las imágenes se complican por la aparición de una nueva estructura, los complejos túbulo-bulbosos, anteriormen-

te descritos.

Las propias células de Sertoli establecen también relaciones entre sí, apareciendo entre ellas además de complejos túbulo-bulbosos (del mismo aspecto de los que existen entre las células de Sertoli y las espermatidas maduras, descritos anteriormente), complejos de unión especializados, que son los responsables de la existencia de la BARRERA HEMATO-TESTICULAR, por lo que su importancia funcional es trascendente.

Vilar y cols, 1962, sitúan la barrera hemato-testicular entre la lámina propia y las células de Sertoli. Brökelmann, 1963, observa ciertas uniones entre las células de Sertoli semejantes a estrechamientos, en los que las membranas de ambas células implicadas distan entre sí 70 Å, confirmándose posteriormente su existencia por numerosos autores (Nicander, 1967, Flickinger y Fawcett, 1967, Burgos y cols., 1970, Dym y Fawcett, 1970, Fawcett y cols., 1970, Dym, 1973, etc.), sin que por el momento se hayan establecido todos los tipos de unión que aparecen en el complejo.

Existe acuerdo general en que formando parte de estos complejos de unión especializados hay zónulas occludens y nexos o uniones comunicantes (Dym y Fawcett, 1970, Fawcett y cols., 1970, Dym, 1973, Bigliardi y Talluri, 1976, Neaves, 1977, Russell,

1977 y 1979). Además se han descrito estructuras similares a desmosomas (Kaya y Harrison, 1976, Russell, 1977 y 1979), a zónulas adherentes (Kaya y Harrison, 1976, Burgos y cols., 1970), y simples estrechamientos del espacio intercelular (Nicander, 1967, Dym, 1973, Neaves, 1977, Russell, 1977). Estos sistemas de unión se acompañan de haces hexagonales de filamentos y cisternas de retículo endoplásmico que se sitúan en los citoplasmas sertolianos subyacentes, paralelos a la superficie de contacto, más o menos visibles según los casos.

La barrera hemato-testicular, puesta de manifiesto desde un punto de vista fisiológico por Voglmayr y cols. (1966), y confirmada por Setchell (1967) y desde un punto de vista morfológico, y ya de forma inequívoca, por Flickinger y Fawcett (1967), tiene su expresión morfológica a nivel de las zónulas ocludens o tight junctions. (Dym y Fawcett, 1970, Fawcett y cols., 1970).

Esta barrera hemato-testicular está constituida por alineaciones paralelas de uniones ocluyentes (Fawcett, 1974 y Bigliardi y Talluri, 1976), localizadas entre las prolongaciones citoplasmáticas de las células de Sertoli que se arquean sobre las espermatogonias y espermatocitos preleptoténicos, y a las que se asocian haces de filamentos y cisternas del retículo endoplásmico. (Figura nº 7).

Los trazadores del espacio extracelular, como el lantano, nunca penetran más allá de estas alineaciones de zónulas ocludens (Neaves, 1977). Utilizando criofractura se ve que las zonas de oclusión están constituidas por partículas intramembranasas de diferentes tamaños, que siguen alineaciones bastante rectas y paralelas, en número mucho mayor de lo que es habitual en este tipo de uniones (Neaves, 1977), lo que podría hacerlas más resistentes a la rotura (Fawcett, 1975). El que las partículas que aparecen alineadas sean de diferentes tamaños, se debe a la asociación especial existente a este nivel entre zónulas ocludens y nexos (Bigliardi y Talluri, 1976).

La existencia de esta barrera, divide el epitelio seminífero en dos compartimentos: el basal, en donde se encuentran las espermatogonias y los espermatocitos preleptoténicos, y el luminal, donde se sitúan el resto de las células de la línea germinal. (Dym y Fawcett, 1970, Fawcett y cols., 1970). Los espermatocitos zigoténicos quedarían nada más atravesar la barrera, sobre las uniones ocluyentes. (Russell, 1977).

#### Funciones de la célula de Sertoli.

Dada su posición particular, su estructura y su intensa actividad metabólica, la célula de Serto-

li juega un papel fundamental en:

- 1) El mantenimiento de la citoarquitectura y dinámica del epitelio seminífero.
- 2) Los intercambios metabólicos que ocurren a nivel de las células germinales.
- 3) La coordinación y regulación de la espermatogénesis y de la función endocrina del testículo.

Citoarquitectura y dinámica del epitelio seminífero.

Aunque ya con anterioridad se suponía que el papel desempeñado por la célula de Sertoli en el mantenimiento de la arquitectura de la pared del túbulo era fundamental, son los trabajos de Elftman (1950, 1963) los que lo van a poner claramente de manifiesto: "las células de Sertoli, directamente apoyadas sobre la lámina propia, suponen centros alrededor de los cuales se disponen las células germinales".

Mientras que el número y distribución de las células de Sertoli a lo largo de la lámina propia no se modifican durante el ciclo (Bustos Obregón, 1970 y Lino, 1971), la estirpe de las células germinales sí que está sometida a modificaciones. En la línea germinal, los estratos periféricos o basa-

les (que constituirían en realidad la "capa germinativa" del epitelio estratificado, altamente especializado, que es el epitelio seminífero) van a reponer las células ya maduras que se liberan en la luz (los espermatozoides).

Durante mucho tiempo se discutió la forma de renovación de esta población celular, hasta la publicación del trabajo de Clermont y Leblond, (1953) en el que se establece la llamada "Teoría de Renovación de las Células Madre". Según esta teoría, aproximadamente al principio de cada ciclo, las espermatogonias A<sub>0</sub> entran en mitosis, originando nuevas espermatogonias A (que, a su vez, originarían el resto de los tipos de espermatogonias y un pequeño número que quedaría como "espermatogonias durmientes" o de reserva, que no se dividirán durante las primeras ocho etapas del ciclo. Sin embargo, en la etapa IX, cada célula "durmiente" iniciaría una serie de divisiones para producir los distintos tipos de células A. Al principio del siguiente ciclo, una de cada cuatro células deja de dividirse para convertirse en una nueva célula de reserva, mientras que las otras tres originarían seis espermatogonias de las llamadas intermedias, las que, a su vez, se dividirían hasta originar doce espermatogonias B, cuya mitosis daría lugar a veinticuatro espermatoцитos I. (figura nº 8).

El esquema propuesto por el mismo grupo de traba-

jo años más tarde (Clermont y Bustos-Obregón, 1968) fue el que aparece en la Figura nº 9.

Este esquema parece concordar con los resultados obtenidos por Dym y Clermont (1970), tras la utilización de rayos X, para la irradiación de túbulos seminíferos de rata y que, claramente, indican que las espermatogonias A<sub>0</sub> se comportan como radiorresistentes y que entran en mitosis a intervalos fijos y predeterminados, es decir, parece ser un proceso regulado rígidamente. Las espermatogonias A<sub>0</sub> y las A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub> constituirían, por tanto, dos poblaciones distintas de células madre que coexisten en equilibrio en el animal adulto. Los tipos A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub>, en condiciones normales, podrían inhibir la proliferación de las A<sub>0</sub> pero, como consecuencia de la degeneración, esta inhibición desaparecería y el tipo A<sub>0</sub> podría comenzar a proliferar, y restablecer la población celular normal. A medida que las espermatogonias A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub> se restauran, su acción inhibitoria volvería a ejercerse. Así, pues, en último término, las espermatogonias A<sub>0</sub> serían las auténticas células madre de reserva. Los picos de mitosis coincidirían con las etapas IX (A<sub>1</sub>), XII (A<sub>2</sub>), XIV (A<sub>3</sub>), I (A<sub>4</sub>), IV (In) y VI (B) (Dym y Clermont, 1970), (Cf. Figura nº 4).

Como ya indicamos, los espermatocitos preleptoténicos son los que comienzan a despegarse de la lámina propia por interposición de una prolonga-

ción del citoplasma sertoliano (Russell, 1977). En algún punto del proceso espermatogénico las células del compartimento basal tienen que atravesar la barrera y pasar al compartimento luminal. Este paso de la barrera ha sido estudiado por Russell (1977), quien establece la necesidad de la existencia de un nuevo compartimento: el intermedio, y lo define como aquel que permite el movimiento de las células germinales hacia la luz, sin perturbar la continuidad de la barrera hemato-testicular.

Vistas dos células de Sertoli contiguas, las especializaciones de unión aparecen como una lámina que se extiende varias micras en dirección a la luz y que terminan en el punto donde las células de Sertoli se separan para rodear a los primeros espermatoцитos que encontramos después de la barrera.

Los espermatoцитos preleptoténicos empiezan a perder contacto con la lámina basal en las etapas VII y VIII del ciclo del epitelio seminífero, empujados por las prolongaciones citoplasmáticas de las células de Sertoli, con las que se mantienen en estrecho contacto por las diferenciaciones existentes a nivel de sus membranas, que ya hemos descrito. En la siguiente etapa, los espermatoцитos leptoténicos aparecen ya separados de la lámina propia por las prolongaciones de las células de

Sertoli contiguas, que entran en contacto y establecen uniones firmes, del tipo zónula adherens. A medida que avanza la etapa IX, el área de contacto entre las expansiones citoplasmáticas de las células de Sertoli aumenta, y pueden identificarse zónulas ocludens como uno de los componentes del complejo de unión especial que se establece. A medida que la superficie de contacto entre las prolongaciones de las células de Sertoli se hace más amplia, el espermatocito leptoténico es desplazado hacia la luz del túbulo. Va a ser, por tanto, el espermatocito leptoténico el que atraviese este compartimento intermedio, empujado por las prolongaciones de la célula de Sertoli, extremo con el que también están de acuerdo los resultados de Dym y Cavicchia, 1978: Ya que los espermatocitos no presentan movimientos ameboides, ni pierden los contactos de unión semejantes a desmosomas con las células de Sertoli circundantes, es de suponer que la célula de Sertoli juegue un papel activo en la transferencia de los espermatocitos al compartimento luminal (Russell, 1977). (Figura nº 10).

A medida que avanza el ciclo -etapa XI-, aparece ya la asociación característica de filamentos y cisternas de retículo endoplásmico con las zónulas ocludens, que desaparecen posteriormente (etapa XII) y ya en la etapa siguiente (XIII) sólo aparecen complejos de unión recién formados, por

debajo de los espermatocitos.

Dym y Fawcett (1970), postularon la rotura y formación de zónulas occludens, como el mecanismo por el cual tiene lugar la transferencia del espermatocito. Ross y Dobler (1975), aunque fundamentalmente están de acuerdo con esta hipótesis, opinan que, a pesar de que las dos membranas se separan para dejar pasar al espermatocito, las especializaciones quedan intactas, observándose como una "hemi-unión" en la membrana sertoliana en contacto con el espermatocito que está pasando. La unión vuelve a establecerse una vez que éste ha pasado. Russell (1977), propone que durante el paso del espermatocito leptoténico las zónulas adherentes podrían actuar como uniones intermedias reguladoras del paso de fluidos o que, al menos, el material adhesivo de esta unión sea capaz de prevenir la rápida entrada de fluidos. Es decir, durante las etapas IX, X y XI y parte de la XII del ciclo, existen dos barreras: una recién formada debajo del espermatocito leptoténico y otra (formada en las primeras etapas) que queda por encima. Entre una y otra se localizaría el compartimento intermedio (Russell, 1977). Los espermatozoides zigoténicos nunca se han encontrado rodeados por los trazadores cuando éstos se utilizaron para localizar la barrera, por lo que se considera que estas células se encuentran ya en el compartimento luminal. (Dym y Cavicchia, 1978).

A este nivel de la barrera hemato-testicular aparecen además los complejos túbulo bulbares entre células de Sertoli vecinas. Estos complejos van a tener su origen y disolución acoplados al ciclo: durante las etapas II a V aparecen con una configuración morfológica que indican que son de nueva formación, alcanzando su máximo desarrollo en las etapas IV y V. En la etapa VI se ven asociados a lisosomas y comienzan a degenerar. Desde la etapa VII a la I no aparecen los bulbos, y el túbulo, cuando se ve, está sobre las espermatogonias o de bajo de los espermátocitos leptoténicos. Se ha propuesto que la misión de los complejos túbulo-bulbosos sería la de mantener a las células germinales en el compartimento basal y, en el momento oportuno, su disolución las permitiría emigrar (Russell, 1979). Si tenemos en cuenta que es el espermátocito leptoténico el que traspasa la barrera durante las etapas IX, X y XI (Russell, 1977), esta proposición podría ser válida, puesto que coincide con momentos en los que el desarrollo de los complejos es mínimo, aunque su disposición no parece que tenga polarización alguna, ni que estén en relación con las células germinales. Los espermátocitos paquiténicos aparecen en la etapa XIV, dispuestos en anillo hexagonal alrededor de la célula de Sertoli. El aumento de tamaño en las siguientes etapas, hará que se dispongan en dos estratos de caras facetadas, y cuando la meiosis se completa, las espermátidas resultantes se dis

ponen en cuatro láminas zigzagueantes entre las células de Sertoli. (Elftman, 1963).

Entre las espermatidas 1 y las células de Sertoli se establecen uniones que parecen corresponder a la mitad del complejo de unión especial que encontramos a nivel de la barrera hemato-testicular y que se localiza en el lado de la célula de Sertoli. Hacia esta zona va a girar el polo nuclear cubierto por el capuchón acrosómico, orientándose hacia el núcleo de la célula de Sertoli (etapa VIII) Este momento, coincide con el principio de la fase acrosómica, emigrando a partir de entonces hacia la profundidad del epitelio seminífero. En las etapas XIII y XIV vamos a encontrar las espermatidas con su región más craneal casi en la periferia del túbulo, profundamente hundidas en una cripta de la célula de Sertoli. En el citoplasma sertoliano no aparecen a este nivel las especializaciones de unión ya descritas, alcanzando su máxima complejidad en cuanto a haces de filamentos y cisternas de retículo endoplásmico asociados. Esta zona de unión especializada cubre toda la cabeza de la espermatida. La etapa siguiente (etapa I), coincide con la formación de nuevas espermatidas que, por la falta de espacio, habrán de disponerse en cuatro filas. Es posible que, al menos en parte, este hecho induzca el que la espermatida 15, ya en fase de maduración, comience a desplazarse hacia la luz. (Elftman, 1963). En este desplazamiento intervie-

ne también la célula de Sertoli. La región citoplasmática que aloja a la espermatida en fase de maduración, va a acompañarla en su desplazamiento como si fuera el estuche en el que se transporta, pero que, al mismo tiempo, actúa como medio de transporte.

Tengamos en cuenta que, en la fase I, no sólo acaba de aparecer la nueva generación de espermatidas tipo 1 -que en este momento inician la espermiogénesis y que tienen que apilarse para caber en el espacio disponible-, sino que además, las espermatogonias  $A_4$  entran en mitosis para originar las nuevas espermatogonias  $A_1$  y las espermatogonias  $I_n$ .

En la siguiente etapa (II) encontramos las espermatogonias  $I_n$  y los espermatocitos paquiténicos que continúan aumentando de tamaño, por lo que va a ser necesario el desplazamiento de parte del citoplasma de la célula de Sertoli desde la base hacia la luz del túbulo. La porción citoplasmática que se desplaza corresponde precisamente a la que aloja a las espermatidas en maduración, formando como una copa que contiene la cabeza de la espermatida.

En la etapa III, los espermatocitos paquiténicos continúan aumentando de tamaño y las espermatidas tipo 3 finalizan la fase de Golgi. Mientras, si-

que el camino de las espermatidas 16 hacia la luz, siempre protegidas por esta porción, altamente especializada, del citoplasma de la célula de Sertoli.

En la etapa IV, mientras las espermatidas 4 están iniciando la fase del casquete, los espermatocitos paquiténicos siguen aumentando de tamaño y las espermatogonias In entran en mitosis para originar las espermatogonias B, que aparecen ya en la siguiente etapa (V). El ascenso hacia la luz de las espermatidas en maduración (espermatidas 17), continúa.

En la etapa VI, las espermatogonias B entran en mitosis para originar los espermatocitos preleptoténicos, mientras el espermatocito paquiténico continúa su aumento de tamaño y en las espermatidas 6 sigue evolucionando la fase del casquete. Las espermatidas en fase de maduración (espermatida 18), al final de esta etapa van a aparecer profundamente insertadas en el extremo de la prolongación apical, toscamente discoidea, en que se ha convertido el citoplasma de la célula de Sertoli a ella asociado. Esta prolongación, localizada en la luz del túbulo, se mantiene unida al soma de la célula de Sertoli por un estrecho conducto, que finaliza en una especie de maza con una ranura. En esta ranura irá alojada la espermatida, ya a punto de convertirse en espermatozoide. La prolongación citoplasmática de la célula de Sertoli cubre completa

mente la cabeza y el cuello de la espermátida, ex tendiéndose por el dorso de la misma sólo una delicada lámina, mientras que en la región ventral el citoplasma es más abundante. (Figura nº 11). La diferenciación alcanzada por la zona de contacto es máxima, apareciendo gran cantidad de cisternas de retículo endoplásmico y de filamentos. La gota citoplasmática, que hasta este momento envolvía la cola de la espermátida, va a comenzar a deslizarse hacia el cuello de la misma.

Al final de esta etapa, o principios de la siguiente, empieza a formarse una nueva estructura: los complejos túbulo-bulbosos que, partiendo de la ca ra ventral de la cabeza de la espermátida 19, van a ir a anclarse en la prolongación citoplasmática de la célula de Sertoli (Russell y Clermont, 1976), que ya hemos descrito brevemente con anterioridad. (Figura nº 12).

Los complejos túbulo-bulbosos comienzan a formarse al final de la etapa VI o principios de la VII (espermátida 19) como pequeñas evaginaciones que emergen de las zonas laterales de la cara ventral de la cabeza de la espermátida, coincidiendo con una invaginación del citoplasma de la célula de Sertoli (Russell y Clermont, 1976 y Russell, 1979 a). (Figura nº 13). Los complejos recién formados alcanzan 0,1 a 0,2  $\mu$ m. de longitud. Las membranas a este nivel son más finas (7,5 nm. aproximadamen

te) que en las demás regiones (unos 14 nm.), debido a la ausencia del glicocálix. (Russell, 1979). El fondo de la membrana invaginada de la célula de Sertoli aparece reforzado por una densificación de aspecto vellosa ("bristle coated pit") que se ha teorizado podría ser el inductor de la formación del complejo. Cuando el túbulo alcanza cierta longitud, comienza a dilatarse por su región central, dilatación ésta que va a originar el bulbo (Russell, 1979). El espacio intercelular está muy estrechado (6-8 nm.). Los complejos alcanzan unas 3  $\mu\text{m}$  de longitud y un diámetro en la porción tubular de unos 50 nm. y de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . en el bulbo. Su desarrollo es máximo durante la etapa VII, estando también presentes durante la VIII, en la que se va a producir su regresión antes de la liberación del espermatozoide. (Russell y Clermont, 1976 y Russell, 1979 a). (Figura nº 14).

Las cisternas del retículo endoplásmico aparecen íntimamente asociadas a los complejos túbulo-bulbosos; al principio de la fase VII existen cisternas saculares que forman una red en la periferia de la prolongación apical sertoliana y cisternas tubulares que se interconectan entre sí y que son mucho más abundantes que aquéllas. Esta red de cisternas tubulares se prolonga por el conducto de conexión, desde el cuerpo de la célula de Sertoli hasta la prolongación apical, extendiéndose

a lo largo de la cara dorsal y ventral de la cabeza de la espermátida, para terminar en forma de copas que abrazan a los bulbos de los complejos túbulo-bulbosos. (Clermont y cols., 1980). (Figura nº 15).

Hacia la mitad de la etapa VII, las cisternas saculares empiezan a entrar en regresión, mientras que las tubulares se hacen más abundantes. Al final de la etapa sólo quedan restos de las cisternas saculares, mientras que las tubulares forman una tupida red en la prolongación apical.

A medida que la etapa VII avanza, la gota citoplasmática, que se había desplazado hacia el cuello, forma una especie de lóbulo dilatado en su extremo distal y conectado por su parte proximal a la región caudal de la cabeza. Este lóbulo va a ir hundiéndose cada vez más en el citoplasma de la célula de Sertoli, acercándose a la base del túbulo. En él se contienen los restos del citoplasma de la espermátida, con un aspecto electrodenso, debido al empaquetamiento de los orgánulos existentes (ribosomas agrupados en una o más masas, gotas de lípidos, mitocondrias y vacuolas). (Russell, 1979 b). (Figura nº 16)

Al mismo tiempo, las espermátidas han seguido su camino hacia la luz. Algunos núcleos de las células de Sertoli las acompañan en su ascenso y apa-

recen desplazados de su localización habitual y con forma de bastón, seguramente debido a la estrechez de la célula de Sertoli en esta zona. (Elftman, 1963).

Ya en la etapa siguiente (etapa VIII), aparecen imágenes indicativas de degradación de los complejos túbulo-bulbosos por lisosomas (Russell, 1979a). También las cisternas de retículo endoplásmico, cuya organización había alcanzado gran complejidad, han entrado en regresión. La gota citoplasmática se ha desconectado de la espermátida que, a estas alturas, ya es un espermatozoide, y queda libre en la luz del túbulo.

La prolongación apical de la célula de Sertoli, que hasta este momento había sostenido a la espermátida, entra en regresión, y el citoplasma contenido en ella se desplaza a localizaciones más basales. También el cuerpo residual se incorpora a este desplazamiento citoplasmático y su evolución va a estar acoplada al ciclo general del epitelio seminífero, como posteriormente veremos.

#### La célula de Sertoli como mediadora del metabolismo de las células germinales.

La idea de la célula de Sertoli como "célula nodriza" de las de la línea germinal es muy anti-

gua y actualmente se acepta como un hecho comprobado (Vilar y cols., 1962, Nishida, 1954).

La posición que ocupa la célula de Sertoli en la pared del túbulo, junto con su morfología y las relaciones que establece con las células de la línea germinal, suponen los primeros datos a aportar en este sentido.

El descubrimiento de la barrera hemato-testicular supuso un hallazgo también importante en este sentido. Las células germinales que se encuentran en el compartimento basal pueden nutrirse y realizar sus intercambios metabólicos con los capilares sanguíneos a través del intersticio por difusión, sin que la lámina propia suponga obstáculo para el paso de la mayor parte de sustancias. Sin embargo, se ha comprobado -mediante inyección de trazadores- que todos los metabolitos que llegan o abandonan las células germinales situadas más allá de la barrera hemato-testicular, lo hacen a través de la célula de Sertoli. (Courot, 1970).

Además, en la propia célula de Sertoli, la corriente de difusión de las sustancias nutritivas sigue siempre una misma dirección, desde la base hacia la luz, lo que hace suponer además un paso de sustancias hacia las células germinales (Nishida, 1954).

Otros datos que son interesantes en este sentido son la existencia de vesículas de pinocitosis a lo largo de las membranas plasmáticas (Nicander, 1967), la localización en la célula de Sertoli de un equipo enzimático muy variado; que utiliza ría en el procesamiento de estos metabolitos (Courrot, 1970) y, la actividad fagocítica de las células de Sertoli (Olegg y Mc Millan, 1965, Nicander, 1967, Carr y cols., 1968 y Courrot y cols., 1970) que, incluso, ha hecho que algunos autores especulen con la posibilidad de su pertenencia al sistema reticuloendotelial. (Carr y cols., 1968).

Se cree que en el transporte de los metabolitos intervendría el retículo endoplásmico y los microtúbulos de las células de Sertoli. (Courrot, 1970).

De hecho, durante la espermiogénesis, se ha comprobado que ciertos lípidos y materiales PAS positivos siguen un ciclo entre las espermátidas y las células de Sertoli.

Coordinación y regulación de la espermiogénesis y de la función endocrina del testículo. Intervención de la célula de Sertoli.

Si observamos la gran precisión matemática con que se suceden los distintos pasos de la esper-

matogénesis y la exactitud con que éstos se encajan dentro de las sucesivas etapas del ciclo del epitelio seminífero, llegaremos a la conclusión de que la coordinación entre las distintas transformaciones ocurridas en las células germinales es perfecta.

Los conocimientos que poseemos acerca del mecanismo de regulación de este proceso son aún muy parciales, y no comprendidos de forma global.

Muchos autores están de acuerdo en partir de la suposición de que la liberación del espermatozoide es un momento importante en la regulación y, ya desde antiguo, se fijaron en los componentes del cuerpo residual de Regaud, fagocitado por la célula de Sertoli (Kingsley-Smith y Lacy, 1959), alguno de los cuales podría contener la sustancia reguladora que actuaría, a través de la célula de Sertoli, sobre las células germinales inmaduras. (Courot, 1970).

El componente más estudiado han sido las gotas lipídicas contenidas en el cuerpo residual, y se ha intentado buscar correlaciones entre el ciclo que siguen los lípidos y el del epitelio seminífero.

El cuerpo residual de Regaud emigra hacia la periferia y, poco a poco, se va a ir degradando, pe

ro, en su lugar, van a quedar unos cuerpos lipoi-  
deos del mismo tamaño y localización periférica.  
(Kingsley-Smith y Lacy, 1959).

Desde la etapa IX (la siguiente a la liberación del espermatozoide) hasta la II, los lípidos del epitelio seminífero van a aparecer casi totalmente dentro del citoplasma de la célula de Sertoli, formando un estrecho anillo sudanófilo alrededor de la periferia del túbulo. Durante las etapas VI-VIII, los lípidos se hallan en la luz del túbulo, en el interior del citoplasma de las espermátidas en fase de maduración, donde han hecho su aparición desde la etapa II. A partir de aquí, agoienden hacia la luz del tubo, hasta quedar en el cuerpo residual cuando la espermátida se libera a la luz como espermatozoide en la etapa VIII. Por otra parte, la actividad fosfatasa ácida sigue el mismo patrón que los lípidos, pero no se ha podido demostrar en el citoplasma de la célula de Sertoli asociada a la fagocitosis de los cuerpos residuales. (Niemi y Korman, 1964). En las espermatogonias y espermátocitos es rara la presencia de lípidos, comenzando a hacerse patentes a partir de la espermátida 1, aumentando su contenido en las espermátidas a medida que evoluciona la espermiogénesis. (Brökelmann, 1963).

Por otra parte, la inhibición de la espermatogénesis siempre se acompaña de un aumento de lípidos.

en la célula de Sertoli. (Lacy y Lofts, 1965 a), Chung y Hamilton, 1975 y Alexander y Tung, 1977).

Lacy y Lofts (1961), extrajeron los lípidos que se producían como consecuencia de la inhibición de la espermiogénesis por irradiación con Rayos X o por tratamiento estrogénico y encontraron que, en ambos casos, estos lípidos daban una respuesta positiva al test de la progesterona y sus metabolitos, concluyendo que la célula de Sertoli debía elaborar alguna hormona esteroidea que se utiliza ría normalmente durante la espermatogénesis.

Se ha intentado valorar también la importancia que la existencia de la barrera hemato-testicular ten dría en el mecanismo de regulación, lo que establecería una diferencia importante entre la forma de regulación del proceso en el compartimento basal y en el luminal. (Dym y Cavicchia, 1978).

De cualquier forma, lo más probable es que el con trol de la espermatogénesis esté íntimamente rela cionado con la función endocrina del testículo y su regulación, en la que parece que las células protagonistas son las células de Sertoli y células de Leydig.

### I.2.2. ESPACIO INTERTUBULAR

#### INTRODUCCIÓN

La mayoría de los estudios morfológicos que se

han hecho sobre los elementos del espacio intertubular se han fijado en la célula de Leydig, descuidando, casi siempre, el resto de los componentes, seguramente debido a lo difícil que era su buena preservación utilizando las técnicas histológicas habituales.

Aproximadamente a partir de 1960 se realizan numerosos estudios, fundamentalmente histoquímicos, de localización enzimática, y ultraestructurales, mediante la aplicación de la microscopía electrónica. (Christensen, 1959, Fawcett y Burgos, 1960, Kretser, 1967, Fawcett y cols., 1969, Christensen, 1970, Burgos y cols., 1970, Hooker, 1970, Fawcett y cols., 1973 y Fawcett, 1974).

La región intertubular se describe como un espacio ocupado por un tejido conectivo laxo, en el que aparecen fibras de reticulina, algunas de colágena y algunas elásticas, ya en la lámina propia. Este tejido conjuntivo está ricamente vascularizado. Los vasos sanguíneos, al penetrar en este espacio, se ramifican hasta dar arteriolas y capilares intertubulares paralelos a los túbulos que, a su vez, sufren ramificaciones perpendiculares, constituyendo una red peritubular. También el sistema linfático forma una tupida red de vasos, más densa que la de los sanguíneos, que se localiza fundamentalmente entre los espacios angulosos que quedan entre los túbulos.

Existen además diferentes tipos celulares; células más o menos poligonales de aspecto epitelioi de y de origen mesenquimal, que se encuentran di seminadas o en grupos y, habitualmente, relacionadas con los capilares sanguíneos. Células fusiformes, fibroblastos, también de origen mesenquimatoso, en íntima asociación con la pared del túbulo o con la adventicia de los vasos. Y, además: histiocitos, macrófagos, células cebadas, células plasmáticas, linfocitos, etc.

#### ORGANIZACION DEL ESPACIO INTERTUBULAR

Las relaciones entre los distintos componentes, desde un punto de vista morfológico, sólo se han establecido en estudios que combinan la microscopía electrónica de transmisión con la de barrido. (Clark, 1976).

El trabajo de Clark pone de manifiesto que el espacio intertubular del testículo de rata adulta tiene una configuración tridimensional intrincada, formando un delicado estuche que rodea a cada uno de los túbulos seminíferos por separado, pero sin que en él se presente ninguna discontinuidad. Parece como si túbulos y tejido intersticial estuvieran totalmente separados, sin que entre ellos se establezca conexión alguna, de tal manera que los fluidos pueden pasar libremente entre uno y otro componente, sin que ninguna ba-

rrera se interponga. Además, los elementos que ocupan el espacio intertubular dejan huecos, a modo de fenestraciones, que comunican los distintos espacios peritubulares entre sí, dando al componente intertubular un aspecto esponjoso. De esta forma, los líquidos que bañan directamente a los túbulos, están también en comunicación abierta con todos los elementos existentes en este espacio intertubular. (Figura nº 17).

Además de las células de Leydig y de los vasos sanguíneos, Clark describe la presencia de otros tipos celulares, tales como macrófagos y fibroblastos, además de una cubierta de células endoteliales que se dispone envolviendo el resto de los componentes del intersticio, quedando, entre dicha cubierta y la lámina propia que rodea a los túbulos un espacio peritubular, por donde circula el líquido intersticial. Esta lámina de células endoteliales aparece con discontinuidades en áreas específicas, que parecen estar relacionadas con la forma de empaquetarse los túbulos, de manera que suele estar presente entre dos túbulos enfrentados y faltar en los espacios más abiertos. En estas áreas abiertas (espacios localizados entre tres túbulos), predominan las células de Leydig, acompañadas de algunos macrófagos. Otros tipos celulares como, por ejemplo, los fibroblastos, son poco frecuentes. También en estas regiones se encuentran vasos sanguíneos, fibras

colágenas y algunos nervios. Los vasos sanguíneos incluyen capilares intertubulares y vasos de mayor calibre, normalmente localizados centralmente y rodeados por las células de Leydig. Las fibras colágenas son poco abundantes y, normalmente, se encuentran agrupadas en haces de varias fibras.

En las áreas cubiertas por células endoteliales (espacios cerrados, entre las superficies externas de dos túbulos), lo más característico es esta cubierta endotelial continua. Los límites entre dos células endoteliales adyacentes son complejos: los márgenes con frecuencia se solapan en un corto recorrido, donde son frecuentes los desmosomas. Las células endoteliales parecen estar adheridas al tejido subyacente por finas prolongaciones citoplasmáticas. Los elementos incluidos en el espacio cerrado por las células endoteliales, son células de Leydig y fibroblastos o macrófagos ocasionales. De nuevo las fibras colágenas se suelen agrupar en haces y los capilares peritubulares discurren por este intersticio cubierto, generalmente en dirección perpendicular al eje del túbulo -como ya habíamos indicado-. No es frecuente encontrar vasos de mayor calibre en estas zonas. (Figura nº 18).

El tejido intersticial, no solamente rodea a cada túbulo, sino que también forma una lámina in-

mediatamente por debajo de la túnica albugínea, rodeando a los túbulos más externos. Este intersticio subtunical se continúa directamente con el intersticio peritubular, y forma una lámina externa de tejido que engloba a todos los túbulos, como una formación en saco, cubierto por una lámina endotelial continua, como la del tejido intersticial peritubular, que se enfrenta a la túnica albugínea. Esta continuidad sólo se ve interrumpida en pequeñas zonas, donde grupos de macrófagos, situados en ligeras depresiones, aparecen salpicados por la superficie externa. Los vasos sanguíneos de mayor calibre discurren a través de este intersticio subtunical y quedan dentro del tejido intersticial a medida que se ramifican entre los túbulos.

Entre las láminas endoteliales de la lámina propia de los túbulos seminíferos y las que rodean al tejido intersticial, se delimita un espacio linfático que rodea completamente, y de forma individual, a cada túbulo seminífero, formando un "sinusoide linfático peritubular". Estos sinusoides comunican libremente con el "espacio linfático subtunical", a través de las fenestraciones del tejido intersticial, formando un "espacio linfático testicular", aparentemente sin dividir por tabique alguno. Las sustancias procedentes del plasma sanguíneo y de las células de Leydig tendrían primero que entrar a formar parte del

líquido extracelular intersticial y pasar al líquido linfático, antes de acceder a la lámina propia del túbulo, cuyo obstáculo también tendrían que vencer hasta llegar al compartimento basal del túbulo.

#### COMPONENTES CELULARES DEL ESPACIO INTERTUBULAR

##### . CELULA DE LEYDIG

Descrita por Leydig en 1850, los primeros que la estudian en la rata con microscopía electrónica son Wilke y Schendhart (1958).

Esta célula polihédrica parece ser de origen mesenquimatoso y, aunque su precursora más inmediata no haya sido localizada con certeza, se la ha descrito como una célula de naturaleza fibroblástica (Mancini y cols., 1963). Una vez alcanzada la pubertad, se presume que las células precursoras pueden aún madurar, pero nunca se han visto figuras de mitosis, asumiéndose que, una vez alcanzada la madurez sexual, adquiere una condición estable, permaneciendo en relativo equilibrio. (Hooker, 1970).

Se diferencia del resto de los tipos celulares que encontramos en el intersticio por la disposición en grumos periféricos de su cromatina. El citoplasma, generalmente abundante, es den-

so y finamente granular, con tendencia a la aci  
dofilia, probablemente debido a la gran abundan  
cia de R.E.L. (Christensen y Fawcett, 1966, Bur  
gos y cols., 1970, Hooker, 1970 y Clark, 1976),  
que es su característica más sobresaliente, en  
contrándose sus cisternas fuertemente empaqueta  
das en el citoplasma, formando una red de túbu  
los interconectados (Clark, 1976), en la que se  
localizan parte de las enzimas involucradas en  
la síntesis de testosterona (Christensen, 1970,  
Hall, 1970).

El R.E.R., por el contrario, está poco desarro  
llado y, generalmente, se localiza en zonas cer  
canas al núcleo, al igual que el aparato de Gol  
gi que también está moderadamente desarrollado.

Las mitocondrias son también muy abundantes y  
en forma de bastón (Clark, 1976) y sus crestas  
pueden ser laminares (Burgos y cols., 1970),  
aunque lo más frecuente es encontrarlas con con  
figuración tubular, con cuerpos densos intrami  
tocondriales de naturaleza desconocida (Clark,  
1976). En ellas se localizan también parte de  
las enzimas implicadas en la biosíntesis de tes  
tosterona.

Los ribosomas y polirribosomas aparecen disper  
sos en el citoplasma. Contienen además lisoso  
mas, filamentos y varias inclusiones: gotas li-

pídicas (que en la rata son sudanófilas y positivas a las reacciones indicativas de colesterol. -Hooker, 1970-), gránulos de glucógeno, pigmentos, etc.

Poseen, además, un equipo enzimático importante: enzimas hidrolíticas, lipasas, esterases, fosfatasa y varios tipos de enzimas oxidativas.

El contorno de las células de Leydig está erizado de cortas microvellosidades que, en la microscopía electrónica de barrido, las diferencia claramente de los macrófagos. Parece ser que entre ellas se encuentran íntimamente asociadas, habiéndose encontrado en el hombre uniones del tipo nexo. (Nagana y Suzuki, 1976).

#### . FIBROBLASTOS

Forman parte de la población estable mesenquimatosa. En determinadas condiciones, pueden evolucionar hasta formar células de Leydig. Estas pueden, a su vez, entrar en regresión, adoptando de nuevo características de fibroblastos. (Hooker, 1970).

#### . MACROFAGOS

Se suelen encontrar asociados a las células de

Leydig, aunque su citoplasma es mucho más claro, poseen gran cantidad de lisosomas, vacuolas y cuerpos residuales, como corresponde a su capacidad fagocítica, mostrando un contorno con gran cantidad de vesículas de fagocitosis.

## II.- FUNCIONES DEL TESTICULO Y SU REGULACION

Ya indicábamos al principio de esta introducción que el testículo funciona como una glándula exocrina, productora de espermatozoides, y, a la vez, endocrina, localizándose en él la principal fuente de andrógenos en los individuos macho.

Aunque su función exocrina está centrada en el túbulo seminífero y la endocrina en las células de Leydig, ambas funciones están íntimamente relacionadas y, de alguna forma, aquélla depende de ésta.

Así, el concepto actual es que, en la cinética de la espermatogénesis, se dan una serie de hechos que, necesariamente, tienen que estar regulados por mecanismos hormonales: la duración de la espermatogénesis, que es constante para cada especie, así como la duración del ciclo y de cada una de las etapas de la espermiogénesis.

En la regulación de ambas funciones está además implicado el eje hipotálamo-hipofisario, sin que hasta el momento se conozcan todas las substancias implicadas y el mecanismo

de acción de cada una de ellas en este complicadísimo proceso.

A continuación intentaremos sintetizar, de la forma más clara posible, los datos que figuran al respecto en la bibliografía.

#### INTRODUCCION HISTORICA

Hacia el primer tercio de nuestro siglo, se observó que la ablación de la hipófisis ocasionaba atrofia testicular, lo que se demostró posteriormente, de forma inequívoca, gracias a las experiencias de Smith (vease Steinberger, 1971), al observar que la hipofisectomía era capaz de impedir el desarrollo testicular cuando se realizaba en ratas inmaduras, y que este efecto podía evitarse por implantación diaria de tejido hipofisario fresco.

El descubrimiento de la FSH y de la LH dirigió las investigaciones a asignar un papel concreto a cada uno de estos factores gonadotrópicos, estableciéndose el concepto clásico de que la FSH ejerce su control en el túbulo sobre el proceso espermatogénico, mientras que la LH lo hace sobre la función de las células de Leydig. (Greep y cols., 1936). Sin embargo, el hecho de que los andrógenos también podían mantener la espermatogénesis en las ratas hipofisectomizadas (Walsh, 1934), suponía una nota discordante en el modelo de regulación que se había establecido. Además, aunque los andrógenos son capaces de mantener la espermatogénesis, si se administran al poco tiempo de la extracción de la hipófisis, no son capaces de iniciar el proceso des-

pués de que el testículo se ha atrofiado. Otra complicación que se añade es la dificultad de separar las respectivas funciones de la FSH y de la LH.

Cuando se extirpa la hipófisis, el proceso espermatogénico se para a partir del espermatocito I. (Mess, 1952, Nelson, 1952 y Steinberger y Nelson, 1955). Sin embargo, hasta la publicación de los trabajos de Clermont y Leblond (1953) y Clermont y cols. (1959), los aspectos cuantitativos del proceso no se pudieron evaluar de forma adecuada. Además, y aunque la espermatogénesis no se completa, la duración del ciclo se mantiene inalterada. (Clermont y Harvey, 1965). Los efectos de la hipofisectomía empiezan a detectarse muy pronto y a partir del quinto día empiezan a verse células germinales con signos de degeneración. (Russell y Clermont, 1977).

Por otra parte, la terapia sustitutiva con FSH o LH tampoco resuelve el problema de cuál de las dos hormonas es esencial en el proceso espermatogénico y qué parte del proceso regula cada una de ellas. (Mancini y cols. 1969) Algunos experimentos parecen poner de manifiesto la necesidad de las dos hormonas actuando sinérgicamente. (Lostron, 1963, Manson y cols., 1976 y Russell y Clermont, 1977).

Se sabe además que la castración va acompañada de un aumento en las hormonas gonadotrópicas, y la relación entre el fallo de la función testicular y los niveles de excreción de gonadotropinas también está bien establecida. Así, en el síndrome de Klinefelter, los niveles de gonadotropinas

están aumentados (Johnsen, 1964) y, cuando se frena la espermatoogénesis, en la hipófisis tiene lugar una serie de cambios llamados de castración, que se acompañan de un aumento de gonadotropinas. (Johnsen, 1970). Esto significa que la influencia entre las hormonas producidas por la hipófisis y las testiculares, es recíproca (mecanismo "feedback").

#### LAS HORMONAS GONADOTROPAS Y EL EJE TESTICULO-HIPOFISARIO.

Si las células de Leydig se incuban con LH marcada con  $^{125}\text{I}$ , la hormona aparecerá en el citoplasma (De Kretser y cols., 1971, Davies, 1979), lo que parece probar la existencia de receptores para la LH a ese nivel, actuando, pues, esta hormona sobre la célula de Leydig.

A la misma conclusión llegaron Castro y cols. (1972) con la utilización de técnicas inmunohistológicas, añadiendo que, también la FSH actúa sobre la célula de Sertoli. Efectivamente, en la célula de Leydig se detectan receptores específicos para la LH, cuya concentración vendría, a su vez, regulada por los niveles de gonadotropinas. (Hsueh y cols., 1976). La LH sería responsable de regular la biosíntesis de testosterona por la célula de Leydig (Feldman y Bloch, 1978 y Cigorruga y cols., 1978). La unión de la LH a los receptores de membrana, induce la activación de la adenil ciclasa, con aumento del AMPc intracelular, lo que llevaría a la activación de proteinquinasas, y a la subsiguiente fosforilación de proteínas, síntesis de RNA y de proteínas y, últimamente, a la biosíntesis de esteroides.

La LH actúa además como una hormona de función trófica sobre el desarrollo y mantenimiento de la célula de Leydig. (Cigorruga y cols., 1978).

También en la célula de Sertoli existen receptores específicos para la FSH que, al unirse a la hormona, estimularían la producción de AMPc a través de una proteína-kinasa. (Fakunding y Means, 1977). Ello, a su vez, induciría la síntesis de una proteína: la ABP (Fakunding y cols., 1976), con afinidad por los andrógenos, a los que se unen de forma específica, potenciando su acción. La hipofisectomía acarrearía una disminución de los niveles de ABP (Tindall y cols., 1977) y la terapia de sustitución, tanto con FSH, como con testosterona, sería capaz de estimular de nuevo la producción de ABP en ratas hipofisectomizadas. (Kotite y cols., 1978). Además, la capacidad de la testosterona para mantener la espermatogénesis en animales hipofisectomizados, ha sido confirmada por numerosos investigadores, a pesar de que, en condiciones normales, ésta, administrada en grandes dosis, produce la atrofia del epitelio seminífero. (Moore y Price, 1932 y Zamorano y cols., 1977 a y b), debido, al parecer, a la supresión de las gonadotropinas.

#### EJE HIPOTALAMO-HIPOFISARIO

La secreción y síntesis de FSH y LH por la hipófisis están reguladas a su vez por la Gn-RH, hormona hipotalámica que llega hasta la hipófisis a través del sistema porta hipotalamo-hipofisario, con mayor influencia sobre la LH, pero que también actúa sobre la FSH, aunque no se ha excluido

totalmente la posibilidad de que exista otra hormona hipotalámica, con acción única sobre la FSH. La GnRH es un decapeptido que parece actuar de forma selectiva gracias a la existencia de receptores específicos en la membrana de las células gonadotropas de la hipófisis, con una interacción de tipo competitivo, habiéndose propuesto el AMPc como intermediario. (Para más detalles, consúltese Treguerres y Oriol Bosch, en prensa).

## ESTEROIDOGENESIS

### 1.- LA CELULA DE LEYDIG

Desde principios de siglo, se tenía conocimiento de que las células responsables de la síntesis de andrógenos eran las células de Leydig. (Bouin y Ancel, 1903). Esta idea se confirmaba por el hecho de que los animales criptorquídicos, -en los que el tejido intertubular se conservaba bien desarrollado-, podían presentar caracteres sexuales masculinos, a pesar de su falta de espermatogénesis. Además algunos tumores de células de Leydig se acompañan de pubertad precoz y de niveles altos de cetosteroides.

Parece ser, por otra parte, que las células de Leydig también son capaces de sintetizar estrógenos. (Véase más adelante).

La testosterona y el estradiol, como todos los esteroides, se sintetizan a partir del colesterol. No se sabe

todavía si el testículo es capaz de sintetizar su propio colesterol a partir de acetato, o bien lo toma de la sangre. Tampoco se sabe con certeza cuál es la vía principal de biosíntesis de testosterona, si a través de progesterona, 17-OH-pregnenolona, o bien a partir de compuestos  $\Delta^5$  sulfatados. En las mitocondrias de las células de Leydig se encuentran las enzimas implicadas en el clivaje de la cadena lateral del colesterol, y en el R.E.L., el resto de las enzimas necesarias para la síntesis de testosterona. Existe, por otra parte, una correlación lineal entre la cantidad de R.E.L. de la célula de Leydig y los niveles de testosterona (Zirkin y cols., 1980), y se ha podido aislar testosterona a partir de cultivos de células de Leydig estimulados con HCG. (Hooker, 1970).

La testosterona producida en el intersticio es necesaria para el desarrollo de una espermatogénesis normal en los túbulos, donde será transformada a DHT, que es su forma activa.

Las células de Leydig poseen receptores de membrana específicos para la LH, lo que permite la acción reguladora de esta hormona hipofisaria sobre el proceso de biosíntesis de testosterona. Este control se ejerce a través del AMPc. Además, parece ser que, tanto la FSH, como la PRL, son capaces de estimular a las células de Leydig directamente o, al menos, de incrementar su respuesta a la LH. (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

## 2.- LA CELULA DE SERTOLI

Sus características estructurales y su R.E.L., particularmente abundante, indican que podría tratarse de células productoras de hormonas. (Fawcett, 1975 y Flickinger, 1967). Aunque aparentemente son incapaces de sintetizar de novo gran cantidad de esteroides, sí está comprobado que en ellas se realiza la interconversión de unos esteroides en otros. Por ejemplo, de progesterona y androstenediona a testosterona y dihidrotestosterona (Steinberger y Steinberger, 1977, y Welsh y Wiebe, 1975), y de andrógenos a estrógenos (De Jong, 1974, Dorrington y Armstrong, 1975, Dorrington y Fritz, 1975 y Dorrington y cols., 1978). (Cf. el capítulo siguiente).

Para retener y captar la testosterona, la célula de Sertoli cuenta con receptores androgénicos altamente específicos, uno citoplásmico y otro nuclear. Tanto la célula de Sertoli, como los espermatozoides, son capaces de reducir la testosterona a DHT por acción de la 5- $\alpha$ -reductasa. En la célula de Sertoli, además, tiene lugar una conversión posterior a 5- $\alpha$ -androsterona, 3- $\beta$  y 17- $\beta$ -estradiol. (Dorrington y Fritz, 1975 y Hansson y cols., 1976).

La FSH se une a los receptores de membrana de la célula de Sertoli, activando una adenil-ciclasa, lo que resulta en un aumento del AMPc intracelular, que activará una proteína-kinasa, lo que irá seguido de estimula

ción de la RNA-polimerasa, con síntesis de proteínas (Means, 1977 y Steinberger y Steinberger, 1977).

Una de las proteínas sintetizadas por la célula de Sertoli, bajo el estímulo de la FSH, es la ABP (androgen binding protein o proteína transportadora de andrógenos), que ya mencionamos anteriormente, y a la cual debe su capacidad la célula de Sertoli de acumular andrógenos. (Hansson, 1973). La ABP tiene alta afinidad por la testosterona y por la DHT, por lo que es la responsable de su concentración en el túbulo, haciéndolas así accesibles a las células germinales. Se acepta que en la regulación de ABP están implicadas, tanto la FSH (Hansson, 1973), como la testosterona (Weddington y cols., 1975, Louis y Fritz, 1979), aunque parece como si la testosterona por sí sola estabilizara su actividad. (Tindall y cols., 1978). Esto parece confirmado por el hecho de que la hipofisectomía produce un descenso en los niveles de ABP y que el tratamiento con testosterona devuelve dichos niveles a la normalidad. (Aumüller y cols., 1978). Además, parece que la concentración de ABP está en relación directa con la cantidad de células de Leydig existente. (Lee, 1980).

Otra de las sustancias implicadas en la regulación de la función del testículo, también producida por la célula de Sertoli, es la llamada inhibina. En pacientes con oligospermia o azoospermia se había visto que la aplasia de células germinales se acompañaba de niveles altos de FSH. Una explicación podría ser que su

respuesta a la GnRH estuviera alterada, o bien que, en estos casos, la FSH no fuese utilizada. Sin embargo, también podría ocurrir que se debiera a la falta de una sustancia inhibidora que, en condiciones normales, sería elaborada por las células germinales: la inhibina.

McCullagh (1932), postula la existencia de una proteína hidrosoluble capaz de regular la producción de FSH por un mecanismo de feed-back negativo, habiéndose acumulado con posterioridad una serie de pruebas, más o menos indirectas, de su existencia. Luggaro (1974), aísla un factor peptídico de la cabeza de los espermatozoides que inhibe a la FSH, sin afectar a la LH. Franchimont (1975), extrae del plasma seminal del toro una fracción proteínica capaz de disminuir la respuesta de la FSH a la GnRH. Steinberger y Steinberger (1976), comparan la producción de FSH por cultivos de células de pituitaria sin y con células de Sertoli, aislando del medio de estas últimas una macromolécula termolábil, que inhibe la producción de FSH. Main y cols. (1978), comparando los niveles de FSH después de la castración y después de la interrupción de la espermatogénesis por varios métodos, llegan a la conclusión de que únicamente los andrógenos testiculares no pueden ser los responsables de la inhibición que se observa.

Una opinión parecida tienen Hermans (1980) y Scott y Burger (1981).

Sin embargo, la naturaleza precisa de la inhibina y su mecanismo de acción siguen siendo tema de controversia. Algunos autores propugnan la posibilidad de que la inhibina sea de naturaleza estrogénica o, incluso, que la propia testosterona sea la única responsable del control de la FSH, sin la necesidad de la concurrencia de otra substancia. (Decker y cols., 1981).

Los mecanismos fundamentales de regulación entre las gonadotropinas y la GNRH y los productos de secreción testicular, siguen el principio de la retroalimentación negativa. Cuando bajan los niveles de testosterona, disminuye su efecto inhibitorio sobre el hipotálamo y se aumenta la secreción de GnRH que, a su vez, es timula las gonadotropinas. La LH aumentada producirá una elevación de los niveles de testosterona, y al revés. (Figura nº 19).

Pero este esquema propuesto no es tan sencillo, ya que el estradiol, que también se secreta a nivel testicular, desarrolla un papel regulador sobre las gonadotropinas. Si administramos testosterona o estradiol exógenamente, observamos que este último presenta mayor capacidad de frenación sobre la adenohipófisis. Por otra parte, sabemos que la testosterona puede ser aromatizada a estradiol en diferentes áreas hipotalámicas, por lo que ésta podría ser la vía de actuación en el mecanismo de retroalimentación. Sin embargo, la DHT no tiene acción inhibitoria sobre las gonadotropinas.

Existen además otra serie de factores, menos estudiados, que también intervienen en la regulación de las funciones del testículo. Así, por ejemplo, se sabe que las prostaglandinas estimulan la LH, a través de la GnRH. La PRL parece actuar también como inhibidor de la secreción de testosterona, probablemente a través de las gonadotropinas (Hafiez y cols., 1972). Además, hay que tener en cuenta a la glándula pineal, que actúa inhibiendo las gónadas, probablemente a través del hipotálamo. (Alonso y cols., 1978, Turek, 1979).

### III.- LOS ESTROGENOS TESTICULARES

Desde que Laqueur (1927) detecta por primera vez la presencia de estrógenos en el testículo de rata, se han llevado a cabo numerosos estudios para intentar dilucidar el lugar exacto de su producción y su significación funcional. Sin embargo, por el momento, no se ha podido establecer de forma cierta cuál es la célula a la que está encomendada su síntesis, ni el lugar donde actúan, ni cuál es su mecanismo de acción, ni cómo intervienen en la regulación del complejo proceso de la espermatogénesis.

En el mismo año, Laqueur y cols. detectan actividad estrogénica en la orina del hombre y Zondek (1934), en la del caballo. En 1938 Dingemans y cols. consiguen aislar, a partir de la orina del hombre, el primer estrógeno: la estrona, presente en cantidades re

lativamente importantes en la orina de todos los machos de los mamíferos. En 1940, Beall, mide la concentración de estradiol existente en testículo de caballo y Levin (1945), confirma la existencia de actividad estrogénica en la orina del mismo.

Dado que la testosterona en la periferia es metabolizada a estrógenos y que, además, éstos son producidos por la cápsula adrenal, algunos autores pusieron en duda, durante mucho tiempo, la producción de estas hormonas por el testículo.

Sin embargo, la síntesis de estrona y estradiol por el testículo queda demostrada, sin lugar a dudas, a partir de la comparación de la concentración de ambos estrógenos en sangre periférica y en la vena testicular (Kelch y cols., 1972 y de Jong y cols., 1973).

### III.1. ORIGEN CELULAR DEL ESTRADIOL TESTICULAR

A partir de la fracción microsomal de homogeneizados de testículo, ha sido posible aislar y caracterizar el sistema enzimático (19-hidroxilasa y aromatasa) implicado en la aromatización de andrógenos a estrógenos, así como el citocromo P-450, también involucrado en dicha aromatización. (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos realizados, se desconoce con exactitud cuál es la célula en donde se localiza la síntesis de los estrogénos testic

culares.

Desde los primeros momentos, Zuckerman y McKeawn (1938) y Teilum (1949), dado que los tumores de células de Sertoli conllevan una feminización de su portador, sugieren que es dicha célula la responsable de su producción. Esta sugerencia venía, además, apoyada por el hecho de que los tumores de células de Sertoli contienen gran cantidad de substancias estrogénicas (Huggins y Moulder, 1945. y Berthrong y cols., 1949).

Sin embargo, Hunt y Budd (1939), mantienen que la producción de estrógenos testiculares corre a cargo de la célula de Leydig (los individuos portadores de tumores de esta estirpe celular también sufren un proceso de feminización), lo que, por otra parte, está de acuerdo con las observaciones de Maddock y Nelson (1952) de que las células de Leydig parecen estimuladas por la HCG, mientras que el epitelio germinal y las células de Sertoli sufren cambios degenerativos, lo que se acompaña de un aumento de excreción de estrógenos por orina.

La disociación y separación de los túbulos del tejido intersticial tampoco ha despejado la incógnita. Así, mientras De Jong y cols. (1973, 1974) mantienen que las concentraciones de estradiol en el tejido intersticial del testículo

de rata son mucho menores que en los túbulos se miníferos, Payne y Kelch (1975) sostienen que el lugar principal de síntesis de estradiol, tanto en el testículo de la rata, como en el del hombre, es el tejido intersticial.

En los últimos años, la aplicación de nuevas técnicas de cultivo de células, desarrolladas por Welsh y Wiebe (1974) y Dorrington y Fritz (1975), han arrojado alguna luz sobre el tema, pero los nuevos datos aportados también han con tribuido a aumentar la confusión existente.

Mientras que Dorrington y Armstrong (1975) afirman que las células de Sertoli in vitro son capaces de sintetizar estrógenos, en cantidades apreciables, a partir de un sustrato de testosterona, y que esta síntesis se estimula de forma significativa si se añade FSH al medio (lo que concuerda con las observaciones de Kaya y Harrison, 1975, Fawcett, 1975 y Dym, 1977 b), Canick y cols. (1979) y Valladares y Payne (1979), han detectado alta actividad aromatasa en fracciones de células intersticiales de ratas adultas incubadas con testosterona. Esta actividad aromatasa responde de forma positiva al estímulo con LH y no cuando el estímulo se pretende inducir con FSH, lo que situaría la actividad aromatasa en la célula de Leydig, y regulada por la LH.

La controversia existente, lleva a Van der Molen y cols. (1981) a medir los niveles de estradiol en cultivos de células de Sertoli, células de Leydig, células germinales, células mioideas y células hepáticas por separado, utilizando para ello distintas técnicas. De los resultados obtenidos se desprende que la producción de estrógenos parece ocurrir, tanto en las células de Leydig, como en las de Sertoli, dependiendo de la etapa de desarrollo en que se encuentre el testículo el que se segregue por una u otra célula. Estos resultados están de acuerdo con los de Dorrington y cols. (1978), según los cuales, las células de Sertoli de testículos inmaduros, son mucho más activas que las procedentes de testículos maduros, mientras que las células de Leydig se hacen más activas con el desarrollo. Sin embargo, estos hallazgos hay que interpretarlos con precaución, dado que ninguna de las preparaciones celulares era pura, y que la secreción de estradiol viene también afectada por las condiciones de cultivo.

### III.2. SIGNIFICACION FUNCIONAL DE LOS ESTROGENOS EN EL TESTICULO.

Uno de los métodos de trabajo que se ha seguido para intentar descubrir cuál es la significación biológica de la presencia de estrógenos en el testículo, ha sido someter a los animales de ex

perimentación a diversas pautas de tratamiento estrogénico, y estudiar, posteriormente, sus efectos, tanto a nivel hormonal, como a nivel morfológico, intentando correlacionar los resultados obtenidos con los datos que se conocen acerca de la estructura y/o función de los elementos estudiados a partir de otras investigaciones.

### III.2.1. INTERACCION DE LOS ESTROGENOS CON OTRAS HORMONAS IMPLICADAS EN LA REGULACION DE LA FUNCION DEL TESTICULO.

Con respecto a los efectos que el tratamiento con estrógenos ocasiona en la síntesis y liberación de otras hormonas y las interrelaciones que entre ellas se establecen, existe un verdadero aluvión de artículos en la bibliografía, sin que por ello se tenga hasta el momento una idea exacta de cómo se regulan las funciones endocrina y exocrina del testículo, y de cuál es el papel que en esa regulación desempeñan los estrógenos.

Desde los trabajos de Moore y Price (1932), se conoce el efecto inhibitor que sobre la función testicular tienen las hormonas estrogénicas. Numerosos investigadores han confirmado estas observaciones desde entonces, pero las explicaciones que se han dado del mecanismo por el cual

tendría lugar dicha inhibición, han sido contra  
dictorias. Así, a partir de los resultados obte  
nidos en experimentos realizados tanto in vivo,  
como in vitro, algunos autores propugnan que los  
efectos inhibidores de los estrógenos sobre la  
función del testículo se deben a su acción so-  
bre la hipófisis, inhibiendo la liberación de  
gonadotropinas (mecanismo de acción indirecta),  
mientras que otros han puesto de manifiesto su  
acción directa sobre el testículo (mecanismo de  
acción directa).

Acción de los estrógenos sobre la hipófisis an-  
terior. Mecanismo de acción indirecta.

Huggins y Hodges. (1941) y Huggins y cols. (1941),  
en el tratamiento del cáncer de próstata con es  
trógenos, encuentran que éstos deprimen las cé-  
lulas intersticiales. Los mismos resultados ob-  
tienen Albert (1961) y Segal (1964).

Desde el principio se pensó que la inhibición  
se ejercería de forma indirecta, a través de la  
inhibición de la secreción de gonadotropinas  
por la hipófisis. Esta hipótesis concuerda con  
los resultados de los experimentos de Greep y  
Jones (1950), quienes empleando un tratamiento  
sustitutivo en ratas hipofisectomizadas, con ex  
tractos de hipófisis de ratas sin tratar y de  
ratas tratadas con estrógenos, encuentran que,

mientras el tratamiento surte efecto en el primer grupo, no ocurre así en el segundo.

En 1952, Lynch, trata ratas macho adultas con benzoato de estradiol durante 25 días y comprueba la disminución de peso que ocurre en el testículo, sin que estudie ningún otro aspecto.

Fue Greep (1960), quien comprobó que la atrofia testicular ocasionada por el tratamiento estrogénico, se acompaña de una disminución en las gonadotropinas pituitarias, lo que se confirma posteriormente con los trabajos de Swerdloff y Odell (1968), y los de Peterson y cols. (1969), quienes encuentran una supresión de gonadotropinas en plasma después del tratamiento con estrógenos en grandes dosis. Los resultados de estos autores también coinciden con los de Debeljuk y cols. (1972) y de Kulin y Reiter (1972).

En la misma línea están los hallazgos de Gay y Bogdanove (1969), Vernon y Dever (1971) y Walsh y cols. (1973): el tratamiento de ratas hipofisectomizadas con benzoato de estradiol, previene el aumento postcastración de la LH y de la FSH en plasma. Igualmente, Swerdloff y Walsh. (1973), tratando con estrógenos ratas macho previamente castradas, comprobaban una disminución en plasma de la LH, así como de la FSH, sin que se altere el contenido de ninguna de las dos

hormonas en la hipófisis.

Sin embargo, los experimentos de Steinberger (1973), Danutra y cols. (1973) y Chowdhury y cols., 1974, indican que la supresión de testosterona plasmática y testicular es previa al descenso de LH, lo que parecería abogar por un efecto directo de los estrógenos en testículo.

En contra ello se manifiestan, no obstante, diversos autores (Verjans y cols., 1974, de Jong y cols., 1975, Chowdhury y cols., 1980), quienes, en general, observan que el descenso de testosterona y LH se producen de forma simultánea. También este planteamiento ha sido contestado por Grotjan y cols. (1978) y Kalla y cols. (1980), al encontrar un claro descenso de la LH, sugiriendo que, quizás, el motivo por el que algunos autores indican lo contrario sea que se haya medido como LH la subunidad alfa común con otras hormonas glicoproteicas de la hipófisis.

Por otra parte, Stumpf (1971), inyecta  $^3\text{H}-17-\beta$ -estradiol y detecta radioactividad en núcleos de células de la pituitaria anterior, sugiriendo que quizás actúe sobre el genoma de éstas, induciendo la síntesis de un mensajero que ejerza un "feed-back" negativo sobre los esteroides gonadales. Además, Verjans y cols. (1974 b)

estudian la acción de varios esteroides y encuentran que el estradiol es el más potente de todos ellos como inhibidor de gonadotropinas, siendo necesarias dosis mucho mayores para la supresión de la FSH que para la de la LH, y Van Beurden y cols. (1978) comprueban que la administración de LH puede contrarrestar el efecto inhibidor del estradiol sobre la testosterona, de donde se desprende que la inhibición viene mediada por la pituitaria anterior.

Recientemente, van der Molen y cols. (1981) han encontrado que, aunque los niveles plasmáticos de estrógenos en sangre sean diez veces superiores a los niveles fisiológicos, las concentraciones de LH y FSH no se ven alteradas. Es decir, en condiciones fisiológicas, no parece que los estrógenos sean capaces de ejercer su efecto inhibidor.

#### Acción intratesticular de los estrógenos.

Slaunwhite y cols. (1962), encuentran que en los testículos de animales tratados con estrógenos, la capacidad de síntesis de testosterona está disminuida y Samuels y cols, 1964, indican que los efectos de los estrógenos sobre el testículo se explican por su acción directa sobre el mismo.

En los años siguientes, comienza a comprobarse

la inhibición que los estrógenos ejercen sobre determinadas enzimas implicadas en la esteroidogénesis (Goslar y cols., 1966, Baugt y cols., 1967, Oshima y cols., 1967; Kaur y Mangat, 1980).

Samuels (1969), Danutra y cols. (1972) y Yanahira (1972), demuestran la acción ejercida por los estrógenos directamente sobre el testículo, y propugnan como mecanismo la inhibición de las enzimas implicadas en la esteroidogénesis, por interferencia a nivel de su síntesis.

Por otra parte, y como ya indicábamos anteriormente, se ha comprobado por varios autores que la supresión de la testosterona plasmática y la testicular se produce de forma previa al descenso de los niveles de LH en plasma, lo que parece confirmado por experimentos in vitro en cultivo de células de Leydig al que se añade estradiol (Sholiton y cols., 1975), y por los experimentos realizados, tanto in vivo como in vitro, por Saez y cols. (1978): los niveles de testosterona descienden a las dos horas del tratamiento con benzoato de estradiol, cuando todavía el descenso de LH no es significativo. Hallazgos semejantes se han encontrado en hombres tratados con estrógenos (Jones y cols., 1978).

Otro aspecto que confirma la teoría del mecanismo de acción directa de los estrógenos sobre el

testículo de los estrógenos, es el hecho de la localización de receptores para el estradiol en las células de Leydig. Stumpf (1969), utilizando técnicas de autorradiografía, encuentra radioactividad en los núcleos de las células de Leydig inmaduras, después de la administración in vivo de estradiol radioactivo. También Brinkmann (1972), Mulder y cols. (1973), Kato (1974) y de Boer y cols. (1976), encuentran un receptor específico del estradiol, tanto en la fracción nuclear, como en el citosol del tejido intersticial, mientras que no son capaces de localizarlo en el túbulo seminífero, encontrando, además, que existe una traslocación del receptor del citoplasma al núcleo, al igual que ocurre en el caso de otras hormonas esteroideas. Asimismo, se ha encontrado un receptor para el estradiol en tumores de células de Leydig. (Sato, 1981).

Kalla (1980), Kaur y Mangat (1980), Chowdhury (1981) y Leinonen y cols. (1981), encuentran una disminución de las enzimas implicadas en la esteroidogénesis en las células de Leydig, como consecuencia del tratamiento con estradiol, lo que supone una disminución de la síntesis de testosterona, con un aumento paralelo de la pregnenolona, por bloqueo de dicha ruta a ese nivel.

Van der Molen y cols, 1981, concluyen que, como la ac

tividad aromatasa está también localizada en la célula de Leydig (Valladares y Payne, 1979), el estradiol puede actuar como regulador intracelular. Por otra parte, parece claro que los estrógenos pueden actuar sobre la célula de Leydig como reguladores locales de la respuesta a la LH, de tal forma que el estradiol inhibiría la acción de la LH sobre la célula de Leydig. (Hansson y cols., 1976).

Posible mecanismo de acción de los estrógenos a través de la PRL.

Recientemente, se ha sugerido un nuevo mecanismo de acción de los estrógenos sobre el eje hipotálamo-hipófiso-testicular a través de la PRL (Tresguerres y cols., 1981), basado en que:

- La administración de estrógenos produce un marcado incremento en los niveles plasmáticos de PRL. (Yamamoto y cols., 1975).
- La hiperprolactinemia ejerce una acción inhibitoria sobre el testículo. (Fang y cols., 1974).
- Si junto con el benzoato de estradiol se administra bromocriptina, no se elevan los niveles de PRL, y se recupera parcialmente la respuesta de la testosterona al estímulo con HCG. (Tresguerres y cols., 1981).

Es decir, es posible que la presunta acción negativa directa del estradiol sobre las células de Leydig, pueda estar mediada por la PRL.

### III.2.2. EXPRESION MORFOLOGICA DE LA INHIBICION DEL TESTICULO POR LA PRESENCIA DE NIVELES ELEVADOS DE ESTROGENOS.

A pesar de los esfuerzos realizados, aún no se conoce con exactitud la regulación hormonal de la espermatogénesis y el papel que desempeñan las gonadotropinas y las hormonas esteroideas en el mantenimiento de las distintas líneas celulares del testículo. (Steinberger y cols., 1970, Steinberger, 1971, Hansson y cols., 1976, Mann y Lutwak-Mann, 1981).

Varios autores han utilizado la supresión de la función del testículo con estrógenos para estudiar aspectos parciales de la espermatogénesis, pero han sido relativamente pocos los que han hecho un estudio detallado de los cambios producidos a nivel morfológico. Así, la mayor parte de los autores se limitan a constatar la disminución del tamaño del testículo en los animales de experimentación tratados con estrógenos, así como la inhibición de la espermatogénesis. Son pocos los casos en los que se hace un estudio histológico más detallado y escasísimos los trabajos recogidos en la biblio-

grafía en los que se aplica el microscopio electrónico para la descripción de los cambios ultraestructurales ocurridos como consecuencia del tratamiento estrogénico. Esto, unido a la gran diversidad de hormonas estrogénicas utilizadas, de pautas de tratamiento y de los momentos del desarrollo elegidos para su aplicación, hace que los datos de que disponemos resulten inconexos.

Ya desde 1932, y gracias a los trabajos de Moore y Price, se había demostrado que la administración de estrógenos ocasionaba una supresión de la espermatogénesis, lo que se suponía debido a su efecto inhibitor sobre las gonadotropinas pituitarias.

Los trabajos de Matthews y cols. (1942), tratando a ratas macho adultas con estilbestrol, durante 58 días, confirman la inhibición de la espermatogénesis en estos animales, añadiendo el dato de que esta inhibición se corresponde con una disminución del tamaño testicular, indicando que las alteraciones producidas eran reversibles.

Lynch (1952), utilizando benzoato de estradiol, confirma que el tratamiento crónico de ratas macho adultas con estrógenos, provoca una disminución del peso testicular que es reversible, pe-

ro no entra en el estudio histológico de los efectos producidos.

Los trabajos de Greep y Jones (1950), daban un soporte experimental que confirmaba la idea que se tenía de que la inhibición del testículo por los estrógenos se producía a través de la inhibición de las gonadotropinas pituitarias. Esta teoría cobra más fuerza cuando Greep (1961), de muestra que la atrofia producida en el testículo por el tratamiento estrogénico, se acompaña de una disminución en las gonadotropinas pituitarias.

Durante las décadas de los años 60 y 70, parece que la atención se centra principalmente en el efecto que los estrógenos producen sobre el desarrollo y maduración del testículo. En la mayor parte de los casos, el método que se sigue es el del tratamiento con una dosis única a ratas recién nacidas, o a la madre gestante. Las primeras descripciones de las alteraciones producidas en estas condiciones (Kincl y cols., 1963), se limitan a indicar que se produce una inhibición de la espermatogénesis, con disminución del diámetro de los túbulos seminíferos y aparición de células germinales inmaduras en la luz de los mismos, dificultándose, además, el descenso del testículo, por lo que son frecuentes las criptorquideas. Según estos autores, di

chas alteraciones son reversibles y, si el tratamiento se instaura a los 10 ó 20 días del nacimiento, no se produce alteración alguna.

Jean (1961), indica que en las ratas macho nacidas de madres tratadas durante la gestación con una dosis única de estrógenos, se producen criptorquideas con mucha frecuencia, disminuye el peso testicular y el diámetro de los túbulos seminíferos, las células de la línea germinal no sobrepasan el estadio de espermatida en su proceso de maduración y es frecuente la presencia de células multinucleadas que parecen proceder de la unión de células germinales degeneradas. Describe también la aparición de algunos túbulos donde sólo quedan células de Sertoli y, a veces, algunas espermatogonias, mientras que en el intersticio las células de Leydig aparecen pequeñas y con el citoplasma escaso, en algunas ocasiones, y en otras se hallan hiperplásicas. De cualquier forma, se hace difícil el separar los efectos producidos directamente por los estrógenos o por la criptorquidea.

El mismo autor, en un trabajo posterior (Jean, 1973), indica que es posible que la disminución del volumen testicular en animales nacidos de madres tratadas con una dosis de estrógenos, no sea valorable como tal, dado que existe una disminución general en el volumen corporal propor-

cional a la sufrida por el testículo. Los trabajos de Jean-Faucher y cols. (1976), tratando a ratas macho recién nacidas con dipropionato de estradiol, confirman estos últimos datos, añadiendo que, en estos animales, existe una disminución de la testosterona, probablemente debida a la alteración de las células de Leydig, mientras que la LH plasmática se mantiene dentro de los límites normales. Según estos autores, las alteraciones producidas son irreversibles.

Por otra parte, los tratamientos crónicos aplicados, durante un cierto tiempo, a partir de los primeros días del nacimiento, producen efectos muy parecidos. Maqueo y Kincl (1964), inyectando distintas dosis de benzoato de estradiol a partir de los cinco días de edad de los animales y sacrificándolos desde los 40 a los 60 días, encontraban resultados muy parecidos: túbulos seminíferos de diámetros disminuidos, a veces con sólo células de Sertoli y espermatogonias, disminución del número de las células de Leydig, y membranas basales engrosadas, constatando que, después de 170 días de haber cesado el tratamiento, no habían revertido estas alteraciones. Sin embargo, si el tratamiento se iniciaba a los 10 ó 20 días del nacimiento, los efectos producidos eran mínimos, lo que estaba de acuerdo con los resultados obtenidos en trabajos anteriores. (Kincl y cols., 1963).

Woodruff y Umiker (1960), al tratar ratas adultas con dosis de hasta 250 y 500 $\mu$ g en una única inyección, no encontraban alteración alguna en los túbulos seminíferos, ni en el tejido intersticial, limitándose a constatar la disminución del tamaño del órgano y del número de las células de Leydig, ya descrito por otros autores.

Lacy y Lofts (1965), plantean que, a pesar de estar todos los autores de acuerdo en que los estrógenos causan una disminución del peso testicular y una atrofia de los túbulos seminíferos, no se ha llevado a cabo ningún estudio que intente llegar a establecer la secuencia de cambios que han conducido hasta esta situación. El trabajo de Lacy y Lofts, en el que además se aplica la microscopía electrónica, añade toda una serie de nuevos datos, que completan la información ya existente al respecto, incluida la que ellos mismos publicaran en 1961.

Llegamos así a finales de la década de los sesenta, en que la aplicación diaria en la clínica de tratamiento estrogénico a pacientes con cáncer de próstata, despierta el interés por conocer mejor el mecanismo de acción y los efectos de estas hormonas.

Rodríguez Rigau (1977), encuentra que, en los pacientes sometidos a tratamiento estrogénico

durante largos períodos, la testosterona plasmática y testicular están suprimidas, así como las gonadotropinas plasmáticas. Lu y Steinberger (1978), publican un trabajo en el que se estudia con microscopía óptica y electrónica el testículo de hombres adultos sometidos a tratamiento estrogénico durante más de un año y Payer (1980), publica un estudio ultraestructural comparativo entre las inclusiones de las células de Leydig de pacientes tratados con estrógenos y las de los no tratados.

No obstante, estos últimos trabajos, aunque aportan nuevos datos en cuanto a las alteraciones producidas en el testículo por el tratamiento estrogénico, no establecen la secuencia de acontecimientos que han conducido hasta esa situación, dado que el material que utilizan pertenece a pacientes tratados con fines terapéuticos y las observaciones se realizan cuando ha transcurrido un tiempo relativamente largo.

Mientras tanto, en los trabajos experimentales realizados sobre los efectos causados por los estrógenos, se utilizan animales de experimentación recién nacidos, a los que se trata hasta poco tiempo antes de llegar a la pubertad, estudiando, por tanto, los efectos de los estrógenos sobre el desarrollo. Vitale y cols. (1973) establecen el retraso provocado por los estróge

nos en la formación de la barrera hemato-testicular en la rata. Libbus y Schuetz (1979) observan la prolongación del período de proliferación de las células de Sertoli provocada por el tratamiento crónico con dipropionato de estradiol de ratas recién nacidas, dato confirmado por los mismos autores en un trabajo posterior (Libbus y Schuetz, 1980). En este trabajo se indica que el efecto inhibitor de los estrógenos parece que se produce al entrar las células de la línea germinal en la fase S del ciclo celular.

97

PLANTEAMIENTO  
Y  
OBJETIVOS

Como ya expusimos, la producción de estrona y estradiol por el testículo adulto quedó claramente demostrada por los trabajos de Kelch y cols. (1972) y de Jong y cols. (1973). Sin embargo, se desconoce cuál es la función que desempeñan y su mecanismo de acción, aunque sí parece claramente establecida su participación en la regulación de la espermatogénesis. (Steinberger, 1973; Swerdloff y Walsh, 1973; Walsh y cols., 1973; Hansson y cols., 1981 y Mann y Lutwak-Mann, 1981).

Nos proponemos utilizar como método de trabajo el tratamiento con estrógenos de animales de experimentación, en dosis suficiente para elevar la concentración de éstos en plasma por encima de los niveles fisiológicos.

Aunque algunos investigadores han utilizado este método de trabajo, entre los que emplearon animales adultos, prácticamente ninguno de ellos ha aplicado a su estudio la microscopía electrónica. Además empiezan sus observaciones después de períodos de tratamiento largos, describiendo cuál es la situación terminal de las alteraciones producidas, pero no cómo se originan y evolucionan hasta llegar a esa situación final. Desconocemos, por tanto, cuál o cuáles son las células primitivamente afectadas y el mecanismo por el cual se llega hasta la descamación, casi total, del epitelio seminífero.

Así, pues, creemos que el modelo de trabajo propuesto nos puede aportar datos interesantes que contribuyan a dilucidar qué papel desempeñan los estrógenos en la regulación de la función del testículo.

Por otra parte, ciertas patologías tales como la criptorquidea, el síndrome de feminización testicular, el síndrome de Klinefelter y ciertos tumores de células de Leydig y de células de Sertoli, cursan con niveles altos de estrógenos. (Medina y cols. 1980, Damber y Berg, 1980 y Mann y Lutwak-Mann, 1981). Además, según lo descrito en la bibliografía, estas alteraciones presentan imágenes histológicas del testículo muy semejantes a las que aparecen tras un tratamiento crónico con estrógenos (Moore, 1924, Clegg, 1960, 1963 a y b, Jean, 1968, Salle y cols., 1968, Imperato Mc Ginley y cols., 1980). Por todo ello, pensamos que los resultados obtenidos del estudio de animales sometidos a tratamiento estrogénico, pueden resultar útiles para comprender mejor la fisiopatología de estas alteraciones.

Asimismo, el estudiar los efectos producidos por el tratamiento estrogénico, puede resultar de interés, dada su aplicación en clínica humana, en situaciones tales como el cáncer de próstata.

Con la aplicación de este método de trabajo, nos hemos propuesto como OBJETIVOS:

- 1.- Establecer cuáles son las primeras alteraciones producidas en el testículo de rata adulta, como consecuencia del tratamiento crónico con benzoato de estradiol.
- 2.- Establecer la secuencia con que se producen las sucesivas alteraciones, hasta llegar a la situación final de descamación casi total del epitelio seminífero.

- 3.- Conocer cuáles son los tipos celulares principalmente afectados.
- 4.- Aportar datos que ayuden a esclarecer la función que desempeñan los estrógenos en la regulación de la espermatogénesis.

101

**MATERIAL Y METODOS**

#### ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Con el fin de poder correlacionar nuestros resultados con los de otros autores, a la hora de sacar conclusiones, evitando, en lo posible, las diferencias debidas a la utilización de especies distintas, optamos por elegir la rata como animal a utilizar en nuestro experimento, dado que ha sido el más utilizado en el modelo propuesto de inhibición de la función testicular por tratamiento estrogénico. La espermatogénesis en los roedores presenta un grado elevado de regularidad y orden que facilita el análisis sistemático del proceso.

Hemos utilizado ratas de la cepa Wistar, machos, todos ellos de una edad aproximada de 4 meses, y un peso de unos 300 gramos, que tenían acceso libre al agua de bebida y eran alimentadas "ad libitum" con una dieta de composición equilibrada en cuanto a principios inmediatos, sales minerales, vitaminas y oligoelementos, elaborada por Sanders.

#### HORMONA UTILIZADA

De los últimos hallazgos, parece desprenderse que la hormona estrogénica que principalmente interviene en la regulación de la función testicular es el estradiol (Kato, 1974, Jean-Faucher y cols., 1976, Beurden-Lamers, 1977, Lu y Steinberger, 1978, Jones y cols., 1978, Weisenberg y cols., 1979, Kalla y cols., 1980, Kaur Mangat, 1980 y Chowdhury y cols., 1981). Hemos utilizado, por tanto, benzoato de estradiol, químicamente puro, en solución oleosa, suministrado por los laboratorios Schering (Proginon<sup>®</sup> B-ol fuerte).

### DOSIS Y PAUTAS DE TRATAMIENTO

Los animales utilizados en nuestro experimento fueron divididos en tres grupos:

- GRUPO 1: A los animales de este grupo, se les administró una dosis diaria de 250  $\mu\text{g}$ . de benzoato de estradiol, en 0,25 ml. de solución oleosa, por vía intramuscular.

- GRUPO 2: La dosis utilizada en este grupo fue de 50  $\mu\text{g}$ . diarios de benzoato de estradiol, también disueltos en 0,25 ml. de aceite, y por vía intramuscular.

- GRUPO 3: Los animales que formaban este grupo fueron inyectados con 0,25 ml. diarios del aceite disolvente, y se utilizaron como grupo control.

Las dosis fueron elegidas teniendo en cuenta que una única dosis de 500  $\mu\text{g}$ . de benzoato de estradiol, inyectada a una rata adulta macho de la raza Wistar, no había sido capaz de producir alteraciones detectables en los túbulos seminíferos (Woodruff y Umiker, 1960), pero que Lacy y Lofts (1965), sí que encontraban alteraciones importantes un mes después de la implantación de cápsulas de estrógeno, que liberaban del orden de los 430 a 250  $\mu\text{g}$ . de hormona diarios.

No obstante, tras el estudio de los resultados obtenidos con determinaciones hormonales por otros autores que utilizaban dosis mucho menores, decidimos comprobar si estas dosis, más próximas a los niveles fisiológicos, mantenidas en un tratamiento crónico, eran también capaces de producir las mismas alteraciones

nes morfológicas, con lo que descartaríamos la posibilidad de que los resultados obtenidos en el primer grupo, se debieran a intoxicación por utilización de una dosis excesiva. (Sáez y cols., 1978, Grotjan y Steinberger, 1978, Chowdhury y cols., 1981, Leinonen y cols., 1981, Van der Molen y cols., 1981).

Cinco animales de cada uno de los grupos 1 y 2, respectivamente, y dos de los del grupo 3, eran sacrificados a diario a partir del primer día de tratamiento, y hasta el día 35º.

#### TECNICA OPERATORIA

Los animales eran sacrificados aproximadamente a la misma hora (las 10 de la mañana), pasadas unas 24 horas después de haber recibido la última dosis de su tratamiento. Bajo ligera anestesia, por inhalación de éter etílico bajo una campana de vidrio, procedíamos a la exposición del cordón espermático, mediante incisión practicada en la zona caudal de la línea alba, y, por tracción ligera de la cabeza del epidídimo, extraíamos el testículo izquierdo de su posición en el fondo del escroto. Mientras sujetábamos el órgano por la túnica albugínea, por el polo distal, dábamos un corte aproximadamente unos 2 mm. por encima del punto de sujeción. La pieza así obtenida, la lavábamos rápidamente en suero fisiológico tamponado a pH 7,4, y la introducíamos inmediatamente en el fijador utilizado para el estudio con microscopía electrónica, desprendiendo entonces y extrayendo el fragmento de túnica albugínea, para facilitar la difusión del líquido a través del parénquima testicular.

Todas estas operaciones las practicábamos con la mayor rapidez

posible, y desde que el órgano era expuesto, hasta la inmersión de la pieza en el líquido fijador, transcurrían menos de 10 segundos.

A continuación, colocábamos unas pinzas de hemostasia a nivel de la arteria testicular izquierda, y procedíamos de la misma manera a la exposición del testículo derecho, que habíamos de utilizar para el estudio con el microscopio óptico.

Una vez expuesto el órgano en la cavidad abdominal, lo sujetábamos suavemente con dos dedos de la mano enguantada y, liberándolo de sus adherencias con unas tijeras, procedíamos a pesarlo en una balanza de precisión Mettler, mod. H-80. Inmediatamente, y tras rápido lavado en suero fisiológico, lo sumergíamos en el fijador utilizado para el estudio con microscopía óptica. Posteriormente, procedíamos a extraer el epidídimo que, asimismo, tras lavado en suero fisiológico, introducíamos en el fijador, para su estudio con el microscopio óptico.

Después, en los animales de los grupos 2 y 3, y a partir de los cinco días de tratamiento, extraíamos sangre para medir en ella la testosterona circulante. La sangre la obteníamos por punción directa del ventrículo izquierdo, tras la abertura de la cavidad torácica, y la recogíamos en tubos estériles.

#### TECNICAS HISTOLOGICAS: I. MICROSCOPIA OPTICA.

##### 1. FIJACION

Utilizamos como fijador el líquido de Bouin, tamponado a pH

7,4, renovando el líquido a la primera y a la segunda hora. Transcurridas 24 horas, practicábamos una serie de cortes en el órgano y trasladábamos las piezas a una solución de formalina al 10%, para concluir la fijación en tres días más, con cambios de la solución al principio cada 2 ó 3 horas, y luego a diario, para lavar los restos del líquido de Bouin. Todas estas operaciones las practicábamos a la temperatura del laboratorio.

## 2. INCLUSION

Utilizamos una técnica convencional de inclusión en parafina, previa deshidratación de la pieza en alcoholes de concentraciones progresivas.

## 3. OBTENCION DE LOS CORTES

Utilizamos un microtomo tipo Minot, para obtención de cortes seriados. Todos los cortes fueron realizados con 8  $\mu$  de espesor.

## 4. TINCIONES

Una vez desparafinados y rehidratados los cortes, hemos utilizado para su tinción dos técnicas de rutina en el laboratorio:

### 1.- Hematoxilina-eosina.

Hemos usado la hematoxilina de Carazzi, previa sensibilización en alcohol de 96%, y dejándola que actúe durante

te cinco minutos, lavando a continuación con agua abundante varias veces y aplicando después durante unos 20 segundos la eosina de Ehrlich al 1%, para el contraste de los citoplasmas. Efectuábamos un lavado rápido antes de proceder al montaje.

## 2.- P.A.S.

Sometíamos los cortes rehidratados a la acción del ácido periódico al 5% durante 10 minutos, procedíamos a un lavado abundante durante otros 10 minutos y aplicábamos el reactivo de Schiff durante 10 minutos más, cuyo exceso retirábamos después con bisulfito sódico al 20 durante tres minutos. Después de un lavado abundante durante un cuarto de hora, procedíamos al montaje normal de los cortes.

Dado que estas técnicas son de práctica diaria en todos los laboratorios de histología, consideramos innecesario añadir más detalles.

## 5. OBSERVACION CON EL MICROSCOPIO OPTICO

Todas las preparaciones se seleccionaron para obtener las imágenes histológicas más representativas. Hemos utilizado para nuestro trabajo un fotomicroscopio de la casa Leitz, mod. Wetzlar.

También hemos estudiado los cortes semifinos ( $1 \mu$ ) utilizados como cortes control para el estudio con microscopía electrónica .

## II. MICROSCOPIA ELECTRONICA.

### 1. FIJACION

Hemos utilizado como liquido fijador glutaraldehído diluido al 3,5% en buffer Sørensen, a pH 7,4 y a 4° C de temperatura, durante 90 minutos, renovándolo tantas veces como fuera necesario para mantenerlo transparente. Reducido el fragmento a bloques más pequeños (cubos de aproximadamente 1mm. de lado), lavábamos con buffer Sørensen a 4° C hasta el día siguiente, en que procedíamos a una postfijación con ácido ósmico al 2% en buffer Michaelis a 4° C, durante 90 minutos más, y aclarado con buffer Michaelis a pH 7,4 durante 30 minutos, con dos cambios, uno cada 10 minutos.

### 2. DESHIDRATACION

Según un método convencional, por inmersión en acetonas de concentraciones ascendentes, ajustado por Merchán (1974).

### 3. INCLUSION

Como medio de inclusión hemos utilizado la araldita, procediendo según el método de Reynolds (1963), modificado por Merchán (1974).

### 4. OBTENCION DE CORTES SEMIFINOS

Hemos usado el ultramicrotomo LKB Ultramicrotome-III, ajustado

para la obtención de cortes de 1  $\mu$ .

5. TINCION DE CORTES SEMIFINOS

En la tinción de los cortes de control hemos utilizado el azul de toluidina, según el método de Richardson(1960) modificado por Reynolds (1963).

6. OBTENCION DE CORTES ULTRAFINOS

Hemos utilizado el ultramicrotomo ya citado, obteniendo los cortes de la zona previamente seleccionada en los cortes semifinos utilizados como controles.

7. TINCION DE CORTES ULTRAFINOS

Tinción con acetato de uranilo y contraste con citrato de plomo, según Reynolds (1963).

8. OBSERVACION CON EL MICROSCOPIO ELECTRONICO

Hemos utilizado en nuestro estudio el microscopio electrónico JEOL, mod. JEM-100B, operando con 60 u 80 Kv.

METODOS BIOQUIMICOS

DETERMINACION DE TESTOSTERONA EN SANGRE CIRCULANTE. TECNICA DE RADIOINMUNOANALISIS.

De la sangre obtenida de los animales sacrificados, extrae

mos el suero con 10 volúmenes de éter etílico. Sacada una alícuota del extracto, se deja secar. El extracto seco lo diluímos en 0,5 ml. de buffer monofosfato (pH 7,3), que contiene 0,15 M NaCl, 1 m M-EDTA, 0,1% de gelatina y 0.02% de hidróxido sódico. La dilución así obtenida, se incuba a 4° C durante 18 horas con [1,2,6,7,(n)-<sup>3</sup>H]-testosterona, según el método descrito por Main y cols., 1978. La testosterona marcada, se valora posteriormente mediante contador de centelleo líquido ISOCAP mod. 300, con una eficacia de conteaje del 35%.

III

**R E S U L T A D O S**



BIBLIOTECA

### I. EXAMEN MACROSCOPICO.

Abierto el abdomen por la zona más caudal de la línea alba y expuestos los testículos, en los animales del grupo utilizado como control, éstos aparecen ovoideos con un tamaño aproximado de 17x10x10 mm. y un aspecto turgente. Si se practica una incisión en la túnica albugínea, los túbulos seminíferos, empaquetados a tensión en el interior, escapan por el ojal practicado. Sin embargo, en los dos grupos de animales sometidos a tratamiento estrogénico, los testículos experimentan una clara disminución de su tamaño, tanto más acusada cuanto mayor ha sido el número de días que ha durado el tratamiento. Paralela a la disminución del volumen, se aprecia una pérdida de la turgencia del órgano, hasta el punto que si abrimos un ojal en la albugínea, o seccionamos totalmente el órgano, los túbulos seminíferos contenidos no tienden a salir al exterior.

La disminución de volumen lleva aparejada una disminución de peso, tal y como queda expresado en las tablas nº I, II, y III y en las gráficas que las resume de las páginas siguientes.

Días de Tratamiento	Animal nº		Media
	1	2	
1	1,4230	1,3113	1,3671
2	1,2850	1,4321	1,3585
3	1,3542	1,4328	1,3930
4	1,5032	1,3240	1,4136
5	1,3876	1,3754	1,3815
6	1,4502	1,3982	1,4242
7	1,3976	1,4531	1,4253
8	1,4328	1,3920	1,4124
9	1,3282	1,4532	1,3907
10	1,4243	1,3958	1,4100
11	1,4030	1,4043	1,4036
12	1,5041	1,4043	1,4542
13	1,3825	1,4540	1,4142
14	1,3762	1,3982	1,3872
15	1,3402	1,3378	1,3340
16	1,2987	1,4520	1,3753
17	1,3871	1,3390	1,3630
18	1,2850	1,4530	1,3690
19	1,3453	1,4820	1,4126
20	1,4321	1,3987	1,4154
21	1,3876	1,3957	1,3916
22	1,4231	1,4031	1,4131
23	1,3875	1,4231	1,4053
24	1,5160	1,3982	1,4571
25	1,3756	1,4372	1,4064
26	1,3875	1,4132	1,4003
27	1,3965	1,3843	1,3904
28	1,5031	1,2468	1,3749
29	1,4323	1,2486	1,3404
30	1,3752	1,3874	1,3813
31	1,4321	1,5432	1,4876
32	1,3784	1,3852	1,3818
33	1,2934	1,3254	1,3094
34	1,3862	1,3865	1,3963
35	1,4076	1,4233	1,4154

TABLA I

Pesos de los testículos de los animales del grupo 3 (en g.), correspondiente a los animales tratados con 0,25 ml./d de aceite.

Días de tratamiento	Animal n°					Media
	1	2	3	4	5	
1	1,3940	1,3602	1,4236	1,3815	1,4063	1,3931
2	1,3374	1,3843	1,3572	1,4003	1,4192	1,3791
3	1,3801	1,3641	1,3418	1,3264	1,3564	1,3537
4	1,3725	1,3241	1,3664	1,3166	1,3402	1,3439
5	1,3516	1,2932	1,3342	1,3604	1,3003	1,3279
6	1,3356	1,3306	1,3018	1,3009	1,3216	1,3181
7	1,3151	1,2941	1,3098	1,3066	1,2861	1,3023
8	1,2941	1,2692	1,2818	1,3101	1,2672	1,2844
9	1,2643	1,2344	1,2618	1,2733	1,2832	1,2632
10	1,2641	1,2342	1,2501	1,3005	1,2005	1,2498
11	1,1678	1,1782	1,1593	1,1703	1,1640	1,1679
12	0,8921	0,8843	0,8556	0,8934	0,8947	0,8840
13	0,8174	0,8640	0,7538	0,7433	0,8238	0,8004
14	0,8190	0,7578	0,6993	0,6693	0,6548	0,7421
15	0,6998	0,6716	0,6901	0,6644	0,6786	0,6789
16	0,7076	0,6777	0,6616	0,6525	0,6546	0,6707
17	0,6658	0,6214	0,6717	0,6517	0,6412	0,6503
18	0,5362	0,5084	0,5160	0,5561	0,5694	0,5352
19	0,4876	0,5288	0,4950	0,5101	0,4278	0,4793
20	0,4488	0,4618	0,4430	0,5169	0,4308	0,4665
21	0,3926	0,4573	0,4618	0,4079	0,4627	0,4365
22	0,3928	0,4377	0,4596	0,3962	0,4028	0,4178
23	0,3986	0,4365	0,3862	0,3518	0,3964	0,3939
24	0,3265	0,3943	0,3761	0,4297	0,3862	0,3825
25	0,3685	0,3213	0,4018	0,3685	0,3636	0,3646
26	0,3875	0,2963	0,3618	0,3546	0,2865	0,3373
27	0,2796	0,3294	0,3216	0,3448	0,3641	0,3275
28	0,2618	0,2878	0,3683	0,2815	0,3018	0,3001
29	0,2906	0,2823	0,2625	0,2716	0,3276	0,2909
30	0,2410	0,2876	0,3218	0,2515	0,2979	0,2799
31	0,2396	0,2713	0,2875	0,2610	0,2868	0,2692
32	0,2375	0,2664	0,2361	0,2239	0,2439	0,2415
33	0,2075	0,2076	0,2472	0,2315	0,2231	0,2218
34	0,2064	0,2162	0,2318	0,2060	0,2015	0,2123
35	0,2178	0,1993	0,1815	0,2018	0,2210	0,2042

TABLA II

Pesos de los testículos de los animales del grupo 1 (en g.), correspondiente a los animales tratados con 250 µg/d. de b. de estradiol.

Días de tratamiento	Animal nº					Media
	1	2	3	4	5	
1	1.3738	1.3804	1.4432	1.3615	1.3862	1.3928
2	1.3836	1.3728	1.3643	1.3985	1.3892	1.3798
3	1.3793	1.3648	1.3275	1.3413	1.3662	1.3532
4	1.3643	1.3382	1.3793	1.3068	1.3542	1.3471
5	1.3604	1.3002	1.3114	1.3575	1.3042	1.3323
6	1.3457	1.3108	1.3023	1.3107	1.3182	1.3175
7	1.2948	1.3063	1.3104	1.3170	1.2764	1.3009
8	1.2842	1.2578	1.2913	1.3243	1.2685	1.2894
9	1.2923	1.2534	1.2432	1.2518	1.2733	1.2601
10	1.2648	1.2435	1.2445	1.2808	1.2365	1.2584
11	1.1578	1.1893	1.1562	1.1842	1.1603	1.1695
12	0.8793	0.8945	0.8664	0.8794	0.9034	0.8846
13	0.8640	0.8188	0.7533	0.7438	0.8243	0.7048
14	0.7111	0.6910	0.7131	0.7293	0.7598	0.7208
15	0.6893	0.6723	0.6934	0.6604	0.6785	0.6850
16	0.6793	0.6786	0.6934	0.6816	0.6503	0.6832
17	0.6468	0.6413	0.6626	0.6621	0.6423	0.6582
18	0.5367	0.5079	0.5068	0.5625	0.4987	0.5242
19	0.4963	0.4875	0.4692	0.4869	0.5104	0.4900
20	0.4563	0.4475	0.4642	0.4875	0.4616	0.4594
21	0.4132	0.4473	0.4623	0.3985	0.4590	0.4360
22	0.4266	0.4027	0.4395	0.4262	0.3987	0.4187
23	0.4265	0.3893	0.3616	0.3762	0.3864	0.3882
24	0.3940	0.3376	0.3698	0.4196	0.3904	0.3822
25	0.3213	0.3685	0.3213	0.3636	0.4023	0.3554
26	0.3796	0.3064	0.3546	0.3668	0.2923	0.3399
27	0.3284	0.2816	0.3443	0.3219	0.3740	0.3300
28	0.2516	0.2794	0.3690	0.2785	0.3102	0.2977
29	0.2823	0.2906	0.3264	0.2708	0.2625	0.2867
30	0.2982	0.2410	0.3217	0.2515	0.2864	0.2797
31	0.2723	0.2864	0.2406	0.2868	0.2612	0.2694
32	0.2416	0.2652	0.2233	0.2390	0.2431	0.2424
33	0.2302	0.2219	0.2076	0.2463	0.2081	0.2228
34	0.2014	0.2059	0.2047	0.2251	0.2341	0.2142
35	0.1970	0.2032	0.2003	0.1986	0.2230	0.2044

TABLA III

Pesos de los testículos de los animales del grupo 2 (en g.) correspondiente a los animales tratados con 50 µg/d. de b. de estradiol.

Estas tablas, las podremos interpretar mejor traducidas a los siguientes diagramas:

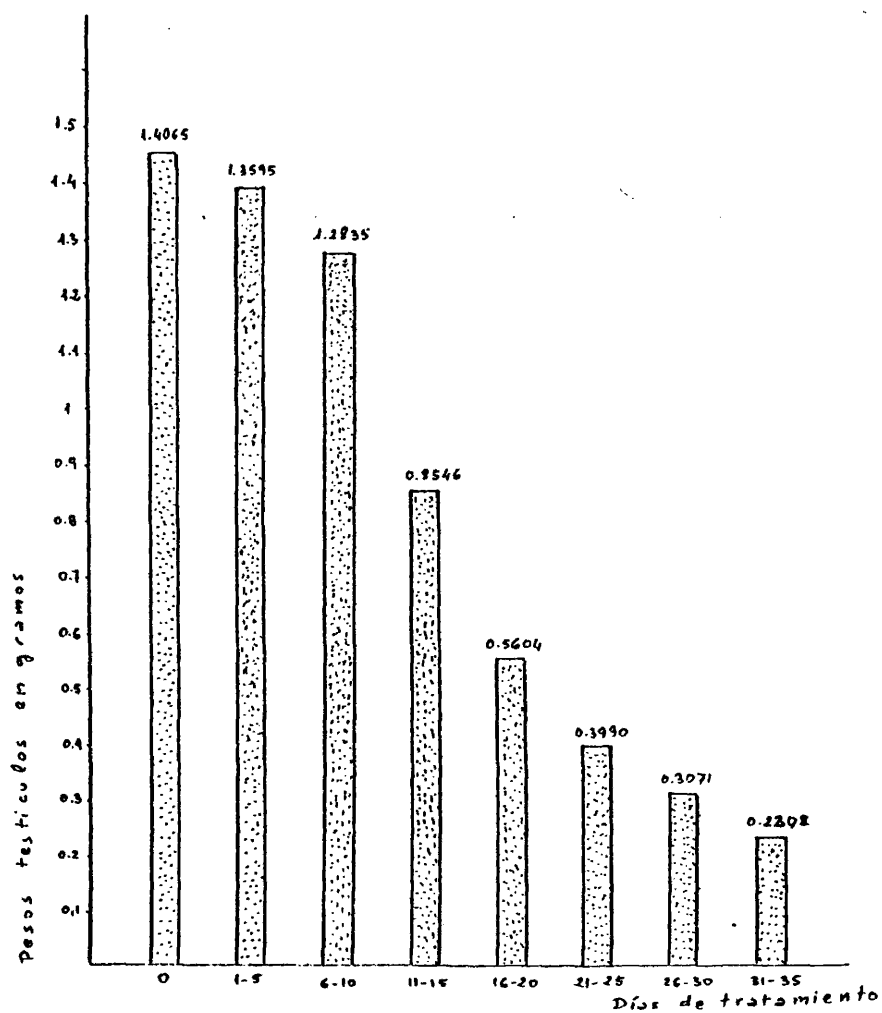


Diagrama que resume las tablas I y II, correspondientes a los pesos de los testículos de los animales de los grupos 3 y 1 (control y tratados con 250 µg/d de benzoato de estradiol, respectivamente.).

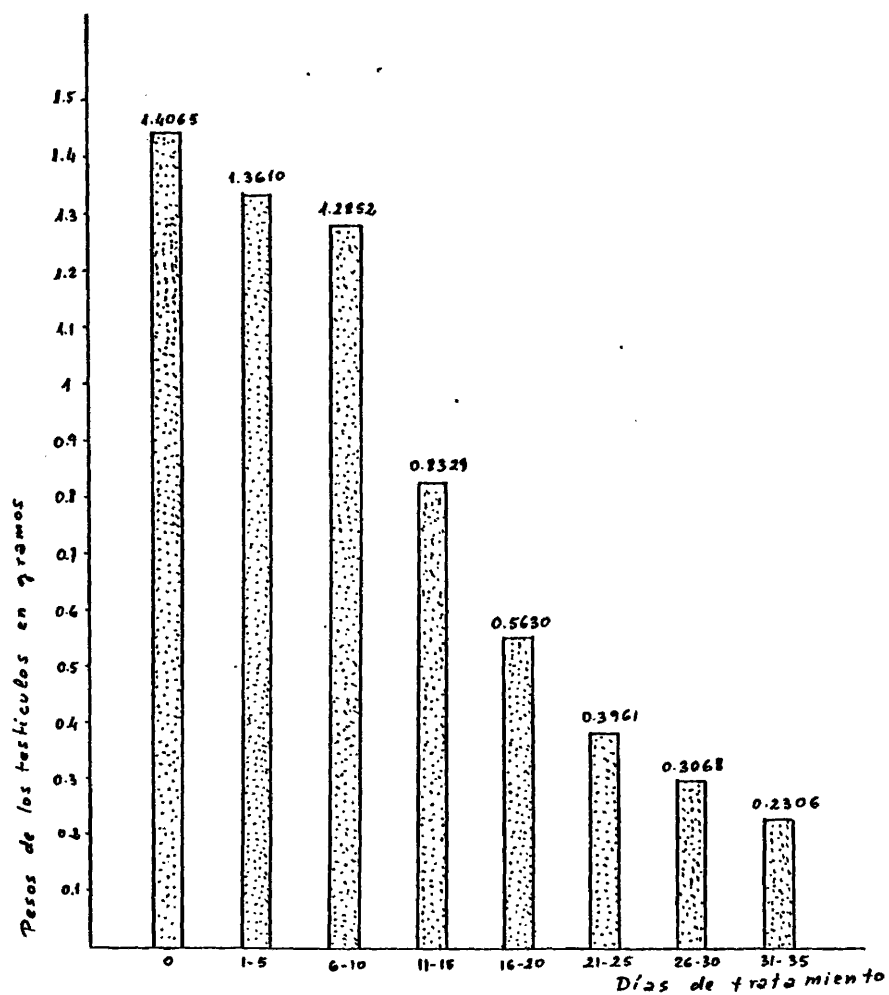


Diagrama que resume las tablas I y III, correspondientes a los pesos de los testículos de los animales de los grupos 3 y 2 (control y tratados con 50  $\mu\text{g}/\text{d}$ . de benzoato de estradiol, respectivamente.).

Para comprobar si esta disminución de los pesos testiculares se puede considerar significativa, hemos comparado los resultados de los grupos 3 (animales inyectados con 0,25 ml./d. de disolvente oleoso) y 1 (animales tratados con 250  $\mu$ g./d. de benzoato de estradiol), mediante el cálculo de la t de Student. Para ello, hemos agrupado los resultados en siete clases sucesivas, según el número de días de tratamiento:

Días de tratamiento.	Pesos testic.(g) Grupo 3 (control)	Pesos testic.(g) Grupo 1 (250 $\mu$ g/d.b.e.)	t
1-5	$n=5$ $\bar{X} \pm$ D.S. 1,3827 $\pm$ 0,0217	$n=5$ $\bar{X} \pm$ D.S. 1,3595 $\pm$ 0,0264	e=0,0152 t=1,5166 gl.8 p < 0,20
6-10	$n=5$ $\bar{X} \pm$ D.S. 1,4125 $\pm$ 0,0140	$n=5$ $\bar{X} \pm$ D.S. 1,2835 $\pm$ 0,0278	e=0,0139 t=0,9261 gl.8 p < 0,30
11-15	$n=5$ $\bar{X} \pm$ D.S. 1,3986 $\pm$ 0,0437	$n=5$ $\bar{X} \pm$ D.S. 0,8546 $\pm$ 0,1907	e=0,0874 t=6,0573 gl.8 p < 0,001
16-20	$n=5$ $\bar{X} \pm$ D.S. 1,387 $\pm$ ,0250	$n=5$ $\bar{X} \pm$ D.S. 0,5604 $\pm$ 0,0952	e=0,0440 t=18,776 gl.8 p < 0,001
21-25	$n=5$ $\bar{X} \pm$ D.S. 1,4147 $\pm$ 0,0248	$n=5$ $\bar{X} \pm$ D.S. 0,3990 $\pm$ 0,0284	e=0,0168 t=60,187 gl.8 p < 0,001
26-30	$n=5$ $\bar{X} \pm$ D.S. 1,3774 $\pm$ 0,0228	$n=5$ $\bar{X} \pm$ D.S. 0,3071 $\pm$ 0,0243	e=0,014 t=71,837 gl.8 p < 0,001
31-35	$n=5$ $\bar{X} \pm$ D.S. 1,3981 $\pm$ 0,0641	$n=5$ $\bar{X} \pm$ D.S. 0,2298 $\pm$ 0,0260	e=0,0309 t=37.766 gl.8 p < 0,001

Asimismo, y con el mismo objetivo, mediante el mismo método hemos comparado los resultados de los grupos 3 (animales inyectados con 0,25 ml/d. de disolvente oleoso) y 1 (animales tratados con 250 µg/d. de benzoato de estradiol):

Días de tratamiento.	Pesos testic.(g) Grupo 3 (control)	Pesos testic.(g) Grupo 2 (50 µg/d. b.e.)	t
1-5	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1,3827±0,0217	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1,3610±0,0247	e=0,0147 t=1,4731 gl.8 p < 0,20
6-10	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1,4125 ± 0,1400	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1,2852±0,2576	e=0,1153 t=1,0337 gl.8 p < 0,40
11-15	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1,3986±0,0437	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,8329±0,2042	e=0,0933 t=6,0573 gl.8 p < 0,001
16-20	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1,3870±0,0250	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,5630±0,1013	e=0,0466 t=17,660 gl.8 p < 0,001
21-25	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1,4147 ± 0,0249	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,3961±0,0316	e=0,0180 t=56,588 gl.8 p < 0,001
26-30	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1,3774±0,0228	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,3068±0,0267	e=0,0157 t=68,121 gl.8 p < 0,001
31-35	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1,3981±0,0641	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,2306±0,0257	e=0,0309 t=37,766 gl.8 p < 0,001

Si tomamos como significativa  $p < 0,05$ , encontramos que, en ambos grupos estudiados las diferencias de pesos entre los testículos de los animales tratados y los utilizados como controles,

no son significativas hasta después de pasados los diez primeros días de tratamiento, mientras que, a partir de este momento, comienzan a ser muy significativas.

Hemos comparado también entre sí los dos grupos de animales sometidos a tratamiento, para determinar si existe diferencia significativa que dependa de las diferentes dosis utilizadas:

Días de tratamiento.	Pesos testíc. (g) Grupo 1 (250 µg/d)	Pesos testíc. (g) Grupo 2 (50 µg/d)	t
1-5	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1,3595±0,0264	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1,3610±0,0247	e=0,0161 t=0,0938 gl.8 p < 0,95
6-10	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1,2835±0,0278	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1,2852±0,2576	e=0,1158 t=0,0146 gl.8 p < 0,99
11-15	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,8546±0,0190	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,8329±0,2042	e=0,1249 t=0,1736 gl.8 p < 0,90
16-20	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,5604±0,0952	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,5630±0,1013	e=0,0621 t=0,0418 gl.8 p < 0,97
21-25	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,3990±0,0284	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,3961±0,0316	e=0,0190 t=0,1526 gl.8 p < 0,90
26-30	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,3071±0,0243	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,3068±0,0267	e=0,161 t=0,018 gl.8 p < 0,99
31-35	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,2298±0,0260	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 0,2306±0,0257	e=0,0163 t=0,0489 gl.8 p < 0,97

Tomando como significativa la diferencia cuando  $p < 0,05$ , encon-

tramos que no hay diferencia significativa en la disminución del peso del testículo por tratamiento estrogénico, debida a las diferentes dosis utilizadas en cada grupo de animales.

## II. MICROSCOPIA OPTICA

### 1. OBSERVACION DE LOS CORTES TEÑIDOS CON H.E. Y P.A.S.

#### GRUPO CONTROL

##### Túbulos seminíferos

Las imágenes obtenidas de los cortes de los testículos pertenecientes a estos animales, coinciden totalmente con lo hasta ahora descrito en la bibliografía recogida, y no hemos podido detectar alteración alguna ocasionada por la inyección diaria del disolvente oleoso. Los tubos seminíferos aparecen en diferentes etapas de la espermatogénesis, como se puede apreciar en la figura núm. 20, habiendo podido identificar cada una de las catorce etapas de la espermatogénesis de la rata descritas por Leblond y Clermont (1952), como se observa en la serie de figuras numeradas conjuntamente con el número 21. A veces, sobre todo en las primeras etapas, resulta difícil diferenciar entre dos etapas sucesivas, principalmente si la que antecede está ya avanzada y la siguiente se encuentra en sus inicios. En estos casos, resulta útil fijarse además en el resto de las células de la asociación celular que aparecen acompañando a la espermátida.

##### Intersticio

Al igual que ocurría en los tubos seminíferos, el aspecto que presentan los distintos componentes del tejido

intersticial, coinciden con lo descrito en la literatura. (Figuras núm. 22 y 23).

#### Epidídimo

Los tubos del epidídimo de estos animales aparecen totalmente llenos de espermatozoides, y la cantidad de tejido conjuntivo que los envuelve es muy pequeña. (Figuras núm. 24 y 25).

#### ANIMALES SOMETIDOS A TRATAMIENTO

Las alteraciones que se producen parecen ser independientes de las dosis utilizadas, llegando incluso en determinadas zonas a ser más graves en aquellos animales en que las dosis de tratamiento eran más bajas. (Compárense las figuras núm. 26 y 27). Describiremos, por tanto, conjuntamente las alteraciones encontradas en ambos grupos de animales tratados.

#### Túbulos seminíferos

Es difícil establecer diferencias morfológicas entre animales sacrificados en días muy próximos, ya que las alteraciones se producen de forma gradual, e incluso, entre animales tratados el mismo número de días aparecen distintos grados de alteraciones. Por ello, y para facilitar la descripción, hemos agrupado a los animales de cinco en cinco días de tratamiento, puesto que las diferencias van a ser más de tipo cuantitativo que

cualitativo.

. Animales tratados de 1 a 5 días.

Las imágenes que presentan los túbulos seminíferos de estos animales son prácticamente normales. En los que ya llevan cuatro o cinco días de tratamiento, empieza a apreciarse la aparición de células germinales degeneradas, en una proporción que parece estar por encima del porcentaje de degeneración espontánea. Hemos podido también detectar algún túbulo con células germinales inmaduras en su luz.

. Animales tratados de 6 a 10 días.

Las imágenes de conjunto de los cortes de los testículos de estos animales, siguen siendo, en general, prácticamente normales. (Figura núm. 26). Sin embargo, a partir de los nueve o diez días de tratamiento, después del estudio cuidadoso de todos los cortes, se pueden establecer casi todos los tipos de alteraciones que se producen.

Para hacer nuestra descripción lo más ordenada posible, vamos a agruparlos de la siguiente forma:

- Túbulos casi normales:

En ellos sólo se aprecia cierta descolocación de algunas células de la línea germinal, que encontramos desplazadas hacia la luz del túbulo. Este hecho se

aprecia especialmente bien en los espermátocitos paquiténicos, cuyos núcleos, intensamente teñidos, destacan netamente entre los de las espermatídas. (Figura núm. 28 ).

- Túbulos con un porcentaje de células germinales degeneradas por encima del porcentaje de degeneración espontánea: La frecuencia de células germinales degeneradas se eleva claramente por encima de lo normal. Estas células aparecen habitualmente en la localización que les corresponde -lo que nos sirve para que las podamos seguir identificando con facilidad- y se caracterizan porque se tiñen intensamente y destacan sobre un fondo claro que corresponde a un espacio periférico vacío que las rodea, debida a la condensación sufrida, tanto por el núcleo, como por el citoplasma. (Figuras núm. 29 y 30 ). El resto de las células germinales del túbulo continúan su proceso evolutivo normalmente, con liberación de espermatozoides en la luz, mientras que en la base las espermatogonias siguen entrando en mitosis. (Figura núm. 29 ).
- Túbulos en los que aparecen espacios vacíos que, probablemente, ocupaban con anterioridad las células que han degenerado. (Figura núm. 31 ).
- Túbulos que presentan descamación del epitelio seminífero: en la luz de algunos túbulos aparecen células germinales, independientemente de que presenten o no algún signo de degeneración. (Figura núm. 30 ).

Estas células que han sido liberadas a la luz, aparecerán después en los túbulos del epidídimo, donde sí es más frecuente encontrarlas alteradas. (Figura núm. 32).

Las células descamadas pueden pertenecer a la misma asociación celular que las que encontramos en la pared de ese túbulo (lo que podría indicar que acaban de ser liberadas), o a otra asociación celular diferente. (Parece que en el momento del sacrificio se encontraban recorriendo el trayecto de salida hacia el epidídimo). En ambos casos, siempre son células pertenecientes todas ellas a la misma etapa del ciclo del epitelio seminífero. (Figura núm. 33).

Esta descamación, se inicia, como es lógico, por aquellas células del epitelio que son más superficiales, es decir, las más cercanas a la luz del túbulo. Como en casi todas las etapas del ciclo las células más superficiales son también las más avanzadas en la espermatoogénesis, éstas son las primeras que se descaman, por lo que, en un estudio rápido, puede dar la impresión de que la espermatoogénesis no va más allá de la espermátida 7 u 8, cuando lo que ocurre en realidad es que estas células todavía quedan protegidas por otras más superficiales, que son las que primero se descaman. Sin embargo, vemos cómo en la etapa XIII, las espermátidas tipo 13, que ocupan posiciones muy basales, aparecen en la pared del túbulo, aunque no en la cantidad que cabría esperar, (Figura número

34).

Las relaciones celulares establecidas en las diferentes asociaciones del ciclo se mantienen, por muy avanzado que esté el proceso, de tal manera que, casi siempre, va a ser posible reconocer hasta el final en qué etapa del ciclo se encuentra una determinada zona del túbulo. Esto nos da idea de que no existe un punto concreto de la espermatogénesis donde ésta esté inhibida, ya que, de ser así, se perderían dichas relaciones.

Las células que quedan en la pared del túbulo tienden a restablecer los contactos entre ellas, reparando las soluciones de continuidad dejadas por las células degeneradas o descamadas. Esto da lugar a que en túbulos en los que la descamación no ha sido masiva, aparezca un cierto desorden y las células de Sertoli parezcan aumentadas en su número con relación a las células de la línea germinal. (Figura nº 35).

A esta tendencia de restablecer los contactos celulares, lo que, por otra parte, es característico de las células epiteliales, ayuda el comportamiento de la lámina propia, cuyas células se acercan entre sí para adaptarse al contenido tubular, modificándose, de esta forma el diámetro del túbulo, que disminuirá notablemente. Como consecuencia de ello, los nú-

oleos de las células de la lámina propia aparecen muy cerca unos de otros, lo que se aprecia muy bien en aquellos túbulos en los que la descamación ha afectado a casi todo el epitelio y prácticamente sólo quedan células de Sertoli. (Figura núm. 36)

La aparición de túbulos con células germinales inmaduras en la luz y de túbulos degenerados, es casi si multánea, de donde se deduce que, en algunos casos, la descamación es masiva, afectando al mismo tiempo a toda la asociación celular, lo que explica el que después la encontremos completa en la luz del túbulo.

Este proceso de descamación del epitelio seminífero lo hemos encontrado en todas las etapas del ciclo y, en animales tratados el mismo número de días aparecen afectados túbulos que se encuentran en etapas diferentes, y que se localizan al lado de otros cuya espermatogénesis ha progresado normalmente. (Figura núm. 36).

Además, en túbulos que se encuentran en la misma etapa, mientras que unos aparecen con un grado de descamación avanzado, otros, conservan su apariencia normal. (Compárense las figuras números 34 y 37, ambas correspondientes a túbulos en la etapa XIII, de animales sometidos a 10 días de tratamiento).

Tanto en la pared como en la luz del túbulo aparecen restos celulares que forman grandes masas esfé

roideas, que a veces aparecen como células gigantes multinucleadas atípicas (figs. nº 30 y 33), y que proceden, como se puede comprobar en la figura número 38, de la confluencia de células germinales degeneradas, que también salen hasta el epidídimo.

• Animales tratados de 11 a 15 días.

El proceso de descamación del epitelio seminífero continúa y, como consecuencia, la cantidad de espermatozoides producidos disminuye notablemente. Lo que no quiere decir que la espermatogénesis esté inhibida de forma selectiva en un punto determinado del proceso.

Hacia los catorce días del tratamiento, casi todos los túbulos se encuentran más o menos afectados (fig. nº 39), aunque todavía en algunos se ve que ha culminado el proceso de espermiogénesis, apareciendo los espermatozoides en la luz. A partir de este momento, resulta difícil encontrar túbulos con espermatidas en fase de maduración. (Figura núm. 40).

Las células germinales degeneradas aparecen cada vez con más frecuencia (Figura núm. 41). El hallazgo de túbulos cuyo epitelio se está descamando, es también cada vez más frecuente, por lo que resulta fácil sorprender células germinales inmaduras a punto de liberarse en la luz del túbulo. (Figura núm. 42). Como consecuencia de esta descamación, la proporción entre el número de células de Sertoli y el de células germi

nales aumenta notablemente. ( Figura núm. 43 ). Algunos túbulos seminíferos seccionados en el lugar donde se está produciendo la descamación, presentan un alto grado de desorganización del epitelio. (Figura número 44). En otros podemos constatar lo que ya se apreciaba en el grupo anterior: el paso hacia el epidídimo de asociaciones celulares completas (Figura número 45) y que, aunque el túbulo esté muy afectado, la espermatogénesis continúa mientras las células germinales se mantienen en su pared. (Figura núm. 46).

Los restos celulares, procedentes de células degeneradas, siguen tendiendo a confluír y a eliminarse a la luz del túbulo. (Figura número 47).

Animales tratados de 16 a 20 días.

Todavía encontramos túbulos con espermatidas 13 y 14, e incluso de los tipos 18 y 19 (figura número 48), aunque mucho más escasas, a pesar de que las mitosis no estén inhibidas. (Figuras números 49 y 50. Compárense con la n<sup>o</sup> 51).

Las células germinales degeneradas son cada vez más frecuentes (figura número 52), y aparecen en túbulos prácticamente desprovistos de espermatidas en fase de maduración. Compárense las figuras número 53 y la n<sup>o</sup> 54, ambas correspondientes a la misma etapa evolutiva, donde puede observarse el descenso de espermatidas maduras producido por el tratamiento.

La tendencia de estas células germinales degeneradas a confluír, para formar acúmulos esferoideos fuertemente tingibles, y eliminarse en esa forma, es manifiesta, pudiéndose, en algunas ocasiones, identificar de qué tipo de células se trata. (Figuras número 55, 56 y 57). Sin embargo, llega un momento en que no se puede saber de dónde proceden y que, a pesar de ello, permanecen en la pared del túbulo, aunque éste esté muy desestructurado. (Figura núm. 58).

La mayor parte de los túbulos están afectados por la descamación de las células germinales, que caen a la luz, cualquiera que sea el período evolutivo en que se encuentran, incluso en plena mitosis. (Figura número 59). En ocasiones, es posible sorprender alguna de estas células a punto de descamarse, y todavía mantenidas por lo que parece ser una prolongación citoplasmática de la célula de Sertoli. (Figura núm. 60).

La evacuación de estas células al epidídimo se efectúa, como es lógico, a través de la rete testis (figura núm. 61).

A pesar del alto grado de afectación de los túbulos en los animales de este grupo, se siguen produciendo mitosis ( Figuras nº 62 y 63), aunque la proporción número de células de sertoli/número de células germinales, sigue en aumento, y podemos ver las células de Sertoli en localizaciones anómalas, muy desplazadas de la que les es habitual. (Compárense las figuras número 63 y 64). Los núcleos de las células

de Sertoli llegan a verse, no sólo despegados de la lámina propia, sino por encima de las espermatogonias y de otras células germinales (figura número 65), entre los espermatocitos paquiténicos (figura número 66), e incluso por encima de éstos, lo que ocurre cualquiera que sea la etapa del ciclo en que se encuentre el epitelio. (Figuras números 65, 66 y 67).

Es posible que este desplazamiento hacia la luz coincida con la etapa en que se produce en circunstancias fisiológicas, siguiendo el ciclo del epitelio, y que, posteriormente, no puedan regresar a su posición primitiva porque, debido al esfuerzo de la lámina propia por adaptarse al contenido del túbulo, oprimiéndole, el lugar haya sido ocupado por otra célula vecina. (Figuras números 69 y 70). Este desorden no sólo afecta a las células de Sertoli, sino también al resto de las células. (Compárense la figura número 68 con las 71 y 72, en las que es muy patente la ordenación de los espermatocitos zigoténicos, en las fotografías que corresponden a los animales del grupo control).

Si a este desplazamiento añadimos la descamación de las células más superficiales del epitelio, llegará un momento en que las células de Sertoli lleguen a la superficie del epitelio (figuras números 73, 74 y 75) y, aunque tienden a adherirse entre ellas, también pueden liberarse a la luz. (figuras número 76, 77 y 78).

El resultado final es que los túbulos degenerados, donde casi sólo quedan células de Sertoli, se ven con bastante frecuencia, y siempre están rodeados por túbulos cuyo proceso de degeneración es también patente. (Figura nº 79).

Animales tratados de 20 a 25 días.

Las células que componen el epitelio seminífero cada vez son más escasas, y todos los túbulos están muy afectados por la descamación. (Figura nº 80). Esta descamación lleva consigo una disminución del contenido del túbulo. Por otra parte, la tendencia de las células epiteliales a restablecer los contactos entre ellas, junto con el comportamiento de la lámina propia, adaptándose al nuevo contenido tubular, hace que disminuya el diámetro de los túbulos, lo que es ya muy patente en estos días del tratamiento. (Figura nº 80). Este ajuste de la lámina propia al contenido del túbulo, se pone de manifiesto porque los núcleos de sus células aparecen más cerca de lo habitual, como consecuencia del acercamiento entre ellas, de tal manera que la lámina propia se ve engrosada, y destaca netamente rodeando los túbulos. (Fig. nº 80 y 81).

A pesar del alto grado de afectación de todos los túbulos, las mitosis de las células de la línea germinal no están inhibidas, y se pueden observar espermatogonias en mitosis en túbulos muy alterados. (Fig. nº 81). Los espermatoцитos también siguen entrando en mitosis (Fig. nº 82), y después de 24 días de tratamiento todavía po-

demos encontrar algún túbulo más conservado con células germinales en mitosis. (Fig. nº 83).

También el proceso de espermiogénesis continúa en algunos túbulos, donde aún aparece la asociación celular completa, aunque el epitelio está muy desordenado, y pueden aparecer células germinales con signos de necrosis. (Fig. nº 81, 82 y 84). Así, por ejemplo, en las figuras nº 81 y 82 se observan espermátidas 13, aunque éstas sean muy escasas.

Animales tratados de 25-30 días.

El proceso de descamación continúa. El epitelio seminífero se encuentra constituido solamente por aquellas células que son más basales, en la mayor parte de los túbulos. (Fig. nº 85 y 86).

A pesar de la descamación, se siguen encontrando las mismas asociaciones celulares que caracterizan a cada etapa del ciclo del epitelio seminífero. Por ello, y aunque falten las células que ocuparían las posiciones más superficiales, podemos seguir distinguiendo, en casi todos los casos, en qué etapa se encuentra una determinada zona del túbulo seminífero. (Figs. nº 85 y 86).

Hacia los últimos días del período la mayor parte de los túbulos conservan en la pared casi exclusivamente células de Sertoli. (Fig. nº 87).

. Animales tratados de 31 a 35 días.

El epitelio de la mayor parte de los túbulos seminíferos de los animales de este grupo, presenta, casi exclusivamente, células de Sertoli, acompañadas de alguna espermatogonia y algún espermatozoido que, a menudo presentan signos de degeneración. (Fig. nº 88 y 89).

Intersticio

Aunque no hemos centrado nuestro estudio en el tipo de alteraciones sufridas por el tejido intersticial, como consecuencia del tratamiento estrogénico, hemos podido observar la aparición en éste de un tipo celular cuyo núcleo y citoplasma se tiñen muy intensamente. El tamaño de estas células es menor que el que presentan las células de Leydig de aspecto normal, y su forma es muy irregular. (Fig. nº 90).

Por otra parte, las células de Leydig de aspecto normal se observan con menos frecuencia.

Cuanto mayor es el número de días de tratamiento, mayor es la proporción de estas células oscuras, pequeñas y de forma irregular en relación con las células de Leydig de morfología normal. (Fig. nº 91, 92 y 93). Al final del tratamiento en el intersticio encontramos casi exclusivamente este nuevo tipo celular, mientras que las células de Leydig han desaparecido. Da la impresión de que las células de Leydig de morfología normal se hubieran transformado en este otro tipo celular.

### Epidídimo

Para comprobar que las células observadas en la luz de los túbulos procedían de la descamación del epitelio seminífero, hemos estudiado también los túbulos epididimarios de estos animales.

El estudio del epidídimo, nos sirve también como confirmación de la escasa influencia en los resultados de que la dosis de benzoato de estradiol aplicada en el tratamiento sea de 50 ó 250  $\mu\text{g}/\text{d}$ . Como confirmación de ello, véanse las figuras nº 94 y 95, en las que se observa cómo el animal que parece más afectado es el que ha recibido menor dosis de estrógenos. Por ello, también en este caso haremos la descripción de las observaciones realizadas en ambos grupos de animales de forma conjunta.

Las imágenes coinciden con lo que cabría esperar, después de haber estudiado el túbulo seminífero.

A los 10 días del tratamiento todavía hay muchos túbulos ocupados por espermatozoides (figs. nº 94 y 95), aunque en menor cantidad que los que se observaban en los animales del grupo control (fig. nº 96), y son muy frecuentes los túbulos vacíos (fig. nº 97) y aquéllos en los que los espermatozoides, más o menos abundantes, aparecen mezclados con células inmaduras, en muchos casos bastante alteradas, aunque aún puede reconocerse de qué tipo celular se trata. (Figs. nº 98 y 99).

Se observa también un claro aumento del estroma, junto con una disminución del diámetro del túbulo, y un aumento en la altura del epitelio que tapiza su luz. (Compárense las figs. nº 94 y 95, con la número 24, y las 96 y siguientes con la número 25).

En la luz de los túbulos cada vez son más abundantes las células germinales inmaduras y más escasos los espermatozoides (Figs. nº 100 y 101) y, al mismo tiempo, va aumentando el estroma. (Fig. nº 101). Hacia los últimos días del tratamiento, los túbulos epididimarios aparecen con una luz muy reducida, el epitelio que los tapiza es muy alto, y el estroma muy abundante. (Fig. nº 102). Además, casi todos los túbulos aparecen vacíos. (Fig. nº 103 y 104).

## 2. OBSERVACION DE CORTES SEMIFINOS (1 $\mu$ .), TEÑIDOS CON AZUL DE TOLUIDINA.

### GRUPO CONTROL

Los cortes estudiados correspondientes a los animales del grupo control, se ajustan en todo a lo ya descrito en la bibliografía.

Hemos podido constatar que el detalle obtenido con esta técnica es mucho mayor que el que se consigue con las tinciones de hematoxilina-eosina, o con la técnica del P.A.S., siendo posible establecer sin dificultad cada una de las etapas del ciclo del epitelio seminífero, ya que se pueden diferenciar perfectamente todos los tipos celulares, sus

límites y relaciones, dado que se identifican fácilmente la vesícula acrosómica (fig. nº 105), el aparato de Golgi, o la posición de la gota citoplasmática, así como, en parte, el contenido de ésta. (Figs. nº 106 y 107). No obstante, para cumplir con los objetivos que nos proponíamos en nuestro trabajo, ha resultado suficiente el estudio de los cortes teñidos con hematoxilina-eosina y P.A.S., aunque el estudio de los cortes semifinos nos ha servido para confirmar nuestros resultados y añadir algún detalle más como, por ejemplo, la distribución de los lípidos en el túbulo seminífero y las alteraciones sufridas en la misma, aunque no hayamos centrado nuestro estudio en este aspecto.

Asimismo, el aspecto del tejido intersticial de los testículos extraídos de los animales del grupo control, se ajusta en todo a lo descrito en la bibliografía recogida.

#### ANIMALES SOMETIDOS A TRATAMIENTO.

Las imágenes que nos proporcionan los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, nos confirman los resultados ya expuestos, aportándonos mayor claridad en los detalles.

Efectivamente, los elementos que caen a la luz del túbulo son aquéllos más superficiales, -como los cuerpos residuales, que deberían haber sido fagocitados por las células de Sertoli al liberarse la espermátida madura o

la luz del túbulo- (fig. nº 108), haciéndolo después las células que ocupan posiciones más basales en el epitelio.

Da la impresión de que la célula principalmente afectada es la célula de Sertoli, cuyo citoplasma apical se retra- jese, dejando en libertad a las células germinales que en vuelve. (Fig. nº 110).

Las células degeneradas, o caídas a la luz, dejan espa- cios vacíos que tienden a ocuparse por otras células, aun que no las corresponda esa posición en el orden normal del epitelio seminífero. (Fig. nº 111).

Al fenómeno anteriormente expuesto, ayuda el comportamien to de la lámina propia, cuyas células llegan incluso a ple garse sobre sí mismas, penetrando hacia el epitelio, en un esfuerzo por adaptarse al contenido tubular. (Fig. nº 112).

Este proceso, hace que las células de Sertoli lleguen a po siciones superficiales y, una vez perdido el contacto con la lámina propia, se descamen también en la luz. (Figs. nº 112 y 113).

Hacia los 30 días de tratamiento, están afectados la tota- lidad de los túbulos, aunque, gracias a que las relaciones dentro de cada asociación celular se siguen manteniendo, todavía se puede identificar en qué etapa se encuentran. Sin embargo, ya no se ven en ningún túbulo espermatidas ma duras, aunque la espermiogénesis evoluciona siempre que la célula germinal se mantenga en el epitelio.

También es frecuente ver dos espermátidas con un citoplasma común, por no haber tenido lugar la citocinesis. (Fig. nº 112).

Al final del tratamiento, todos los túbulos presentan una imagen como la que aparece en la figura nº 114. La lámina propia aparece engrosada y "festoneada", las células de Sertoli son las más abundantes del epitelio y sólo están acompañadas por escasas células germinales, que no suelen haber sobrepasado el estadio de espermatozoides paquiténicos, y los lípidos se acumulan en grandes cantidades, apareciendo muchas células necróticas o con signos de degeneración. (Figs. nº 110, 112, 113 y 114).

En el intersticio, igual que ocurría con los cortes teñidos con hematoxilina-eosina o con P.A.S., durante los primeros días del tratamiento, las células de Leydig conservan su aspecto normal. Sin embargo, a partir de los ocho o nueve primeros días, comenzamos a observar la aparición en el intersticio de células más pequeñas, de límites irregulares, y que se tiñen intensamente. En los días sucesivos del tratamiento, el porcentaje que observamos de estas células, con relación a las células de Leydig, es cada vez mayor. (Fig. nº 115), hasta que todas las células que se ven en el intersticio presentan la morfología descrita. (Fig. nº 116).

### III. MICROSCOPIA ELECTRONICA

#### GRUPO CONTROL

Las imágenes observadas en los cortes obtenidos para el estudio a microscopía electrónica de los testículos de los animales utilizados como controles, se han ajustado, en todos los casos, a los patrones morfológicos descritos en la literatura reseñada.

La lámina propia aparece, tal y como describíamos en la introducción, constituida por sendas láminas homogéneas separadas por otra intermedia de naturaleza fibrilar, envueltas por una cubierta de células mioides, en cuyo citoplasma destacan gran cantidad de miofibrillas (expresión de su capacidad contráctil y -para nosotros-, de adaptación al contenido del túbulo seminífero). Apoyada sobre una nueva lámina basal que envuelve a la célula mioide, aparece una nueva capa celular, cuyas células son para nosotros, de acuerdo con Clark (1976) y Neaves (1977), de naturaleza endotelial, y cuyo aspecto es muy diferente al que presentan las células mioides, aunque las membranas citoplasmáticas de ambos tipos celulares están tachonadas de gran cantidad de vesículas de pinocitosis, que ponen de manifiesto la gran importancia que tiene a este nivel el intercambio de sustancias entre el intersticio y el túbulo seminífero. Sin embargo, por el aspecto que presentan los citoplasmas de ambos tipos celulares, da la impresión de que, tanto las células mioides como las endoteliales, se comportan de una forma más o menos pasiva, sin intervenir, al menos aparentemente, en

la modificación de estas sustancias. (Fig. nº 117).

Sobre la lámina propia se apoyan directamente las espermatogonias. (Fig. nº 118). La extensión de la superficie de apoyo va disminuyendo, a medida que, al avanzar su grado de madurez con la espermatogénesis, su forma se va redondeando. (Fig. nº 119. Compárese con la 118), hasta llegar a separarse de ella por interposición de una prolongación citoplasmática de la célula de Sertoli, lo que empieza a ocurrir en los espermátocitos preleptoténicos. (Fig. nº 120).

Uno de los rasgos diferenciales que más útiles resultan para distinguir, desde un punto de vista morfológico, las espermatogonias del resto de las células de la línea germinal y de las células de Sertoli, además de aparecer directamente apoyadas sobre la lámina propia, es la morfología característica de sus mitocondrias, que presentan crestas laminares rectas, que no son observables en el resto de los tipos celulares. Como ya indicábamos en nuestra introducción, su citoplasma es escaso y pobre en organelas, apareciendo grupos de ribosomas y retículo endoplásmico, siendo el retículo endoplásmico rugoso muy escaso, y el retículo endoplásmico liso aparece casi siempre en forma de vesículas. La superficie celular no apoyada sobre la lámina propia, está en estrecho contacto con las células de Sertoli vecinas, estableciéndose entre las membranas de ambos tipos celulares especializaciones de unión semejantes a los desmosomas. Es frecuente también encontrar en ellas vesículas con cubierta, relacionadas, al parecer,

con la incorporación de proteínas por micropinocitosis que, en este caso, podrían haber sido liberadas previamente al espacio intercelular por las células de Sertoli. (Figs. nº 118 y 119). Estas vesículas con cubierta las encontramos en todas las células germinales.

Los espermatoцитos también se diferencian claramente en las imágenes de microscopía electrónica por la presencia en su citoplasma de mitocondrias, generalmente alargadas, de mayor longitud que las que se observan en las espermatogonias, de crestas hinchadas, que rechazan hacia la perifería una matriz electrodensa.

Entre los espermatoцитos, podemos diferenciar los distintos estadios evolutivos de los espermatoцитos I, además de por los detalles morfológicos descritos en la introducción, por la posición que ocupan en el epitelio: los preleptoténicos debajo de la sucesión de zónulas occludens entre las células de Sertoli contiguas y que constituyen la expresión morfológica de la barrera hemato-testicular. (Fig. 120). Los leptoténicos atravesando dicha barrera, y los zigoténicos y paquiténicos, por encima de ella.

Los espermatoцитos paquiténicos, que encontramos en todas las etapas del ciclo, con excepción de las XII y XIII, se caracterizan además fácilmente por la presencia de los complejos sinaptonémicos. (Fig. nº 121). Para saber si se trata de un espermatoцитo paquiténico más o menos avanzado, además del tamaño y morfología del núcleo, nos podemos fijar en las mitocondrias, que van a ir evolucionando po-

co a poco, hasta, al final, llegar a presentar un aspecto muy parecido al que presentan las mitocondrias de las espermátidas. Así, en el espermatozoido paquiténico de la fig. nº 121, que corresponde a una etapa VII del ciclo, vemos que más de la mitad de las mitocondrias presentan ya esta morfología, aunque aún no se han dispuesto en la periferia, como harán más adelante. Otro orgánulo que nos puede servir como guía es el cuerpo cromatoideo. Según hemos podido observar, aparece en el espermatozoido paquiténico aproximadamente a partir de la etapa VIII, en que aún está empezando a formarse (fig. nº 122), y que, en etapas posteriores, pasa por una serie de estadios evolutivos hasta llegar a la morfología de presenta en las espermátidas (fig. nº 123). La morfología del cuerpo cromatoideo nos puede servir para definir las etapas en que se halla, en caso de faltar las células acompañantes, como ocurre en nuestro modelo experimental de inhibición de la espermatogénesis con estrógenos.

Las espermátidas son las células germinales que se identifican con más facilidad, pudiendo seguir la espermiogénesis paso a paso, sin más que identificar los detalles morfológicos típicos de cada estadio.

No obstante, señalaremos como marcadores morfológicos útiles en nuestro estudio la abundancia de retículo endoplásmico liso en forma de vesículas, la ausencia, por el contrario, de retículo endoplásmico rugoso, y la morfología característica de sus mitocondrias, que aparecen con una disposición periférica. Además, son características la

la formación del acrosoma y los cambios que van a tener lugar como consecuencia de la espermiogénesis, como, por ejemplo, la emigración de los centriolos hacia el polo nuclear opuesto al acrosoma. También resulta fácil observar la zona especializada del citoplasma sertoliano, que servirá a la espermátida como zona que se ha considerado de anclaje y de orientación del polo acrosómico, para dirigir su emigración hacia zonas más basales de la pared del túbulo . (Figs. nº 124 y 125).

Dos detalles nos han llamado la atención que no hemos encontrado descritos en la bibliografía:

Por una parte, la existencia de una estructura en forma de banda engrosada que, a modo de refuerzo, se dispone en la zona más caudal de la cara interna del acrosoma, enfrentada a una zona hendida de la membrana nuclear, que coincide con la región en donde se inicia la diferenciación que la membrana nuclear presenta en el área subacrosómica (Figs. 124 y 125). Esta banda electrodensa, parece estar constituida por un material que, a mayores aumentos, se observa dispuesto, a su vez, en varias bandas o condensaciones equidistantes entre sí. (Fig. nº 126).

Y, por otra, la presencia de múltiples vesículas con cubierta entre los componentes del aparato de Golgi de las espermátidas (Figs. 126 y 127), iguales a las que se observan en todas las zonas de contacto de las células de la línea germinal con las células de Sertoli. Estas vesículas con cubierta es también posible observarlas en el interior y asociadas

a las cisternas del retículo endoplásmico liso, y relaciones con la vesícula acrosómica. (Figura nº 124).

La gota citoplásmica se ve en la luz del túbulo, rodeando la cola de las espermátidas en fase de maduración. En ellas se observan todo tipo de organelas relacionadas con la autofagocitosis: restos de mitocondrias, laminillas anulares, ribosomas, polisomas, vesículas de retículo endoplásmico liso, lisosomas, etc. (Fig. nº 128). Estos restos citoplasmáticos los encontramos a menudo asociados a cisternas de retículo endoplásmico liso, cuyos perfiles se sitúan alrededor, cerrando un espacio citoplasmático más o menos esférico. Junto a estos espacios cerrados por perfiles de R.E.L., aparecen también vacuolas autofágicas o autofagosomas. (Fig. nº 129). Todavía, en las gotas citoplasmáticas, que aparecen rodeadas por la célula de Sertoli, se ven vesículas de micropinocitosis -vesículas con cubierta-. (Figs. nº 128 y 129).

El espermatozoide, prácticamente formado y, a punto de liberarse, aparece en la luz del túbulo, sujeto por una prolongación citoplasmática apical de la célula de Sertoli, y cuyos detalles morfológicos han quedado ya descritos en la introducción. A dicha descripción, sólo tenemos que añadir dos detalles morfológicos que hemos observado en nuestras preparaciones, pero que no hemos visto descritos en la bibliografía:

La existencia de un material electrodenso entre la membrana citoplasmática de esta espermátida y la de la célula

de Sertoli que la rodea. Este material parece estar constituido por fibras cuya dirección es más o menos perpendicular al eje longitudinal de la espermatida, como puede observarse en un corte oblicuo como el de la fig. nº 128.

La presencia de gran cantidad de microtúbulos en esta región del citoplasma de la célula de Sertoli, especializado en albergar a la espermatida ya casi madura, y cuya dirección es más o menos paralela a la de las cisternas del retículo endoplásmico, que sí quedaron ya descritas. (Figs. nº 130 y 131).

La célula de Sertoli se diferencia fácilmente de las células germinales por su núcleo característico (que contiene un nucleolo prominente y presenta invaginaciones y múltiples poros en la membrana nuclear) y por su citoplasma más claro con mitocondrias de crestas fundamentalmente tubulares y que adoptan conformaciones características, encerrando residuos en su interior, asociadas con frecuencia a cisternas de R.E.L.. Retículo endoplásmico liso, que suele aparecer ocupando zonas centrales. Retículo endoplásmico rugoso, que ocupa regiones más periféricas. Ribosomas, lisosomas, cuerpos multilaminares, gotas lipídicas y la presencia de microtúbulos y microfilamentos. (Fig. nº 132).

Su membrana presenta diferenciaciones de unión, tanto con las células germinales, como con otras células de Sertoli vecinas. (Fig. nº 133). La barrera hemato-testicular aparece formada por una sucesión de zónulas ocludens entre células de Sertoli vecinas. (Figs. nº 134 y 135). Las célu-

las situadas por debajo de ella (Fig. nº 136), forman parte del compartimento basal. Inmediatamente por encima, se sitúan los espermatoцитos zigoténicos (Fig. nº 137). Entre las espermatogonias y las células de Sertoli se observan uniones semejantes a desmosomas (Fig. nº 118), uniones en las que entre ambas membranas aparece un material electrodenso, amorfo y homogéneo y en el citoplasma subyacente de la célula de Sertoli haces de microfilamentos y cisternas de R.E. adosadas (Fig. nº 132). También hemos encontrado este tipo de unión entre las espermátidas y las células de Sertoli (Fig. nº 125). Entre células de Sertoli vecinas, además de las series de zónulas occludens se observan también lo que parecen zónulas adherens (Fig. nº 133) y uniones en las que las dos membranas adosadas aparecen muy rectas y paralelas, con un material electrodenso ocupando el espacio intercelular y los microfilamentos y cisternas de R.E. a ambos lados (Fig. nº 133). Estos tres tipos de uniones se suceden el uno al otro en algunas zonas (Fig. nº 135).

#### Intersticio

También las imágenes del tejido intersticial coinciden con lo ya descrito en la introducción. Las células de Leydig se reconocen fácilmente entre los demás componentes por su núcleo, cuya cromatina aparece en forma de grumos, preferentemente adheridos a la cara interna de la membrana nuclear, y por la gran riqueza de retículo endoplásmico liso de su citoplasma, que aparece totalmente repleto de sus cisternas, en aquellas zonas no ocupadas por las mitocondrias, de crestas, generalmente, tubulares, aunque también existen con crestas laminares. El retículo endoplásmico rugoso es muy escaso (Fig. nº 138).

#### ANIMALES SOMETIDOS A TRATAMIENTO

##### Túbulo seminífero

El examen de conjunto de aquellos túbulos que empiezan a alterarse, no nos proporcionan muchos más detalles que aquellos descritos en la microscopía óptica. Quizás podemos observar cierta tendencia de las células germinales a adoptar formas algo más irregulares (Fig. nº 139, 140). Esta tendencia, se acentúa a medida que la degeneración va siendo más acusada, hasta llegar a apare-

ver invaginaciones de prolongaciones citoplasmáticas de una célula en otra. (Figs. nº 141 y 142).

En túbulos muy alterados, el epitelio está formado solamente por células germinales inmaduras y células de Sertoli, muy desordenadas y degeneradas, dispuestas en varios estratos. Los espermatoцитos paquiténicos aparecen muy ligeramente teñidos y sus mitocondrias muy vacuolizadas. Se mantienen en la pared del túbulo debido a la presencia de múltiples diferenciaciones de unión en su membrana citoplasmática, sin que las células de Sertoli parezcan intervenir en su fagocitosis. (Fig. nº 143).

En otros túbulos, las células germinales que quedan, totalmente degeneradas, son ya muy escasas. Las prolongaciones de las células de Sertoli son muy irregulares, y su continuidad está rota por espacios vacíos. Aparecen además grandes acúmulos de lípidos. (Fig. nº 144).

Para hacer nuestra descripción lo más ordenada posible, de tallaremos a continuación las alteraciones observadas en cada uno de los elementos que componen la pared tubular.

#### . Lámina propia.

En los túbulos en los que el proceso de descamación está muy avanzado y el diámetro del túbulo ha disminuido considerablemente, las células mioides se contraen para adaptarse al contenido tubular. El grado de contracción llega a ser tal que el soma celular se invagina en la pared

del túbulo, penetrando en el epitelio seminífero, con el fin de reducir su longitud. Los microfilamentos no se pueden individualizar, sino que están constituyendo una tupida red. El empaquetamiento del núcleo en un espacio lo más reducido posible, hace que se pliegue sobre sí mismo, adquiriendo un aspecto multilobulado.

(Fig. nº 145). Las células endoteliales se acercan entre sí, lo que hacen solapando sus citoplasmas, por lo que sus núcleos aparecen más próximos. Las membranas basales se repliegan en la nueva superficie a la que tienen que adaptarse, apareciendo onduladas y con la lámina basal despegada de la reticular. En conjunto, el espesor de la lámina propia está muy aumentado, debido a este reajuste de sus componentes. (Figs. nº 147 y 148).

#### . Células germinales.

Todas las células de la línea germinal pueden aparecer degeneradas, lo que no quiere decir que no se sigan observando mitosis en las espermatogonias, incluso aunque se encuentren en túbulos ya muy alterados. (Figs. 149 y 150). Estas mitosis se producen dentro de la etapa del ciclo que corresponden.

Debido a las alteraciones que sufre la lámina propia, y que hemos descrito más arriba, el contorno de las células germinales que se apoyan en ella va a estar muy alterado, apareciendo también relaciones atípicas con las células adyacentes. (Fig. nº 151).

A partir de cierto número de días de tratamiento, algunas células germinales parecen reaccionar formando diferenciaciones de unión entre sus membranas, que aparecen bordeando casi toda la superficie celular, y que se ven como estrechamientos del espacio intercelular que aparece ocupado por un material electrodense, de aspecto semejante a los nexus. (Figs. nº 152 y 153). También empiezan a observarse signos de autofagocitosis: aumento de vesículas, lisosomas y mitocondrias vacuolizadas (Fig. nº 152).

Aquellas células que ya están en franco proceso de degeneración, presentan signos claros de autofagocitosis, apareciendo en su citoplasma gran cantidad de lisosomas, vacuolas autofágicas, cuerpos residuales, y espacios rodeados por una membrana, que quedan como resultado final de la digestión de algunos orgánulos. Contienen también múltiples gotas que parecen de naturaleza lipídica y, sin embargo, todavía pueden distinguirse las vesículas con cubierta. (Fig. nº 154).

También se observan células en necrosis, en las que no es posible distinguir más que el núcleo y, en el caso de las espermatidas, la cola en formación, que sigue un trayecto sinuoso. Toda la célula ha quedado reducida a grumos de cromatina y otros acúmulos de materiales muy densos a los electrones, con múltiples cuerpos formados por membranas concéntricas. Estas células necróticas, se corresponden con las células hipercromáticas que vemos en la microscopía óptica. A pesar de haber quedado la cé

lula reducida sólo a un resto, ésta se sigue manteniendo en su posición habitual, rodeada por el citoplasma de la célula de Sertoli. (Fig. nº 155).

En estadios intermedios entre los presentados en las fotografías nº 154 y 155, podemos apreciar que el último orgánulo citoplasmático que deja de reconocerse es el aparato de Golgi, a partir del cual todavía parece que se siguen formando vesículas, a pesar de estar muy alterado y encontrarse fuera de su localización habitual. (Fig. nº 156).

El paso siguiente es la lisis total de estos residuos celulares, en lo que parece intervenir el sistema vacuolar de la célula de Sertoli. El resultado final son los espacios vacíos, que ya vemos con el microscopio de luz. (Fig. nº 157).

Como indicábamos al principio de este apartado, pueden aparecer degeneradas todas las células de la línea germinal: las espermatogonias (fig. nº 151), los espermatoцитos (fig. nº 152), y las espermátidas (figs. nº 154, 155, 156 y 157), incluso en fases avanzadas de maduración (Fig. nº 158, 159, 160 y 161).

Junto a estas células alteradas, y al igual que observábamos con el microscopio óptico, aparecen células pertenecientes a fases avanzadas de la espermiogénesis, cuya ultraestructura es normal. (Figs. nº 162, 163, 164, 165, 166), a pesar de corresponder a animales sometidos

a suficientes días de tratamiento, como para que otros túbulos aparezcan totalmente degenerados. Incluso, en la etapa VII, las espermatidas 19 que no se han alterado, siguen formando los complejos túbulo-bulbares. (Fig. nº 167).

Tampoco desde el punto de vista ultraestructural las células descamadas en la luz presentan siempre alteraciones. (Fig. nº 168).

#### Célula de Sertoli.

Desde los primeros días del tratamiento se observa en algunos núcleos de la célula de Sertoli una estructura asociada al nucleolo, similar a la que aparece en ratas inmaduras, y que se denomina satélite o esferoide nuclear, mientras el citoplasma, y el resto del túbulo, presentan todavía un aspecto casi normal. (Fig. nº 169). En túbulos más degenerados, esta estructura se puede ver prácticamente en todas las células de Sertoli. (Fig. nº 170).

En el citoplasma de las células de Sertoli de túbulos con células germinales en las que empiezan a aparecer signos de degeneración, las vesículas de R.E.L. son más abundantes, y también aumentan los cuerpos residuales. (Fig. nº 171).

Cuando en las inmediaciones existe una célula germinal totalmente degenerada, el aumento de vesículas de

R.E.L. es muy patente (Figs. nº 171, 155, 156 y 157). Es frecuente observar cómo las cisternas del R.E.L., dispuestas concéntricamente alrededor del resto celular, llegan a envolverlo totalmente. (Fig. nº 172).

En túbulos más alterados, podemos confirmar datos ya obtenidos con microscopía de luz: el aumento relativo del número de células de Sertoli respecto al de células germinales, su desplazamiento hacia la luz del tubo, despegándose de la lámina propia (Figs. nº 173 y 174), incluso hasta llegar a aparecer por encima de otras células. (Figs. nº 175 y 176)

La forma de la célula cambia totalmente y, de una célula con forma de árbol que se apoya sobre la lámina propia y que envía sus prolongaciones citoplásmicas hacia la luz del tubo, ha pasado a ser una célula redondeada, de aspecto más o menos poligonal, en cuyo citoplasma aparecen multitud de residuos, en forma de grandes inclusiones que continen áreas oscuras y claras. (Fig. nº 176).

Los complejos de unión especiales que se establecen a nivel de sus membranas empiezan a alterarse en estadios intermedios de degeneración, empobreciéndose en haces de filamentos y cisternas de retículo endoplásmico asociadas. Al final sólo quedan algunos perfiles de retículo endoplásmico que recuerdan su existencia. (Figs. nº 173, 174, 175 y 176).

Los complejos túbulo-bulbares se siguen observando en la misma zona donde suelen localizarse en las células normales. (Fig. nº 177 y 178). Los microtúbulos y microfilamentos tampoco son visibles ya en el citoplasma de estas células. (Figs. nº 173, 174, 176, 177 y 178).

Las células de Sertoli aparecen unidas entre sí, por diferenciaciones de sus membranas, dando la impresión de que las caras externas de éstas se hubieran fusionado entre sí en grandes superficies. (Fig. nº 178).

#### Intersticio

Los espacios ocupados por las fibras de colágena son mayores, y las células de Leydig aparecen muy modificadas. Su forma es muy irregular. Tanto su citoplasma como su núcleo aparecen muy electrodensos. El núcleo aparece lobulado y muy irregular, con la cromatina muy densa, formando grandes grupos que se adosan a la cara interna de la membrana nuclear. (Figs. nº 179 y 180).

IV. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE TESTOSTERONA EN SANGRE CIRCULANTE.

Los resultados obtenidos, los hemos agrupado en las siguientes tablas:

Días de tratamiento	Animal nº		Media
	1	2	
5	980	10 880	10.380
6	11.160	8.950	9.550
7	10.550	7.860	9.210
8	11.380	8.600	10.030
9	8.795	7.715	8.255
10	9.720	8.730	9.250
11	11.115	8.985	10.050
12	8.775	7.785	8.280
13	9.345	8.565	8.950
14	9.630	8.535	9.082
15	8.920	7.725	8.822
16	6.830	7.715	7.322
17	9.815	10.025	9.920
18	7.730	9.810	8.720
19	6.550	8.325	7.445
20	7.330	7.950	7.140
21	8.565	9.650	9.105
22	8.300	7.630	8.000
23	10.380	8.550	9.415
24	9.725	8.515	9.120
25	9.624	7.825	8.724
26	7.715	10.425	9.070
27	8.970	8.850	8.910
28	9.615	7.715	8.665
29	8.530	10.345	9.437
30	6.655	8.610	7.632
31	8.715	10.310	9.512
32	6.960	6.855	6.907
33	8.710	9.715	9.212
34	10.115	6.930	8.522
35	8.715	9.625	9.170

TABLA IV

Niveles de testosterona medidos en la sangre extraída en los animales del grupo 3 (inyectados con 0,25 ml/d. de disolvente oleoso, expresados en pg/ml.

Días de tratamiento	Animal nº					Media
	1	2	3	4	5	
5	1185	1395	1275	1220	1190	1255
6	1480	1520	1610	1120	1180	1382
7	950	1870	1115	1140	1200	1255
8	885	1115	985	1130	1140	1051
9	915	890	1110	950	1730	1119
10	1290	1980	1745	1110	1210	1467
11	930	1200	1500	1130	1200	1192
12	875	985	1600	1600	950	1202
13	1120	950	1210	1315	1110	1141
14	1225	1385	1980	1402	1525	1503
15	885	1140	1320	945	1115	1081
16	1275	1410	1380	1145	825	1207
17	1315	930	1185	1395	1215	1208
18	1480	1520	1220	1190	950	1272
19	1870	985	1200	1180	885	1224
20	915	1350	1250	1325	930	1154
21	930	1520	1610	1120	1180	1272
22	885	935	1480	1610	1130	1208
23	1315	930	1320	980	1210	1151
24	1290	1170	1480	1275	1300	1303
25	1275	1410	1225	980	1380	1254
26	1415	1280	1350	1185	1200	1286
27	1315	1415	1270	1350	950	1253
28	1210	1325	1200	885	1210	1166
29	930	1350	1275	1325	1110	1198
30	1380	1380	920	1410	1220	1262
31	1230	1410	1325	1380	1295	1328
32	1320	1140	1225	1230	975	1178
33	1410	1280	1300	890	1015	1179
34	1135	980	980	1150	885	1026
35	1145	1225	885	1010	980	1049

TABLA V

Niveles de testosteronas medidos en la sangre extraída de los animales del grupo 2 (inyectados con 50  $\mu\text{g}/\text{d.}$  de benzoato de estradiol), expresados en  $\text{pg}/\text{ml.}$

Para comprobar si las diferencias encontradas entre los resultados obtenidos de ambos grupos de animales se pueden considerar significativas, los hemos comparado mediante el cálculo de la t de Student, agrupándolos en siete clases sucesivas, según el número de días de tratamiento:

Días de tratamiento.	T(pg/ml.) (control)	T(pg/ml.) (50 µg/d)	t
6-10	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 9259±649	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1283 ± 513	t=21,559 g.l. 8 p < 0,001
11-15	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 9037±643	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1223 ± 163	t=26,340 g.l. 8 p < 0,001
16-20	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 8109±1180	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1213 ± 42	t=12,853 g.l. 8 p < 0,001
21-25	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 8872±546	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1237 ± 59	t=31,087 g.l. 8 p < 0,001
26-30	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 8742±681	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1233 ± 49	t=24,592 g.l. 8 p < 0,001
31-35	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 8664±1046	n=5 $\bar{X} \pm D.S.$ 1152 ± 121	t=15,95 g.l. 8 p < 0,001

De los anteriores datos se deduce que la disminución de los niveles de testosterona en la sangre circulante de los animales sometidos a tratamiento estrogénico es muy significativa.

Asimismo, hemos comparado la primera y la segunda clase entre las que hemos establecido dentro del grupo de animales tratados, para comprobar si la diferencia que existe entre ellos es significativa, obteniendo: t= 0,5560 para g.l.=8, lo que corres-

ponde un valor de  $p < 0,20$ . Es decir, la diferencia entre ambos subgrupos, que corresponden a los primeros y últimos días del tratamiento, respectivamente, no es significativa. Esto parece querer decir que la síntesis de testosterona por el testículo está inhibida desde los 6 a 10 primeros días del tratamiento, y que esta situación no se modifica en los días sucesivos.

100

**DISCUSSION**

## DISCUSION

## I. HALLAZGOS EN EL GRUPO CONTROL

En los conocimientos que actualmente poseemos del testículo, quedan todavía muchos puntos oscuros, tanto en lo que se refiere a su morfología, como en lo relativo a su organización y coordinación de su funcionamiento.

En la segunda mitad de nuestro siglo se ha avanzado mucho en la comprensión de la citoarquitectura del testículo adaptada a la realización de las dos funciones, tanto exocrina como endocrina, que están encomendadas a esta glándula. A ello -- han contribuido aportaciones trascendentes como la descripción de cada uno de sus tipos celulares, el reconocimiento de la existencia de relaciones establecidas entre ellos para formar las distintas asociaciones celulares que caracterizan cada una de las etapas del ciclo del epitelio seminífero, la descripción de cada una de estas etapas y la comprensión de cómo están coordinadas en la ola espermatogénica, con tiempos de duración fijos, que se cumplen con precisión matemática. La posterior aplicación de la microscopía electrónica al estudio de la ultraestructura de sus componentes y los elegantes experimentos que se realizan en los laboratorios de endocrinología han establecido las bases fundamentales en esta parcela de la ciencia. No obstante, quedan aún muchos puntos controvertidos, o desconocidos casi en su totalidad. Así por ejemplo, la naturaleza y origen de los componentes celulares de la lámina propia, son tema todavía de controversia. Por nuestra parte, estamos de acuerdo con los últimos auto--

res que han tratado el problema (Burgos y cols., 1.970, Dym y Fawcett, 1.970, Clark, 1.976). En nuestras observaciones aparecen como células con una organización epiteliode, -- (apoyada sobre una membrana basal, e íntimamente unidas entre sí), y una morfología y comportamiento que recuerda a las células musculares lisas (membrana tachonada de vesículas de micropinocitosis, citoplasma cargado de microfilamentos y capacidad contráctil y de adaptación al contenido tubular), por ello, juzgamos adecuado llamarlas células mioides.

En cuanto a las células que componen la lámina celular externa, estamos de acuerdo con Clark (1.976) y Neaves (1977) en que se trata de células endoteliales que, junto con las endoteliales del intersticio, limitan un espacio linfático peritubular y no creemos, como Ross (1.967), Courot (1970) y Burgos y cols. (1.970), que sean células de naturaleza conjuntiva.

Otro punto muy controvertido es el tipo de diferenciaciones de membrana especiales que aparecen entre estas células epiteliales y cuál es su significado funcional exacto. La observación de nuestras preparaciones de microscopía electrónica no deja lugar a dudas en lo que se refiere a la existencia de diferenciaciones de unión entre todos los tipos de células germinales y la células de Sertoli, en lo que diferimos con lo indicado por Fawcett (1.975), de que es preciso que las espermatogonias y espermatocitos permanezcan libres para poder emigrar a zonas mas superficiales del epitelio a medida que maduran. Tampoco hemos observado diferencias debidas a los distintos grados evolutivos en

que se encuentre la célula germinal (como indica Russel, 1977) y las mismas diferenciaciones de membrana que encontramos entre las espermatogonias y las células de Sertoli, las observamos también entre éstas y las espermátidas, aunque estén en fase de maduración. No hemos encontrado por tanto, tampoco, las diferencias que Brökelman (1.963) y Burgos y cols. - (1.970), indican que existen entre las espermátidas tempranas y las que están en fase de maduración.

En lo que se refiere a las diferenciaciones de las membranas plasmáticas de células de Sertoli vecinas, los tres tipos que describimos en nuestros resultados (zónulas adherens, sucesión de zónulas occludens y estrechamiento del espacio intercelular conteniendo material electrodensito con haces de microfilamentos y cisternas de R.E. adosadas, en los dos últimos casos), los hemos encontrado ordenados de forma sucesiva, de manera que da la impresión de que pudiera tratarse siempre de series de zónulas occludens y nexus, que podrían presentar una u otra imagen, dependiendo de lo cercanos que estén entre ellos: las zonas entre los puntos de contacto de ambas membranas, cuando éstos están alejados, podrían parecer zónulas adherens y aquellas regiones en donde los puntos de contacto están muy próximos entre sí, podrían dar imágenes como las observadas en donde el espacio intercelular se estrecha y ambas membranas aparecen rectas y paralelas. No obstante, para poder establecer este punto, tendríamos que hacer un estudio más exhaustivo, utilizando técnicas de criofractura y de choque osmótico.

De los dos tipos de diferenciaciones de membrana que observamos en los contactos entre células germinales y células de Sertoli, los que no son semejantes a desmosomas, tienen la misma morfología que la mitad de uno de los complejos de uniones especiales existentes entre las células de Sertoli. Es posible, que se trate de una zona de comunicación con capacidad para regular el intercambio metabólico celular, que además sirve de zona de anclaje permanente de la célula germinal a la célula de Sertoli, durante todo su proceso evolutivo.

Además, se conocen todavía de forma relativamente superficial la serie de transformaciones que tienen lugar durante el complicado proceso de la espermiogénesis. Se han descrito de forma bastante detallada, los distintos aspectos que presentan el gránulo y la vesícula acrosómica (hasta llegar a formar el sistema acrosómico y la posterior evolución de éste con los distintos estadios evolutivos de la espermatida), la formación del complejo axial y del resto de las estructuras de la cola del futuro espermatozoide, la elongación de la espermatida, la condensación de su núcleo y la eliminación del citoplasma no necesario al espermatozoide. Sin embargo, quedan aún muchos puntos por aclarar relativos al mecanismo por el cual se llevan a cabo todos estos procesos y su regulación. Prueba de ello, es la descripción, relativamente reciente, de los complejos túbulobulbosos que aparecen en la espermatida 19, a pesar de que se observan con cierta facilidad.

Se desconoce también, la naturaleza y significación exactas de estructuras tan llamativas como el cuerpo cromatoideo, el manguito, las columnas segmentadas, la lámina densa postnuclear, etc.

Entre los diversos aspectos que desconocemos se encuentra, por ejemplo, cuál es la señal que determina el inicio de la espermiogénesis, y la iniciación por el complejo de Golgi de la formación de vesículas que constituirán la vesícula acrosómica. Es posible que las vesículas con cubierta de mi cropinocitosis, que hemos descrito localizadas en el seno del aparato de Golgi, y que se ven también en las inmediaciones de las zonas de contacto con la célula de Sertoli y asociadas a la vesícula acrosómica y a vesículas del R.E.L. y en el interior de éstas, sean proteínas reguladoras, procedentes de la célula de Sertoli, que determinen la iniciación del proceso.

Otra interpretación que podría darse a la existencia de estas vesículas con cubierta, es su posible relación con la actividad del cuerpo cromatoideo. Parvinen y Parvinen (1.979) encuentran que en las primeras etapas de la espermiogénesis el cuerpo cromatoideo, en sus rápidos desplazamientos a lo largo de la membrana nuclear, efectúa contactos con el aparato de Golgi. Sin embargo, no hemos encontrado estas vesículas con cubierta asociadas de forma directa a esta estructura.

Otro punto no esclarecido y que no hemos visto tratado en

la literatura consultada, es el mecanismo por el cuál la vesícula acrosómica se desliza sobre la superficie de la membrana nuclear. Es posible que la estructura descrita en nuestros resultados, como una serie de condensaciones electrodenensas y equidistantes, visibles en el borde inferior de la cara interna de la vesícula acrosómica, esté implicada en este mecanismo, en combinación con la zona hendida de la membrana nuclear enfrentada a ella y con el material que aparece reforzando la cara interna de la membrana nuclear en la región subacrosómica.

En cuanto al material fibrilar que hemos observado entre la membrana de las espermatidas en fase de maduración y la prolongación apical de la célula de Sertoli que las mantiene, es posible que se trate de un material adhesivo especializado cuya misión sea mantener la unión entre ambas.

En el citoplasma de esta prolongación sertoliana, que mantiene a las espermatidas en fase de maduración, se había descrito la presencia de microfilamentos que le dan un aspecto más electrodenso (Gourot, 1.970). Hemos encontrado en nuestras preparaciones que este aspecto electrodenso se debe también, en buena parte, a la existencia de microtúbulos a ese nivel, asociados a las cisternas de R.E.. Tanto los microtúbulos como el AMPc y el  $Ca^{++}$  parecen estar implicados en el control de la secreción de proteínas. (Welshy cols., 1.980).

Las cisternas de R.E. podrían estar implicadas en la regula-

ción de los niveles de  $Ca^{++}$ , participando ambas estructuras (microtúbulos y cisternas de R.E.) en el control de secreción de proteínas por la célula de Sertoli, para ser captadas por la espermatida.

Las cisternas de R.E. en la espermatida 19, se encuentran íntimamente relacionados con los complejos túbulo-bulbares que en ella aparecen (Olermont y cols., 1.980). Es posible que el control de la liberación de proteínas por la célula de Sertoli y la eliminación de parte del citoplasma de la espermatida a través de los complejos túbulo-bulbares (Russell, 1.979-b) estén relacionados de alguna forma.

## II . HALLAZGOS EN LOS GRUPOS DE ANIMALES SOMETIDOS A TRATAMIENTO

Moorey Price en 1.932 informaban ya de la supresión de la espermatogénesis ocasionada por el tratamiento estrogénico, lo que es confirmado posteriormente por varios autores (Matthews y cols. 1.942, Jean 1.961, Kincl y cols. 1.963). Sin embargo todos estos autores se limitan a constatar una disminución del peso y volúmen testicular, junto con el diámetro del túbulo - seminífero, la aparición de células germinales en la luz de los túbulos, acúmulo de lípidos y, lo que según ellos, se trata de una inhibición de la espermatogénesis. Cuando el tratamiento se efectúa en animales recién nacidos, se detecta además un aumento en el porcentaje de criptorquideas (Jean, 1.961 Jean-Faucher y cols. 1.976).

Lacy y Lofts (1.965), son los únicos que plantean la necesidad

de establecer la secuencia de cambios que se producen hasta llegar a esa situación terminal, y que aplican por primera vez la microscopía electrónica al estudio de las alteraciones producidas. Sin embargo, desde nuestro punto de vista, no consiguen cumplir su objetivo, porque estos autores empiezan sus observaciones después de transcurrido un mes de iniciado el tratamiento, cuando ya las lesiones producidas han llegado a una situación que puede considerarse terminal.

También el trabajo de Lu y Steinberger (1.978) es de los pocos que aplica la microscopía electrónica al estudio de las alteraciones producidas por el tratamiento crónico con estrógenos, pero tampoco llegan a establecer cuál es la secuencia en las alteraciones producidas, ni cuáles los principales tipos celulares afectados, puesto que su material procede de biopsias efectuadas a pacientes sometidos a tratamiento estrogénico durante un año o más tiempo.

Con todo, el estudio que efectúan Lacy y Lofts, es el más completo que hemos encontrado después de una revisión exhaustiva de la bibliografía existente sobre el tema. Así, son los primeros que establecen que existen diferentes grados de afectación en los túbulos y que unos animales se afectan más que otros. También describen por primera vez la existencia de células germinales anormales con núcleos picnóticos y, aunque indican que en las células de Sertoli no se observa alteración alguna, sí observan que sus núcleos se encuentran desplazados de su localización habitual sobre la lámina propia, hacia la luz del túbulo, en algunas ocasiones.

Al estudiar nuestras preparaciones encontramos cuatro alteraciones que a simple vista llaman la atención:

En el túbulo seminífero:

1. La presencia de células germinales degeneradas.
2. La descamación de las células más superficiales del epitelio a la luz tubular.
3. Las alteraciones descritas en la lámina propia.

y, en el intersticio:

4. La progresiva sustitución de las células de Leydig por el nuevo tipo celular descrito.

Todos los autores consultados hablan en sus resultados de la inhibición de la espermatogénesis por el tratamiento estrogénico, incluso algunos de ellos (Lacy y Lofts, 1.965), hablan de una mayor o menor sensibilidad de cada uno de los tipos celulares. Por ello, en principio, centramos nuestra atención en el estudio de las células germinales degeneradas, con el fin de establecer si esta alteración era selectiva, afectando a uno o varios tipos celulares de forma específica. Sin embargo, hemos encontrado que, cualquiera de las células de la línea germinal, pueden observarse con mayor o menor grado de alteración, llegando hasta la necrosis y posterior lisis del resto celular, lo que deja un espacio vacío en el seno del epitelio. No hemos efectuado, sin embargo, un estu

dio cuantitativo y no podemos decir, por tanto, con certeza si efectivamente existe una mayor sensibilidad por parte de determinados tipos celulares. No obstante, pensamos que el que se señale como más afectados a los espermatoцитos paquíténicos, se debe a la mayor facilidad existente para detectar estas células, por su mayor tamaño y a la mayor frecuencia con la que aparecen, puesto que se encuentran en todas las etapas del ciclo del epitelio seminífero, con excepción de las XII y XIII.

Intentamos también establecer si la afectación de uno u otro tipo celular dependía de la fase evolutiva en que se encontrara en el momento de iniciarse el tratamiento, calculando cuál sería ésta, puesto que conocemos los tiempos de duración de cada uno de los pasos del proceso espermatogenético, y tampoco hemos encontrado ninguna correlación en este sentido.

El estudio del proceso de descamación de las células del epitelio, nos ha proporcionado más datos que nos ayuden a cumplir nuestros objetivos.

Hemos tenido en cuenta que el testículo es una glándula citógena de naturaleza holocrina, especializada en la liberación de espermatozoides, y que la unidad funcional principalmente implicada en este proceso, el túbulo seminífero, está constituida por un epitelio estratificado en el que las células más superficiales que se "descaman", no son células más o menos degeneradas -como suele ocurrir en otros epite-

lios estratificados-, sino células muy activas y altamente especializadas, y su liberación no constituye una auténtica descamación, sino un proceso en el que probablemente la célula de Sertoli participa de forma activa (Russell, 1.979-a). Por ello, pensamos que la liberación de células germinales inmaduras a la luz necesariamente tenía que deberse a la - afectación de las células de Sertoli, a pesar de que todos los autores las han señalado hasta ahora como las células - más resistentes del epitelio seminífero (Lu y Steinberger, 1.978 y Libbus y Schuetz, 1.980). Tenemos además que tener en cuenta que en los animales del grupo control hemos podido constatar la existencia de diferenciaciones de unión entre las membranas de todas las células de la línea germinal y las células de Sertoli.

Efectivamente, el hecho de que las células germinales degeneren, no determina su liberación a la luz del túbulo, sino que normalmente, quedan en el seno de las prolongaciones la terales de las células de Sertoli, en cuyo citoplasma se ad vierte un aumento de las vesículas lisosomiales. Su necro-- sis y lisis posterior deja un espacio vacío que otras células tenderán a ocupar a continuación, restaurando la solución de continuidad que se había producido. Sin embargo, la mayo r ía de las células que encontramos en la luz tubular, no - presentarán signo alguno de degeneración, y, como hemos vis to, pertenecen siempre a la misma asociación celular, lo - que es indicativo de que se han liberado a la luz al mismo tiempo. Ross (1.974), estudiando cortes longitudinales de - túbulo seminíferos de animales a los que se había ligado -

el conducto deferente, describe la organización columnar - de las células del epitelio seminífero alrededor de cada - una de las células de Sertoli. Esto nos hizo pensar que la retracción de las prolongaciones apicales de las células de Sertoli, podrían justificar esta caída masiva a la luz de - asociaciones celulares casi completas, en las que suelen - faltar las células de posiciones más basales, que quedan en la pared tubular. La tendencia a restablecer los contactos entre las células que quedan produce una gran desorganiza-- ción del perfecto orden con que normalmente se encuentran, apareciendo, además, entre sus membranas, diferenciaciones de unión atípicas, cuya naturaleza no hemos podido llegar a establecer de forma precisa con las técnicas utilizadas, y que se ven como si grandes superficies de la cara externa de las membranas se fusionaran entre sí.

Esta descamación celular es la responsable de la disminución del peso y volúmen testicular y del diámetro de los túbulos. Las células mioideas de la lámina propia se contraen, para - adaptar su superficie al nuevo contenido celular y, como con-- secuencia de ello, las células endoteliales se solapan en-- tre sí y las membranas basales situadas entre ambas láminas celulares se ondulan. Todo ello es lo que determina el "en-- grosamiento" de la lámina propia que otros autores se han - limitado a poner de manifiesto (Lynch y Scott, 1.951, Maqueo y Kincl, 1.964, Lacy y Lofts, 1.965, Lu y Steinberger, 1.978, Rodríguez Rigau, 1.977 y Libbus y Schuetz, 1.979), si bien, en realidad, no existe un aumento en la cantidad de tejido conectivo. Aunque debido a que en las piezas preparadas pa-

ra el estudio con microscopía electrónica eliminábamos la túnica albugínea para mejor difusión del líquido fijador, y, - por tanto no hemos podido proceder a su estudio, las imágenes de microscopía óptica y el aspecto macroscópico que presentaba la glándula, parecen indicar que ésta también reacciona - adaptándose a su contenido, aunque éste, no quede tan empaquetado como estaba en los animales del grupo control.

La disminución del peso testicular empieza a ser significativa a partir de los diez días de tratamiento, lo que coincide con el momento en que las imágenes nos ponen de manifiesto - que la alteración es patente. El descenso más brusco se produce entre los once y los quince y los 16 y los 20 días, que, es cuando la descamación se produce de forma más masiva. Después parece que la disminución de los pesos tiende a estabilizarse, dado que casi todos los túbulos han sido afectados por la descamación, y las células que se eliminan por el epidídimo son ya escasas.

Cuando la afectación del túbulo se está iniciando, las únicas alteraciones perceptibles son la existencia de alguna célula germinal degenerada y/o desplazada de su localización habitual. Este desplazamiento, sólo puede justificarse por el - desprendimiento de la célula germinal de su anclaje a la célula de Sertoli, posiblemente por estar ésta alterada.

Aunque se descaman las células más superficiales del epitelio, por las células basales que quedan se puede seguir reconociendo la etapa celular a que pertenecen. Las espermatogonias y

espermatoцитos siguen entrando en mitosis en las etapas en que corresponde, lo que quiere decir que la iniciación del proceso espermatogénico es independiente de sustancias - cuya liberación o síntesis dependa de las células germinales más maduras, puesto que éstas faltan en estos túbulos, lo - que, desde nuestro punto de vista, despeja la incógnita existente respecto a si la iniciación de la espermatogénesis depende de las últimas etapas del ciclo del epitelio seminifero, como han propuesto algunos autores. Esto concuerda - con el hecho de que, antes de la pubertad, aunque no se produzcan espermatozoides, existen las asociaciones celulares características de cada etapa, aunque falten las células - más superficiales del epitelio. (Courot, 1970).

En los túbulos muy afectados pueden, incluso, llegar a descamarse las células de Sertoli, cuya cantidad disminuye notablemente, lo que está también en contra de la propugnada resistencia de estas células.

Efectivamente, la morfología que presentan las células de Sertoli en los últimos días del tratamiento ponen de manifiesto su afectación. La morfología celular cambia notablemente; no presenta prolongaciones laterales ni apicales y su forma se redondea. Por tanto, las relaciones que mantiene con las células germinales que se conservan, cambian totalmente; las células germinales ya no quedan alojadas en el seno de las excavaciones del citoplasma sertoliano, protegidas por sus prolongaciones, puesto que éstas no existen. - También las diferenciaciones de su membrana están muy alte-

radas: las estructuras que caracterizan la morfología de la barrera hemato-testicular, quedan muy reducidas y no se observan los complejos de unión asimétrica o "hemicomplejos de unión" que se veían en el citoplasma sertoliano, en las zonas de contacto con los distintos tipos de células germinales. (Sin embargo, cuando el epitelio ha podido readaptarse a sus nuevas condiciones, aparecen diferenciaciones de unión que cubren casi toda la superficie de las membranas). El citoplasma sertoliano no carece casi totalmente de organelas. Los microfilamentos y microtúbulos, que son abundantes en condiciones normales, no son visibles ni en el citoplasma, ni formando parte de los complejos de unión especiales que constituyen la barrera hemato-testicular, cuando se enfrentan a otra célula de Sertoli vecina, o a la zona de anclaje a la que se adosan las células germinales.

Por nuestras observaciones, estamos de acuerdo con Ross (1976), en que estos "hemicomplejos de unión especializados", que encontramos en el citoplasma sertoliano subyacente a la región de la membrana especializada en contactar con las espermátidas tipo 1, la van a acompañar durante toda la espermiogénesis, siendo responsables de la orientación de la región acrosómica de la espermátida y sirviendo de "vehículo de transporte" de ésta, primero hacia las regiones basales del epitelio (hasta las etapas XIII y XIV) y, posteriormente, de éstas hacia la luz, hasta su reabsorción para la liberación del espermatozoide.

En el estudio efectuado del material procedente de los anima-

les del grupo control, hemos observado que estos "hemicomplejos de unión especializados" acompañan a las células germinales desde sus primeros estadios evolutivos, apareciendo asociados a las espermatogonias. Puesto que formando parte de ellos aparecen haces de microfilamentos y cisternas de retículo endoplásmico que corren paralelas a la membrana, pensamos que es muy probable que esta estructura participe en la organización de la morfología del citoplasma sertoliano que se relaciona con las células germinales, formando los microfilamentos parte del citoesqueleto. Asimismo, esta estructura da la impresión de ser la responsable de la translocación de las células de la línea germinal a las diferentes posiciones que van ocupando en el epitelio seminífero, según sea su grado de desarrollo. Además, podrían intervenir también en la regulación del intercambio metabólico entre ambos tipos celulares.

Las funciones que se les atribuye a los microfilamentos en la literatura (formación de la barrera hemato-testicular -Neaves, 1977-, translocación de las células germinales -Ross, 1976-, participación en los fenómenos de secreción de proteínas -Welsh y cols., 1980- y contribución al mantenimiento de la forma celular) y las imágenes observadas, nos sugieren que los microfilamentos del citoplasma sertoliano podrían regular el flujo citoplasmático, acoplado al ciclo del epitelio seminífero; cuando en la etapa VIII, después de la espermiación, la prolongación apical de la célula de Sertoli, que hasta este momento había sostenido a la espermatida, entra en regresión, y el citoplasma contenido en ella se desplaza a localizaciones más basales. Seguramente, este reajuste del citoplasma y contorno de la célula de Sertoli, se coordina con el que ocurre en la misma

célula en zonas más basales, que alojan a las espermatidas 8 de esta fase, coincidiendo con la reorientación del polo acrosómico del núcleo. En resumen, se trata de un desplazamiento del citoplasma de las células de Sertoli de zonas apicales a regiones más basales, donde va a ser necesario en la etapa siguiente (emisión de prolongaciones laterales, en forma de lámina, que se interponen entre la lámina propia y el espermatocito, para promover el paso de éste a través de la barrera hemato-testicular).

En las células de Sertoli, alteradas por el tratamiento estrogénico, el sistema de microfilamentos entra en regresión, hasta llegar a desaparecer, y éste podría ser el motivo de que las prolongaciones apicales de las células de Sertoli regresaran, liberándose así los elementos más superficiales del epitelio, que éstas alojan. Fallaría además el flujo del citoplasma sertoliano de unas regiones a otras, y la formación de prolongaciones laterales y, de esta forma, la descamación iría afectando a células germinales que ocupan posiciones más basales. Debido a ello, no se formaría la prolongación sertoliana que, en la etapa IX, se introduce entre la lámina propia y los espermatocitos leptoténicos, "empujándoles" en su paso a través de la barrera hemato-testicular, lo que podría explicar la localización de espermatocitos paquiténicos en el compartimento basal, por debajo de la barrera, el desplazamiento de la célula de Sertoli de su localización habitual hacia la luz del túbulo y la pérdida de su forma ramificada, para convertirse en una célula redondeada.

Otro mecanismo que puede contribuir al desplazamiento de la célula de Sertoli puede ser, también, como ya indicábamos, la ocupación de los espacios dejados por células degeneradas o descama-

das y el comportamiento de la lámina propia.

También es posible que el cambio morfológico que, en condiciones normales, experimenta la célula de Sertoli en la etapa VIII, esté mediatizado por los microfilamentos. La regresión de éstos podría entorpecer la vuelta del núcleo a su localización habitual, contribuyendo, de esta forma, a que las células de Sertoli lleguen incluso a ocupar posiciones superficiales del epitelio, y a desprenderse a la luz del túbulo.

Los resultados de Chevalier y Dufaure, 1981, concuerdan con la primera hipótesis propuesta. Estos autores encuentran que la forma de las células de Sertoli depende de la organización de sus microfilamentos que, a su vez, es dependiente del flujo de  $Ca^{++}$ , en cuya regulación está implicado el equilibrio entre la testosterona y la FSH, mientras que la LH no parece tener efecto alguno. La testosterona induciría una liberación de  $Ca^{++}$ , con la consiguiente organización de los filamentos de actina. Esto explicaría, posiblemente, el hecho de que las cisternas de retículo endoplásmico se encuentren asociadas siempre a los haces de microfilamentos.

Con el descenso de testosterona debido al tratamiento estrogénico, se produce una desorganización de los filamentos de actina, dejando de observarse éstos y las cisternas de retículo endoplásmico que los acompaña.

Los cambios en el flujo del  $Ca^{++}$  están siempre ligados al flujo de otros iones divalentes y, en particular, al  $Mg^{++}$ , que se sabe está implicado en la actividad ATPasa.

Los resultados de Chevalier (1978 y 1979), ponen de manifiesto la inhibición del citoesqueleto de las células de Sertoli, desencadenada por la hipofisectomía. Dado que es la presencia de FSH la que implica la desorganización de los microfilamentos, y que la LH no parece influir (Chevalier y Dufaure, 1981), tenemos que pensar que esta desorganización se debe al descenso de los niveles de testosterona, como consecuencia de la hipofisectomía. Igual ocurriría en nuestro caso. Aunque los niveles de gonadotropinas estarían inhibidos por el tratamiento estrogénico, el que la LH no tenga influencia, parece querer decir que este efecto se debe a una acción directa de los estrógenos sobre el testículo, y más concretamente sobre la síntesis de testosterona por éste. La célula de Leydig, bajo la acción del tratamiento estrogénico, se transforma en una célula indiferenciada, de aspecto mesenquimatoso, en cuyo citoplasma no pueden observarse ni mitocondrias ni retículo endoplásmico liso, lo que quiere decir que no existe síntesis de testosterona. (Observado también por Zirkin y cols., 1980).

Jean-Faucher y cols. (1976), tras someter a ratas macho a tratamiento estrogénico, encuentran también una disminución en los niveles de testosterona, indicando que ésta probablemente se deba a la alteración de las células de Leydig, dado que la LH plasmática se mantiene dentro de los límites normales. Por otra parte, los efectos sobre el testículo de agentes desorganizadores del citoesqueleto, son muy similares a los obtenidos por nosotros con el tratamiento estrogénico.

Estos datos estarían de acuerdo con los que existen a favor de que los estrógenos actúan en el testículo por un mecanismo de

acción directa (existencia de receptores específicos para el estradiol en la célula de Leydig -Stumpf, 1969; Brinkman y cols., 1972 y de Boer y cols., 1976-, inhibición de las enzimas implicadas en la esteroidogénesis -Goslar y cols., 1966; Baust y cols. 1967; Kaur y Mangat, 1980-, inhibición de la síntesis de éstas -Hsueh y cols., 1978 y Kalla y cols., 1980-).

Como hemos indicado, no se observan microfilamentos ni cisternas de retículo endoplásmico asociadas a las uniones entre las células de Sertoli. No hemos comprobado si la barrera hemato-testicular está alterada desde el punto de vista funcional, pero su aspecto es muy diferente al que presenta en los animales del grupo control. Este hecho contrasta con los hallazgos de Vitale (1973), que encuentra un retraso en la aparición de la barrera en animales nacidos de madres tratadas con estrógenos durante la gestación, pero que no observa alteración alguna en su morfología. Es posible que en estos animales pueda producirse una recuperación de las células de Leydig, revirtiendo así sus alteraciones.

La aparición del satélite nucleolar podemos interpretarlo, junto con la disminución de la presencia de orgánulos citoplásmicos, como un signo de regresión de la célula de Sertoli a etapas más inmaduras o de inhibición de la actividad celular. Esto justificaría los resultados de Libbus y Schuetz (1979), que encuentran que las células de Sertoli de ratas inmaduras, después de la administración prolongada de benzoato de estradiol, conservan su capacidad de entrar en la fase S del ciclo celular durante más tiempo que los animales del grupo control.

La capacidad fagocítica de la célula de Sertoli queda claramente establecida en las condiciones de nuestro modelo experimental en lo que coincidimos con otros uatores. (Clegg y Mc Millan, 1965 y Carr y cols., 1968).

También el aumento de células germinales degeneradas podría justificarse por la afectación de las células de Sertoli, ya que actúa como intermediaria en su metabolismo, y su localización proyectándose desde la base hasta la luz del túbulo, hace que las células superficiales no presenten signos de degeneración, como ocurre en otros epitelios estratificados.

No obstante, como ya hemos indicado, no hemos encontrado que esta degeneración se produzca de forma selectiva, ya que afecta a todas las células de la línea germinal. Lo que sí es probable es que determinados tipos celulares sean más sensibles, lo que no hemos comprobado, puesto que no hemos aplicado un método de estudio cuantitativo.

Algunas alteraciones, como, por ejemplo, la aparición de espermatidas binucleadas, sí podrían ser privativas de este tipo celular, dado que no hemos visto espermatogonias o espermatocitos binucleados. La ausencia de citocinesis, quizás pueda explicarse por la desorganización de los microtúbulos y microfilamentos, lo que estaría de acuerdo con los hallazgos de Russell y cols. 1981.

La mayoría de los autores (Moore y Price, 1932, Matthews y cols. 1942, Lynch, 1952, Kincl y cols., 1963, Jean, 1961, Lacy y Lofts, 1965, Rodríguez Rigau, 1977 y Libbus y Schuetz, 1980), hablan de inhibición de la espermatogénesis por el tratamiento estrogénico. Aunque no es ponen de acuerdo respecto al punto en que ésta se produce, en general, coinciden en que la espermatogénesis no evoluciona más allá de la espermatida 8.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que no existe tal inhibición, si como tal entendemos la parada del proceso espermatogénético en un punto concreto. Si esta parada o retraso tuviera lugar, no se conservarían las distintas asociaciones celulares y encontraríamos las células afectadas en etapas posteriores a la que les correspondiese. Sin embargo, no hemos podido constatar este hecho, y sí, únicamente, la descamación más o menos masiva, de células que no presentan signo alguno de degeneración, lo que encaja con nuestra hipótesis de que la célula principalmente afectada es la célula de Sertoli. Debido a la desorganización de los microfilamentos de actina, las prolongaciones citoplasmáticas de la célula de Sertoli entran en regresión, o no llegan a formarse, adquiriendo la célula formas redondeadas, por lo cual son incapaces de sostener a las células de la línea germinal, y éstas se descaman a la luz del túbulo.

Debido a que las células que primero se descaman son las más superficiales del epitelio, al estar las espermátidas de los tipos 1 a 8 protegidas por una línea celular de espermátidas más maduras que ellas, son éstas las primeras que se descaman, dando la impresión de que la espermatogénesis está inhibida a partir de la espermátida 8. Sin embargo, como queda recogido en nuestros resultados, tras un estudio más minucioso, en túbulos ya muy degenerados, es posible ver todavía espermátidas 13 ó 14, debido a que éstas ocupan posiciones basales.

El que el número de células germinales maduras se vea disminuido con relación al que cabría esperar, se debe a que se han descamado las células que deberían acompañarlas, o sus progenito-

ras. De ahí, el que el número de espermátidas esté muy disminuido.

Libbus y Schuetz (1980), utilizando técnicas de marcaje con timidina tritiada, indican que en los animales sometidos a tratamiento estrogénico hay una disminución en la incorporación de timidina, con relación al grupo control, lo que atribuyen a la inhibición de las mitosis. Por nuestra parte, pensamos que las mitosis no están, en general, inhibidas, aunque pueda encontrarse cierto porcentaje de alteraciones en ellas, lo que sí ocurre es que las células que deberían entrar en mitosis, no lo hacen porque se han descamado, hecho que estos autores no tienen en cuenta.

Los mismos autores informan que estas alteraciones se previenen por el tratamiento simultáneo con gonadotropinas, lo que puede encajar con nuestra hipótesis, dado que la LH estimularía la célula de Leydig, antagonizando la inhibición de los estrógenos, con lo cual se restablecerían los niveles normales de testosterona.

Siempre que la espermatogénesis no se completa, los lípidos se acumulan en grandes cantidades (Lynch y Scott, 1951, Lacy y Lofts, 1961 y 1965 y Chung y Hamilton, 1975). Lacy y Lofts, 1961, encuentran que en el caso de radiación del testículo o de tratamiento estrogénico, los lípidos que se acumulan dan positivo el test para la progesterona o sus metabolitos y concluyen que la célula de Sertoli debe elaborar alguna hormona esteroidea que, normalmente, se utiliza durante la espermato-

génesis. Esta hormona esteroidea podría ser el estradiol, cuya síntesis, algunos autores, localizan en la célula de Sertoli (Cf. pg. 77 y sgtes.). La misión del estradiol sería actuar sobre la célula de Leydig, inhibiendo la biosíntesis de testosterona.

Boitani y Ritzén (1981), establecen que los estrógenos testiculares disminuyen en las etapas VII y VIII del ciclo, como consecuencia de la inhibición de su síntesis por un factor termorresistente, de tamaño molecular elevado, que inhibe la actividad aromataza en la célula de Sertoli. Este factor inhibidor de la síntesis de estrógenos podría pasar a la célula de Sertoli con el cuerpo residual, o a través de los complejos túbulobulbares de la espermatida 19. La célula de Sertoli dejaría entonces de sintetizar estrógenos y éstos de inhibir la síntesis de testosterona por la célula de Leydig.

Así pues, la iniciación de las mitosis por las espermatogonias y las primeras etapas de la espermatogénesis parecen ser independientes de la consecución del proceso espermatogénico. Sin embargo, a partir de determinado momento, sí que la evolución del proceso parece depender de las últimas etapas. Es posible que esa dependencia comience a partir del momento en que la testosterona es necesaria para la reorganización del citoesqueleto de la célula de Sertoli. La inhibición de la espermatogénesis que se produjera, en todo caso, desde nuestro punto de vista, no sería directamente sobre un paso concreto del desarrollo de las células germinales, cuyos cambios morfológicos deben venir determinados, casi totalmente, de forma genética. Sin embargo, es probable que necesiten de la concurrencia de algún factor ambiental que las proporcione su alojamiento en el seno

de la célula de Sertoli. Así, por ejemplo, hemos encontrado en nuestro trabajo, con relativa frecuencia, espermátidas 18 degeneradas, cercanas a la base, en el seno del citoplasma sertoliano. Es posible que ello se daba a la falta de organización de los microfilamentos que deben constituir el citoesqueleto de la prolongación apical encargada de transportar a la espermátida desde las posiciones basales que ocupa, hasta la luz del túbulo.

La inhibición de la testosterona parece producirse con las primeras dosis del tratamiento. Las alteraciones morfológicas empiezan también a observarse a partir de los 4 ó 5 primeros días, lo que quiere decir que la falta de testosterona repercute de forma inmediata sobre la célula de Sertoli. Sin embargo, no todas las células de Sertoli se afectan al mismo tiempo y, en algunos túbulos, las lesiones empiezan a apreciarse de forma muy tardía, sin que hayamos podido dilucidar la causa de este hecho.

Es posible que los niveles de testosterona necesarios para la organización de los microfilamentos estén dentro de unos límites relativamente amplios y, aunque la producción de testosterona por el testículo esté inhibida, en general, al ser progresiva la afectación de las células de Leydig, los túbulos que se encontraran cercanos a células de Leydig mejor conservadas dispondrían de mayor cantidad de testosterona. El que la afectación de las células de Leydig no sea uniforme podría deberse a su posición con respecto a los capilares.

No hemos centrado nuestro estudio en las células de Leydig, pe

ro nuestra suposición concuerda con los resultados de Cunningham y Huckins (1979), quienes indican que el mantenimiento de la es permatogénesis completa en la rata adulta, no depende de niveles altos de testosterona intratesticular.

La aparición de grandes acúmulos de lípidos es más tardía. Es posible que estos lípidos que se acumulan sean esteroides precursores del estradiol. Las dosis de benzoato de estradiol inyectadas son suficientes para producir la inhibición de las gonadotropinas (Grotjan y Steinberger, 1978, van der Molen y cols. 1981). Si, como parece por las últimas investigaciones realizadas (Means, 1977 y Steinberger y Steinberger, 1977), la FSH estimula la síntesis de estrógenos por la célula de Sertoli, has ta que la producción de ésta no ha sido inhibida por el benzoato de estradiol exógeno, no se producirá la frenación del paso en que intervenga y, mientras que esta situación de síntesis de estrógenos inhibida no se prolongue durante cierto tiempo, el acúmulo de los esteroides precursores no será suficiente para que podamos observarlos.

Por supuesto, con las dosis utilizadas en nuestro experimento las gonadotropinas necesariamente tienen que estar inhibidas, y la disminución de testosterona, en este caso, más que a los estrógenos, puede deberse a la falta de LH que estimule a la célula de Leydig. No obstante, en condiciones fisiológicas, aunque los niveles plasmáticos de estrógenos en sangre sean diez veces superiores a los normales, las concentraciones de LH y FSH no se ven alteradas (van der Molen y cols., 1981). Luego, en condi ciones fisiológicas, no parecen ser capaces de ejercer su efecto inhibitor.

Además, parece lógico pensar que, dado que la contribución del estradiol testicular a la cantidad total de estradiol circulante en los machos, es pequeña (5-25%), el estradiol testicular debe jugar un papel mínimo en las acciones periféricas de esta hormona, tales como la regulación de gonadotropinas, por lo que pensamos que los estrógenos testiculares deben tener una función concreta a realizar en la propia glándula, actuando por un mecanismo de acción directa.

Johnsen (1970), estudiando varios pacientes que padecían síndromes de del Castillo o de Klinefelter, observa que cuanto mayor es el número de espermatozoides que aparecen en los túbulos, menores son los niveles de gonadotropinas. Sin embargo, los niveles de estrógenos testiculares en estas etapas (etapas VII y VIII del ciclo, en que las espermatidas 19 están a punto de liberarse como espermatozoides) alcanzan los niveles más bajos, luego no parece que sean ellos los responsables de ejercer un feed-back negativo sobre las gonadotropinas. Es posible, sin embargo, que la inhibina y/o la testosterona sean las responsables directas de ejercer un control de retroalimentación negativa sobre las hormonas hipofisarias.

El que las dosis de estrógenos utilizados en nuestro experimento sean suficientes para inhibir las gonadotropinas, supone que creamos una situación similar a la producida por la hipofisectomía, lo que nos obliga a comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores a partir de animales hipofisectomizados.

Las imágenes histológicas obtenidas del testículo de estos ani

males, son muy parecidas a los por nosotros observados (Courot, 1970, Russell y Clermont, 1977, Kaur y Mangat, 1977 a y b, Aumüller y Schiller, 1978, Chevalier, 1979, Courtens y Courot, 1980 y Russell y cols., 1981). Sin embargo, Russell y Clermont, 1977 y Russell y cols., 1981, establecen una especificidad en las degeneraciones producidas en las células germinales, fijando las etapas I, VII, XI, XII, XIII y XIV, como las más sensibles a la degeneración, sin que puedan explicar la razón de ello, indicando que podría atribuirse a la célula de Sertoli y sus diferentes estados funcionales, dependientes de las distintas etapas del ciclo.

Igualmente, en los animales hipofisectomizados, se conserva la duración del ciclo, así como la de cada una de las etapas (Clermont y Harvey, 1965).

Courot, 1967, comprueba la disminución del número de células de Sertoli como consecuencia de la hipofisectomía, lo que se evita tratando con LH. Es de suponer que la disminución del número de células de Sertoli se deba a su descamación, aunque el autor no lo indica, y que el tratamiento con LH estimule la producción de testosterona que reorganizaría los microfilamentos de la célula de Sertoli, haciendo que reviertan sus alteraciones.

También las imágenes del testículo de animales en los que se ha practicado enucleación ocular, son similares a las nuestras (Gravis, 1978), lo que podría estar relacionado con la función de control gonadal que ejerce la glándula pineal.

También la dieta deficiente en vitamina A produce en el testículo alteraciones similares al tratamiento estrogénico (Mitrandon y cols. 1979), lo que podría deberse a la influencia de la vitamina A en la polimerización de la actina.

Otras situaciones que, según se ha descrito, presentan imágenes similares, es la de los testículos de animales criptorquídicos (Moore, 1924, Clegg, 1963 a y b, Salle y cols., 1968, Chevalier, 1978). En estos animales, mientras que los niveles de testosterona plasmática están muy por debajo de los normales (Gupta y cols., 1975), los de estrógenos aparecen elevados (Medina y cols., 1980, Damber y Bergh, 1980 y Mann y Lutwak-Mann, 1981). Lo que está de acuerdo con nuestros resultados.

Otras patologías que parecen cursar con elevación de los niveles de estrógenos e imágenes histológicas del testículo semejantes a los obtenidos en nuestro trabajo, y que convendría estudiar con detalle a la luz de nuestros resultados, son el síndrome de Del Castillo, el de Klincfelter y diversos síndromes de feminización testicular.

190

**C O N C L U S I O N E S**

## CONCLUSIONES

- 1ª. Se describe la existencia de un material fibrilar entre la espermatida madura y la célula de Sertoli, que podría constituir la base morfológica de uno de los mecanismos de anclaje que mantiene al espermatozoide antes de ser liberado.
- 2ª. En la cara interna del borde caudal del acrosoma se observa un refuerzo de material electrodense, constituido por varias bandas equidistantes y que no parece modificarse por el tratamiento estrogénico. Esta estructura podría estar relacionada con el dispositivo responsable del deslizamiento del acrosoma sobre el núcleo de la espermatida.
- 3ª. La disminución progresiva del volumen y peso testiculares de la rata macho adulta por el tratamiento con benzoato de estradiol, se hace muy significativa entre los 11 y 15 días del tratamiento (59% del peso del grupo control). Entre los 16 y 20 días el peso queda reducido al 40% y entre los 21 y 25, al 28%, tendiendo después a estabilizarse.
- 4ª. Esta disminución de los pesos testiculares es independiente de que la dosis utilizada de benzoato de estradiol sea de 50 o 250  $\mu\text{g}/\text{d}$ .
- 5ª. Paralelamente a la disminución del volumen y pesos testiculares, el tratamiento crónico con benzoato de estradiol, produce en la rata adulta una disminución progresiva del diámetro de los túbulos seminíferos.

- 6ª. Los días en que es más brusca la disminución del volumen y pesos testiculares y del diámetro del túbulo seminífero (días 11 a 25), coinciden con aquellos en que las imágenes histológicas muestran una descamación masiva del epitelio.
- 7ª. La disminución de la testosterona plasmática por el tratamiento estrogénico es significativa (5º día) antes de que lo sea la disminución del peso testicular, o las imágenes histológicas muestren una desoamación apreciable del epitelio seminífero. Dicha disminución de los niveles de testosterona se mantiene constante durante todo el tiempo que dura el tratamiento.
- 8ª. El aumento de espesor de la lámina propia del túbulo seminífero producido por el tratamiento estrogénico, se debe a la gran capacidad contráctil de sus células mioideas.
- 9ª. El gran aumento del número de células degeneradas de la línea germinal, en el testículo sometido a tratamiento estrogénico, es, en base a nuestros datos morfológicos, totalmente inespecífica, apareciendo afectados todos los tipos celulares. No podemos, por tanto, establecer un punto concreto de detención en el proceso de la espermatogénesis.
- 10ª. En el citoplasma de la célula de Sertoli, como consecuencia del tratamiento crónico con benzoato de estradiol, se acumulan grandes gotas de lípidos, más o menos confluentes y carentes de membrana limitante. A los 35 días de tratamiento, estos lípidos pueden llegar a cubrir aproximadamente la cuarta parte de la sección del túbulo.

- 11<sup>a</sup>. El aspecto ultraestructural de los cuerpos de inclusión que aparecen en el citoplasma de la célula de Sertoli tras el tratamiento con benzoato de estradiol, son prueba evidente de la capacidad fagocítica de estas células.
- 12<sup>a</sup>. El tratamiento crónico con benzoato de estradiol, induce la reaparición en la célula de Sertoli del satélite nucleolar, así como la disminución de organelas citoplasmáticas, adquiriendo, desde el punto de vista ultraestructural, un aspecto que se asemeja al de las células de Sertoli de animales prepuberales.
- 13<sup>a</sup>. En las diferenciaciones de unión entre las membranas de las células del epitelio seminífero sometidas a tratamiento crónico con benzoato de estradiol, las superficies de contacto parecen aumentadas y llegan a desaparecer los haces de microfilamentos, disminuyendo notablemente las cisternas asociadas de retículo endoplásmico.
- 14<sup>a</sup>. La descamación del epitelio seminífero ocasionada por el tratamiento estrogénico, no parece deberse a la afectación de las diferenciaciones de unión entre las membranas celulares, dada la morfología que las mismas presentan.
- 15<sup>a</sup>. El sistema de microfilamentos que constituyen el citoesqueleto de la célula de Sertoli, se desorganiza como consecuencia del tratamiento con benzoato de estradiol. Esta desorganización origina la pérdida de su forma ramificada.
- 16<sup>a</sup>. La pérdida de las prolongaciones citoplasmáticas de la célula

la de Sertoli, debida a la afectación de su citoesqueleto por el tratamiento estrogénico, origina la descamación del epitelio seminífero.

17<sup>a</sup>. En base a nuestros resultados, podemos postular que el flujo citoplasmático de la célula de Sertoli, acoplado al ciclo espermatogénico, podría ser el responsable de la coordinación de éste, originando las prolongaciones citoplasmáticas encargadas de la translocación y sostén de las células de la línea germinal. A su vez, este flujo citoplasmático parece depender fundamentalmente de la organización de los microfilamentos.

18<sup>a</sup>. Nuestros datos experimentales apoyan la hipótesis de que la célula de Sertoli sintetiza estradiol y de que éste, junto con la testosterona, regularía la polimerización-despolimerización de los microfilamentos.

19<sup>a</sup>. Nuestros resultados están de acuerdo con la hipótesis de que la regulación de las primeras etapas del proceso espermatogénico no depende de los últimos estadios del mismo.

101

B I B L I O G R A F I A

ALBERT, A.: Sex and Internal Secretions. Ed. Young W.C., Williams and Wilkins, Vol. 1:305-365. Baltimore, 1961.

ALONSO, R.; PRIETO, L. y MAS, M.: Increase in Pituitary levels of LH and FSH after pinealectomy in both, intact and castrated male rats. *Endocr.* 202:1534 (1978).

ALLEN, E.: Studies on cell division in the albino rat. III. Spermatogenesis. The origin of the first spermatocytes and the organization of the chromosomes, including the accessory. *J. Morph.* 31:133 (1918).

ANBERG, A.: The ultrastructure of the human spermatozoon. *Acta Obst. Gynec. Scan.* 36 (Suppl. 2):1 (1957).

AUMÜLLER, G; SCHILLER, A.; SCHENCK, B. y BERSWORDT-WALLRABE, R.: Fine structure of Sertoli cells in the rat testis after hypophysectomy, testosterone treatment and reinvolution. *Cytobiol.* 17:453 (1978).

BALLOWITZ, E.: Weitere Beobachtungen über den feineren Bau der Säugethierspermatozoen. *Z. Wiss. Zool.* 52:217 (1897).

BAUST, P.; GOSLAR, H.G. y TONUTTI, E.: Content of some phosphatases in the testicles of the rat, mouse and guinea pig after estrogen treatment. *Acta histochem.* 26:343 (1967).

BEALL, D.: Isolation of oestradiol and oestrone from horse testes. *Biochem. J.* 34:1293 (1940).

- BEDFORD, J.M.: Fine structure of the sperm head in ejaculate and uterine spermatozoa of the rabbit. *J. Repr. Fertil.* 7:221 (1964).
- BENDA, C.: Untersuchungen über den Bau der funktionierenden Samenkanälchen einiger Säugethiere und Folgerungen für die Spermatogenese dieser Wirbelthierklasse. *Arch. Mikr. Anat.* 30:49 (1887).
- BERTHRONG, M.; GOODWIN, W.E. y SCOTT, W.W.: Estrogen production by the testis. *J. Clin. Endocr.* 9:579 (1949).
- BEURDEN, W.M., van; ROODNAT, B.; MULDER, E. y MOLEN, H.J.: Further characterization of the effects of hypophysectomy. FSH and estrogen on LH stimulation of testosterone production in Leydig cells isolated from immature rats. *Steroids* 31:83(1978).
- BEURDEN-LAMERS, M.E.: Testicular estradiol receptors in the rat. Hormone binding and target cell activation. *The Testis*, Vol. IV:343 (1977).
- BIGLIARDI, E. y TALLURI, V.M.: Ultrastructural Details of Sertoli Cell Junctional Complexes in vivo and their Modifications in Tissue Culture. *Cell. Tiss. Res.* 172:29 (1976).
- BLOOM, G. y NICANDER, L.: On the ultrastructure and development of the protoplasmic droplet of spermatozoa. *Z. Zellforsch.* 55:833 (1961).
- BOER, W. de; MULDER, E. y MOLEN, H.J., van der: Effects of oes

tradiol-17- $\beta$ , hypophysectomy and age on cytoplasmic oestradiol-17- $\beta$  receptor sites in rat testis interstitial tissue. *J. Endocr.* 70:397 (1976).

BOITANI, C.; RITZEN, E.M. y PARVINEN, M.: Inhibition of rat Sertoli Cell Aromatase by factors secreted specifically at spermatogenic stages VII and VIII. *Mol. and Cell Endocr.* 23:11(1981)

BOUIN, P. y ANCEL, P.: Recherches sur les cellules interstitielles du testicule chez les mammifères. *Arch. Zool. Expt.Gen.* 1:437 (1903 a).

BRINKMANN, A.O.; MULDER, E.; LAMERS-STAHJHOFER, G.J.; MICHIELSEN, M.J. y van der MOLEN, H.J.: An oestradiol receptor in rat testis interstitial tissue. *FEBS Letters* 26:301 (1972).

BRÖKELMANN, J.: Fine structure of germ cells and Sertoli cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Z. Zellforsch. Mikr. Anat.* 59:820 (1963).

BROWN, H.H.: On spermatogenesis in the rat. *Quart. J. of Micr. Sci.* 25:343 (1885).

BURGOS, M.H. y FAWCETT, D.W.: Studies on the fine structure of the mammalian testis. I. The differentiation of the spermatids in the cat. *J. Bioph. Bioch. Cytol.* 1:287 (1955).

BUSTOS-OBREGON, E.: On Sertoli cell number and distribution in rat testis. *Arch. Biol. (Liège).* 81: 99 (1970).

CANICK, J.A.; MAKRIS, A.; GUNSALUS, G.L. y RYAN, K.J.: Testicular aromatization in immature rats: localization and stimulation after gonadotropin administration in vivo. *Endocr.* 104:285 (1979).

CARR, I.; CLEGG, E.J. y MEEK, G. A.: Sertoli cells as phagocytes. An Electron Microscopical Study. *J. Anat.* 102:501 (1968).

CASTRO, A.E.; ALONSO, A. y MANCINI, R.E.: Localization of FSH and LH in rat testis using immunohistological tests. *J. Endocr.* 52:129 (1972).

CHEVALIER, M.: Sertoli cell ultrastructure. I. A comparative study in immature, pubescent, adult and cryptorchid pigs. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 18 (6):1279 (1978).

CHEVALIER, M.: Sertoli cell ultrastructure. II. Morphological effects of hypophysectomy in pubescent pigs. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* (3A):583 (1979).

CHEVALIER, M. y DUFAURE, J-P.: The effect of FSH, Testosterone and  $Ca^{++}$  on Sertoli Cell Microfilaments in the Immature Pig Testis. *Biol.Cell* 41:105 (1981).

CHOWDHURY, M.; TCHOLAKIAN, R. y STEINBERGER, E.: Reevaluation of effects of estradiol benzoate and human chorionic gonadotropin on the testes and accessory sex glands of the rat. *Acta Endocr.* 96:273 (1981).

CHRISTENSEN, A.K.: The fine structure of interstitial tissue

of the rat testis at various ages and after experimental treatment. *Anat. Rec.* 133:367 (1959).

CHRISTENSEN, A.K.: Fine structure of testicular interstitial cells in humans. *The Human Testis*. 75-93. Rosenberg E. Paulsen, C.A. eds. New York, London, Plenum Press (1970).

CIGORRAGA, S.B.; DUFAU, M.L. y CATT, K.S. : Regulation of LH receptors and steroidogenesis in gonadotropin desensitized Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 253:4227 (1978).

CLARK, R.V.: Three-dimensional organization of testicular interstitial tissue and lymphatic space in the rat. *Anat. Rec.* 184:203 (1976).

CLEGG, E.J.: Studies on artificial cryptorchidism: morphological and quantitative changes in the Sertoli cells of the rat testis. *J. Endocr.* 26:567 (1963 a).

CLEGG, E.J.: Studies on artificial cryptorchidism: degenerative changes in the germinal epithelium of the rat testis. *J. Endocr.* 27:241 (1963).

CLEGG, E. y Mc MILLAN, E.W.: The uptake of vital dyes and particulate matter by the Sertoli cells of the rat testis. *J. Anat.* 99:219 (1965).

CLERMONT, Y.: Contractile elements in the limiting membrane of the seminiferous tubules of the rat. *Exp. Cell Res.* 15:438(1958)

CLERMONT, Y. y BUSTOS-OBREGON, E.: Identification of five classes of type A spermatogonia in rat seminiferous tubules mounted "in toto". *Anat. Rec.* 154:332 (1966).

CLERMONT, Y. HARVEY, S.C.: Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized hormon treated albino rats. *Endocr.* 76:80 (1965).

CLERMONT, Y. y LEBLOND, C.P.: Renewal of spermatogonia in the rat. *Am. J. Anat.* 93:475 (1953).

CLERMONT, Y; LEBLOND, C.P. y MESSIER, B.: Durée du cycle de l'épithélium séminal du rat. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.* 48:37 (1959).

CLERMONT, Y; Mc COSHEN, J. y HERMO, L.: Evolution of the Endoplasmic Reticulum in the Sertoli cell cytoplasm encapsulating the heads of late spermatids in the rat. *Anat. Rec.* 196:83 (1980).

COUROT, M.; Endocrinal control of the supporting and germ cells of the impuberal testis. *J. Repro. Fertil. Suppl.* 2:89 (1967).

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T. y ORTOVANT, R.: Spermatogenesis. *The Testis. I.* (6):339. A.D. Johnsen, W.R. Gomes, M.L. Vandmark Eds. Ac. Press, New York and London (1970).

CUNNINGHAM, G.R. y HUCKINGS, C.: Persistence of complete spermatogenesis in the presence of low intratesticular concentrations of testosterone. *Endocr.* 105:177 (1979).

DAMBER, J.A. y BERGH, A.: Decreased testicular response to acute LH stimulation and increased intratesticular concentration of oestradiol-17- $\beta$  in the abdominal testes in cryptorchid rats. *Acta Endocr.* 95:416 (1980).

DANUTRA, V.; HARPER, M.E.; BOYNS, A.R.; COLE, E.N.; BROWNSEY, B.G. y GRIFFITHS, K.: The effect of stilboestrol analogues on plasma PRL and testosterone in the rat. *J. Endocr.* 57:207 (1973)

DAVIES, T.F.: Characterization of the primate LH in testes homogenates and Leydig cells. *J. Cl. Endocr. Metab.* 48:680 (1979).

DEBELJUK, L.; ARIMURA, A. y SCHALLY, A.V.: Effect of Testosterone and Estrogens on the LH and FSH release induced by LHRH in intact male rats. *Endocr.* 90:1578 (1972).

DECKER, M.H.; LORIAUX, D.L. y CUTLER, G.B. jr.: A seminiferous tubular factor is not obligatory for regulation of plasma FSH in the rat. *Endocr.* 108: 1035 (1981).

DORRINGTON, J.H. y ARMSTRONG, D.T.: FSH stimulates Estradiol-17- $\beta$  synthesis in cultured Sertoli cells. *Proc. Natl. Ac. Sc. USA* 72:277 (1975).

DORRINGTON, J.H. y FRITZ, I.: Cellular localization of 5 $\alpha$ -reductase and 3 $\alpha$ -hydroxysteroid-dehydrogenase in the seminiferous tubule of the rat testis. *Endocr.* 96:879 (1975).

DORRINGTON, J.H.; FRITZ, I. y ARMSTRONG, D.T.: Control of testicular estrogen synthesis. *Biol. of Repr.* 18:55 (1978).

DYM, M.: The fine structure of the monkey (*Macaca*) Sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier. *Anat. Rec.* 175:639 (1973).

DYM, M.: The role of the Sertoli cell in spermatogenesis. *Male Reproductive System*. 155-169. R. Yates and M. Gordon Eds. Raven Press. New York (1977 b).

DYM, M. y CAVICCHIA, J.C.: Functional Morphology of the testis. *Biol. Repr.* 18:1 (1978).

DYM, M. y CLERMONT, Y.: Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following X-irradiation of the rat testis. *Am. J. Anat.* 128:265 (1970).

DYM, M. y FAWCETT, D.W.: The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Repr.* 3:308 (1970).

DYM, M. y FAWCETT, D.W.: Further observations on the number of spermatogonia, spermatocytes and spermatids joined by intercellular bridges in mammalian spermatogenesis. *Biol. Repr.* 4:195 (1971).

EIMERT, T.: Untersuchungen über den Bau die Bewegung der Samen fäden. *Verh. Phys. Med. Ges. Würzb. N.F.* 6:93 (1874).

ELFTMAN, H.: The Sertoli cell cycle in the mouse. *Anat. Rec.* 106:381 (1950).

ELFTMAN, H.: Sertoli cells and testis structure. Amer. J. Anat. 113:25 (1963).

FAKUNDING, J.L. y MEANS, A.: Characterization and FSH activation of Sertoli cell AMPc dependent protein kinasas. Endocr.101: 1358 (1977).

FAKUNDING, J.L.; TINDALL, D.J.; DEDMAN, J.R.; MENA, C.H. y MEANS A.R.: Biochemical actions of FSH in the Sertoli cell of the rat testis. Endocr. 98:392 (1976).

FANG, V.S.; REFETOFF, S. y ROSENFELD, G.L.: Hypogonadism induced by a transplantable prolactin-producing tumour in male rats. Hormonal and morphological studies. Endocr. 95:991 (1974).

FAWCETT, D.W.: The structures of the mammalian spermatozoon. Int. Rev. Cytol. 7:195 (1958).

FAWCETT, D.W.: Intercellular bridges. Exp. Cell. Res. (Suppl B): 1744 (1961).

FAWCETT, D.W.: The anatomy of the mammalian spermatozoon with particular reference to the guinea pig. Z. Zellforsch. 67:279 (1965).

FAWCETT, D.W.: Observations on the organization of the interstitial tissue of the testis and on the occluding cell junctions in the seminiferous epithelium. Adv. in Biosc. 10:83 (1974).

FAWCETT, D.W.: The mammalian spermatozoon. Develop.Biol.44:394

(1975).

FAWCETT, D.W. y BURGOS, M.H.: The fine structure of Sertoli cell in human testis. *Anat. Rec.* 124:401 (1956).

FAWCETT, D. W. y BURGOS, M.H.: Studies on the fine structure of the mammalian testis. II. The human interstitial tissue. *Am. J. Anat.* 107:245 (1960).

FAWCETT, D.W.; HEIDGER, P.M. y LEAK, L.V.: Lymph vascular structure of interstitial tissue of the testis as revealed by Electron Microscopie. *J. Repr. Fert.* 19:109 (1969).

FAWCETT, D.W. e ITO, S.: The fine structure of rat spermatozoa. *Amer. J. Anat.* 116:567 (1965).

FAWCETT, D.W.; LEAK, L.V. y HEIDGER, P.M.: Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J. Repr. Fert. (Suppl.)* 10:105 (1970).

FAWCETT, D.W.; NEAVES, W.B. y FLORES, M.N.: Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Repr.* 9:500 (1973).

FAWCETT, D.W. y PHILLIPS, D.M.: Observations on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage through the epididymis. *J. Repr. Suppl.* 6:405 (1969).

FELDMAN, S.C. y BLOCH, E.: Development pattern of testosterone

synthesis by fetal rat testes in response to LH. *Endocr.* 102: 999 (1978).

FLICKINGER, CH. y FAWCETT, D.W.: The functional specializations of Sertoli cells in the seminiferous epithelium. *Anat. Rec.* 158: 207 (1967).

FRANCHIMONT, P.: Existence of a follicle-stimulating hormone inhibiting factor "inhibin" in bull seminal plasma. *Nature* 257: 402 (1975).

GAY, V.L. y BOGDANOVE, E.M.: Plasma and pituitary LH and FSH in the castrated rat following short-term steroid treatment. *Endoc.* 84:1132 (1969).

GOSLAR, H.G.; BAUST, P. y TONUTTI, E.: Reaction of some dehydrogenase in the testis of the rat, guinea pig and mouse after estrogen treatment. *Acta Histochem.* 25:198 (1966).

GREEP, R.O.: Physiology of the anterior hypophysis in relation to production secretions. Williams and Wilkins. Sex and internal secretions. Vol. 1:240. Ed. Young W.C. Baltimore, 1961.

GREEP, R.O.; FEVOLD, H.L. y HISAW, F.L.: Effect of two hypophyseal gonadotropic hormones on the reproductive system of the male rat. *Anat. Rec.* 65:261 (1936).

GREEP, R.O. y JONES, I.C.: The hypophysis of estrogen treated rats is not efficient to prevent gonadotropin elevation. *Recent Prog. in Horm. Res.* 5:197 (1960).

GROTJAN, H.E. jr. y STEINBERGER, E.: On the relative biological and immunoreactive potencies of LH in the oestradiol benzoate treated male rat. *Acta Endocr.* 89:538 (1978).

HADEK, R.: Study on the fine structure of the rabbit sperm head. *J. Ultrast. Res.* 9:110 (1963).

HAFIEZ, A.; BARTKE, A. y LLOYD, C.: The role of PRL in the regulation of testis function. The synergistic effects of PRL and LH. *J. Endocr.* 53:223 (1972).

HALL, P.F.: Endocrinology of the testis. *The Testis II: 1.* Johnson A.S., Gomes W.R., Van Demark N.L. Eds. Ac. Press. New York (1970).

HANSSON, U.R.; CALANDRA, R.; RURVIS, K. y RITZEN, M.: Hormone regulation of spermatogenesis. *Vitam. Horm.* 34:187 (1976).

HANSSON, V.E.; REUSCH, D.; TRYGSTAD, O.; TORGERSEN, O.; RITZEN, E.H. y FRENCH, F.S.: *Nature*

HENLE, J.: *Traité d'Anatomie Générale on Histoire des Tissus et de la Composition chimique du corps humain. Tome second.* 528 (1843).

HERMANS, W.P.: Inhibin and FSH in male and female rats. *J. Endocr.* 86:85 (1980).

HERMO, L.; CLERMONT, Y. y RAMBOURG, A.: Endoplasmic Reticulum

and Golgi Apparatus Relationships in the Rat Spermatid. *Anat. Rec.* 193:243 (1979).

HOOKER, CH.W.: The intertubular tissue of the testis. *The Testis* I:483. Johnsen, A.D., Gomes, W.R., Vandemark, M.L., Eds. Ac. Press, New York, London (1970).

HSUEH, A.J.W.; DUFAU, M.L. y CATT, K.J.: Regulation of LH receptor in testicular interstitial cells by gonadotropin. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 72:1145 (1976).

HUGGINS, C. y MOULDER, P.V.: Estrogen production by Sertoli cell tumors of the testis. *Cancer Res.* 5:510 (1945).

HUNT, V.C. y BUDD, J.W.: Gynecomastia associated with interstitial cell tumour of the testicle. *Urol. J.* 42:1242 (1939).

IMPERATO-McGINLEY, J.: Steroid 5 $\alpha$ -reductase deficiency in a 65 years old male pseudohermaphrodite: The natural history, ultra structure of the testes, and evidence for inherited enzyme heterogeneity. *J. of Clin. Endocr. Metab.* 50:15 (1980).

JEAN, C.: Malformations genitales induites chez le souris V: les troubles du testicule. *La Cryptorchidie expérimentale.* *Arch. Anat. Micr.* 57:147 (1968).

JEAN, C.: Action de la FSH, de l'estradiol, de la testosterone, de la dihydrotestosterone et de l'ovarie des foetus de souris. *Arch. Anat. Micr.* 62:207 (1973).

JEAN-FAUCHER, C.; BERGER, M.; TURCKHELM, M. de; VEYSSIERE, G.; y JEAN, C.: Effets de l'injection néo-natale d'estradiol, de testostérone et d'acétate de cyprotérone sur le testostérone testiculaire et plasmatique et sur l'appareil génital de la souris male adulte. Arch. Anat. Micr. 65:37 (1976).

JENSEN, O.S.: Untersuchungen über die Samenkörper der Säugethiere, Vögel, und Amphibien. Arch. Mikr. Anat. 30:379 (1887).

JOHNSON, S.G.: Studies on the testicular-hypophyseal feed-back mechanism in man. Acta Endocr. (Suppl.) 90:99 (1964).

JOHNSON, S.G.: The stage of spermatogenesis involved in the testicular hypophyseal feed-back mechanism. Acta Endocr. 64:193 (1970).

JONES, T.H.M.; FANG, V.S.; LANDAU, R.L. y ROSENFELD, R.: Direct inhibition of Leydig cell function by estradiol. J. Clin. Endoc. Metab. 47:1368 (1978).

JONG, F.H. de; HEY, A.H. y MOLEN, H.J. van der: J. Endocr. 57: 277 (1973).

JONG, F.H. de; HEY, A.H. y MOLEN, H.H. van der: Oestradiol-17- $\beta$  and Testosterone in rat testis tissue: Effect of gonadotropins, localization and production. J. Endocr. 60:409 (1974).

JONG, F.H. de y SHARPE, R.M.: Evidence for inhibin-like activity in bovine follicular fluid. Nature 263:71 (1976).

KALLA, N.R.; NISULA, B.C.; MENARD, R. y LORIAUX, D.L.: The effect of estradiol on testicular testosterone biosynthesis. *Endocr.* 106:35 (1980).

KATO, J.: Estradiol receptor in rat testis. *Endocr.* 94:902 (1974).

KAUR, C. y MANGAT, H.K.: Effects of Estradiol Dipropionate on the Biochemical Composition of testis and Accessory sex organs of Adult Rats. *Andr.* 12:373 (1980).

KAYA, M y HARRISON, R.G.: The ultrastructural relationships between Sertoli cells and spermatogenic cells in the rat. *J. Anat.* 121:279 (1976).

KELCH, R.P.; JENNER, M.R.; WEINSTEIN, R.; KAPLAN, S.L. y GRUMBACH, M.M.: Estradiol and testosterone secretion by human, simian and canine testes, in male with hypogonadism and in male pseudohermaphrodites with the feminizing testes syndrome. *J. Clin. Invest.* 51:824 (1972).

KINCL, F.A.; FOLCHPI, A y HERRERA, L.: Effect of estradiol benzoate treatment in the newborn male rat. *Endocr.* 72:966 (1963).

KINGSLEY, B.V. y LACY, D.: Residual bodies of seminiferous tubules of the rat. *Nature* 184:249 (1959).

KOTITE, N.J.; NAYFEH, S.N. y FRENCH, F.S.: FSH and androgen regulation of Sertoli function in the immature Rat. *Biol. Repr.*

18:65 (1978).

KRETZER, D.M., de: The fine structure of the testicular interstitial cells in men of normal androgenic status. *Z. Zellforsch.* 80:594 (1967).

KRETZER, D.M., de; CATT, K.J. y PAULSEN, L.A.: Studies on the in vitro testicular binding of iodinated luteinizing hormone in rats. *Endocr.* 88:332 (1971).

KULIN, H.E. y REITER, E.D.: Gonadotropin suppression by low dose estrogen in men: Eviden for diferential effects upon FSH and LH. *J. Clin. End. Metab.* 35:836 (1972).

LA VALETTE ST. GEORGE, Von: Uber die Genese der Samenkörper. *I. Arch. Mikr. Anat. Entwic.* 12:797 (1876).

LA VALETTE ST. GEORGE, Von: Uber die Genese der Samenkörper. *II. Arch. Mikr. Anat. Entwic.* 15:261 (1878).

LACY, D. y LOFTS, B.: The use of ionizing radiation and oestrogen treatment in the detection of hormone synthesis by the Sertoli cells. *J. Physiol. (Ln.)* 161:23 (1961).

LACY, D. y LOFTS, B.: Studies on the structure and function of the mammalian testis. I. Cytological and histochemical observations after continuous treatment with estrogenic hormone and the effect of FSH and LH. *Proc. Roy. Soc. B.* 162:188 (1965).

LAQUEUR, E.: Uber das weibliche Sexualhormon (Menformon), im

besondern seine Eichung. Arch. Exp. Pathol. Pharm. 119:82(1927)

LAQUEUR, E.; DINGEMANSE, E.; HART, P.C. y JONGH, S.E., de:Über das Vorkommen weiblicher Sexualhormons (Menformon) im Harn von Männern. Klin. Wochenschrift. 6:1859 (1927).

LEBLOND, C.P. y CLERMONT, Y.: Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig revealed by the PAS technique. Am. J. Anat. 90:167 (1952).

LEE, J.A.: Studie of the human testis. XV. ABP and function of Leydig cell and tubules in aged men with prostatic carcinoma. J. Clin. Endocr. Metab. 50:1105 (1980).

LEYNONEN, P.; RUOKONEN, A.; KONITTURI, M y VIHKO, R.: Effects of estrogen treatment in hormone testicular unconjugated steroid sulfate production in vivo. J. Endocr. Metab. 53:569 (1981).

LENHOSSEK, M.: Untersuchungen über Spermatogenese. Arch. Mikr. Anat. 51:215 (1898).

LEVIN, L.: Large amounts of estrogens detected in the urine of the stallion. J. Biol. Chem. 158:725 (1945).

LEYDIG, F.: Zur Anatomie der Männlichen Geschlechtsorgane und Analdrüsen der Säugethiere. Z. Wiss. Zool. 2:1 (1850).

LIBBUS, B.L. y SCHUETZ, A.W.: Gonadotropin-induced reinitiation of meiosis in testes of oestradiol-treated prepuberal rat. J.

Repr. Fert. 60:1 (1980).

LIBBUS, B.L. y SCHUETZ, A. W.: Persistence of Sertoli cell proliferation in estrogen-treated rats. J. Cell Biol. 83:2 (1979).

LINO, B.F.: Cell count connection factors for the quantitative histological analysis of the germinal epithelium of the ram. Anat. Rec. 170:413 (1971).

IOSTROH, A.J.: Effect of FSH and ICSH on spermatogenesis in Long Evans rats hypophysectomized for 6 months. Acta Endocr. 43:592 (1963).

LOUIS, B.G. y FRITZ, I.B.: FSH and Testosterone independently increase the production of ABP by Sertoli cell in culture. Endocr. 95:104 (1979).

LU, CH. C. y STEINBERGER, A.: Effects of Estrogen on Human Seminiferous Tubules: Light and Electro Microscopic Analysis. Am. J. Anat. 153:1 (1978).

LUGGARO, G.; CASELLATO, M.M.; MAZZOLA, G. y FACHINI, G.: Evidence for the existence in spermatozoa of a inhibiting FSH-RH synthesis. Neuroendocr. 15:62 (1974).

LYNCH, K.M.: Recovery of the rat testis following estrogen therapy. Ann. N.Y. Acad. Sci. 55:734 (1952).

LYNCH, K.M. y SCOTT, W.W.: Endocr. 49:8 (1951).

MADDOCK, W.D. y NELSON, W.D.: The effects of chorionic gonadotropin in adult men; increased estrogen and 17-keto-steroid excretion, gynecomastic, Leydig cell stimulation and seminiferous tubule damage. *J. Clin. Endocr. Metab.* 12:985 (1952).

MAIN, S.J.; DAVIES, R.V. y SETCHELL, B.O.: Feed-back control by testis of gonadotrophin secretion: An examination of the inhibin hypothesis. *J. Endocr.* 79:255 (1978).

MANN y LUTWACK-MANN: Testis and Testicular Semen. Male Reproductive Function and Semen. IV. 83:129. Springer Verlag. Paris, New York, Barcelona, Milán, Heidelberg y Berlín. (1981).

MANGINI, R.E.; SEIGUR, A.C. y PEREZ LLORET: Effect of gonadotropins on the recovery of spermatogenesis in hypophysectomized patients. *J. Clin. Endocr. Metab.* 29:467 (1969).

MANCINI, R.E.; VILLAR, D.; LAVIERI, J.C.; ANDRADA, J.A. y HEINRICH, J.J.: Development of Leydig cells in the normal human testis. A cytological, cytochemical and quantitative study. *Am. J. Anat.* 112:203 (1963).

MÁQUEO, M. y KINCL, F.A.: Testicular histomorphology of young rats treated with oestradiol-17- $\beta$ -benzoate. *Acta Endocr.* 46:25 (1964).

MATTHEWS, C.H.S.; SCHWABE, E.L.; EMERY, F.E.: Studies on recovery of the reproductive system of the male rat from regressive changes induced by stilbestrol. *Endocr.* 30:89 (1942).

MAXIMOW, A.: Die histologische Vorgänge bei der Heilung von Hodenverletzungen und die Regenerations-fähigkeit des Hodengewebes. Beitr. Path. Anat. 26:230 (1899).

MC CULLAGH, D.R.: Dual endocrine activity of the testis. Sci. 76:19 (1932).

MEANS, A.R.: Mechanism of Action of Follicle-Stimulating Hormone (FSH). The Testis IV:163. A.D. Johnsen, W.R. Gomes Eds. Ac. Press. New York, S. Francisco, London. (1977).

MEDINA, M.; ULLOA-AGUIRRE, A.; FERNANDEZ, M.A. y PEREZ-PALACIOS G.: The role of estrogens on gonadotrophin secretion in the testicular feminization syndrome. Acta Endocr. 95:314 (1980).

MERCHAN, J.: Preservación de tejidos para microscopía electrónica. Trab. Inst. Cajal Inv. Biol. 56:74 (1974).

MESS, B.: Influence of hypothalamic injury on spermatogenesis in albino rats. Acta Morph. 2:275 (1952).

MITRANOND, V.; SOBHON, P.; TOSUKHOWONG, O. y CHINDADUANGRAT, W.: Cytological changes in the testes of vitamin-A-deficient rats. I. Quantitation of germinal cells in the seminiferous tubules. Acta Anat. 103:159 (1979).

MOLEN, H.J., van der; BRINKMANN, A.C.; JONG, F.H. y ROMMERES, F.G.: Testicular estrogens. J. Endocr. 89:33p (1981).

MOORE, C.R.: Properties of the gonads as controllers of soma-

tic and physical characteristics. *Am. J. Anat.* 34:269 (1924).

MOORE, C.R. y PRICE, D.: Gonad hormone functions, and the reciprocal influence between gonads and hypophysis with its bearing on the problem of sex antagonism. *Am. J. Anat.* 50:13 (1932)

MULDER, E.; BRINKMANN, A.O.; LAMERS-STHLHOFEN, G.J.M. y MOLEN, H.J., van der: Binding of oestradiol by the nuclear fraction of rat testis interstitial tissue. *Febs. Letts.* 31:131-136 (1973).

NAGANO, T. y SUZUKI, F.: Freeze-Fracture Observations on the Intercellular Junctions of Sertoli Cells and of Leydig Cell in the Human Testis. *Cell Tis. Res.* 166:37 (1976).

NEAVES, W.B.: The Blood-Testis Barrier. *The Testis* IV:126. Ed. A.D. Johnsen, W.W. Gomes. Ac. Press. New York, London (1977).

NELSON, W.J.: Inter-relation of gonadotropic and gonadal hormones in the regulation of testicular functions. *Ciba Found. Colloq. Endocr.* 4:271 (1952).

NICANDER, L.: An Electron Microscopical Study of Cell contacts in the Seminiferous Tubules of some Mammals. *Z. Zellforsch.* 83:375 (1967).

NICANDER, L. y BANE, A.: Fine studies of the spermatid head in some mammalian with particular reference to the acrosome and the subacrosomal substance. *Z. Zellforsch.* 72:496 (1966).

NISHIDA, T.: Cytoplasmic Cytology of the Sertoli Cells of mammals. *Cytol.* 19:203 (1954).

OSHIMA, H.; WAKABAYASHI, K. y TAMAOKI, B.I.: The effect of synthetic estrogen upon the biosynthesis in vitro of androgen and luteinizing hormone in the rat. *Biochem. Biophys. Acta* 137:356 (1967).

PARVINEN, M.; PARVINEN, L.M.: Active movements of the chromatoid body. A possible transport mechanism for haploid gene products. *J. Cell Biol.* 80:621 (1979).

PAYER, A.F.: Ultrastructural classification of paracrystalline inclusions in untreated and estrogen treated human Leydig cells. *Anat. Rec.* 198:175 (1980).

PAYNE, A.H.; KAWANO, A. y JAFFE, R.B.: Formation of dihydrotestosterone and other 5 $\alpha$ -reduced metabolites by isolated seminiferous tubules and suspension of interstitial cells in a human testis. *J. Clin. Endocr. Metab.* 37:448 (1973).

PETERSON, N.T. Jr.; MIDGLEY, A.R. jr. y JAFFE, R.B.: Suppression of gonadotropin levels with oestrogen treatment in the male adult rat. *J. Clin. Endocr. Metab.* 28:1473 (1969).

PRENANT, A.: Etude sur l'estructure du tube séminifère des mammifères. Recherches sur la signification des éléments qui le constituent. D. Sc. Thesis, Nancy (1887).

RAMBOURG, A.; CLERMONT, Y. y HERMO, L.: Three-dimensional Ar-

chitecture of the Golgi Apparatus in Sertoli Cell of the Rat. Am. J. Anat. 154:455 (1979).

REGAUD, C.: Les phases et les stades de l'onde spermatogénétique chez les mammifères (rat), Classification rationnelle des figures de la spermatogénèse. Comptes Rendus Soc. de Biol. 52: 1039 (1900).

REGAUD, C.: L'estructure des tubes séminifères et sur le spermatogénèse chez les mammifères. Arch. Anat. Micr. 4:101 (1901).

REGER, J.P.; FAIN-MAUREL, M.A. y CASSIER, P.: The origin, distribution and fate of the chromatoid body (germ plasm) during spermatogenesis and spermiogenesis in two Peracaridae. J. Ult. Res. 60:84 (1977).

RETZIUS, G.: Zur Kenntniss der Spermatozoen. Biol. Untersuch. 77 (1881).

REYNOLDS, E.S.: The use of lead citrate as an election opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17:208 (1963).

RICHARDSON, K.C. y FINKE, E.H.: Uranyl plomb cytrate stain in electron microscopy. Stain Techn. 35:313 (1960).

RODRIGUEZ-RIGAU, L.J.; TCHOLAKIAN, R.K.; SMITH, K.D. y STEINBERGER, E.: In vitro steroid biosynthetic studies in human testes. I. Effect of estrogen on progesterone metabolism. Steroids 29:771 (1977).

ROOSEN-RUNGE, E.C.: Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. II. The duration of spermatogenesis and some effects of colchicina. Am. J. Anat. 88:163 (1951).

ROOSEN-RUNGE, E.C. y GIESEL, L.O.: Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. I. Am. J. Anat. 87:1 (1950)

ROSS, M.H.: The fine structure and development of the peritubular contractile cell component in the seminiferous tubules of the mouse. Am. J. Anat. 121:523 (1967).

ROSS, M.H.: The Organization of the Seminiferous Epithelium in the Mouse Testis Following Ligation of the Efferent Ductules. A light Microscopic Study. Anat. Rec. 180:565 (1974).

ROSS, M.H.: The Sertoli Cell functional Specialization during Spermiogenesis and Spermiation. Anat. Rec. 186:79 (1976).

ROSS, M.H. y DOBLER, J.: The Sertoli Cell Junctional Specializations and their relationship to the Germinal Epithelium is observed after Efferent Ductule Ligation. Anat. Rec. 183:267 (1975).

RUSSELL, L.: Desmosome-like junctions between Sertoli and Germ Cells in the rat. Am. J. Anat. 148:301 (1977).

RUSSELL, L.: Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. Am. J. Anat. 148:313 (1977).

RUSSELL, L.: Further Observations on Tubulobulbar Complexes Formed by Late Spermatids and Sertoli Cells in the Rat Testis. Anat. Rec. 194:213 (1979 a).

RUSSELL, L.: Spermatid-Sertoli Tubulobulbar Complexes as Devices for Elimination of Cytoplasm from Head Region of Late Spermatids of the Rat. Anat. Rec. 194:233 (1979 b).

RUSSELL, L. y CLERMONT, Y.: Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules. Anat. Rec. 185:259 (1976).

RUSSELL, L. y CLERMONT, Y.: Degeneration of Germ Cells in Normal, Hypophysectomized and Hormone Treated Hypophysectomized Rats. Anat. Rec. 187:374 (1977).

RUSSELL, L.; MALONE, J. y Mc CURDY, D.: Effect of the microtubule disrupting agents, colchicine and vinblastine on seminiferous tubule structure in the rat. Tis. Cell 13(2):349 (1981).

SAEZ, J.M.; HAVOR, F. y LORAS, B.: Oestrogen induced Leydig cell refractoriness to gonadotrophin stimulation. Acta Endoc. 89:379 (1978).

SALLE, B.; HEDINGER, D.H.R. y NICOLE, R.: Significance of testicular biopsies in cryptorchidism in children. Acta Endocr. 58:67 (1968).

SAMUELS, L.: The mechanism of action of the testicular estrogens. *Endocr.* 85:96 (1969).

SATO, B.: Estrogen binding component of mouse Leydig cell tumor. An in vitro conversion from non receptor to receptor-like molecule. *Endocr.* 108:612 (1981).

SCOTT, R.S. y BURGER, H.G.: An inverse relationship exists between seminal plasma inhibin and FSH in man. *J. Clin. Endoc. Metab.* 52:796 (1981).

SEGAL, S.J.: Hormone, reproduction and sexual behaviour. Eds. Lloyd C.W. Lea nad Febigr. Philadelphia (1964).

SHOLITON, L.J.; SRIVASTAVA, L. y TAYLOR, B.B.: The in vitro and in vivo effects of diethylstilbestrol on testicular synthesis of testosterone. *Steroids* 26:797 (1975).

SLAUNWHITE, W.R.; SANDBERG, A.A.; JACKSON, J.E. y STAUBITZ, W. J.: Effects of estrogen and HCG on androgen synthesis by human testes. *J. Clin. Endocr. Metab.* 22:992 (1962).

SÖDERSTRÖM, K. y PARVINEN, M.: RNA synthesis in different stages of rat seminiferous epithelial cycle. *Mol. and Cell Endocr.* 5: 181 (1976).

SÖDERSTRÖM, K. y PARVINEN, M.: Incorporation of <sup>3</sup>H-uridine by the chromatoid body during rat spermatogenesis. *J. Cell Biol.* 70:239 (1976).

STEINBERGER, A. y STEINBERGER, E.: Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured Sertoli cells. *Endocr.* 99:918 (1976).

STEINBERGER, A. y STEINBERGER, E.: The Sertoli cells. The Testis. IV:371. Johnsen A.D. y Gomes, W.R. Ac. Press. New York (1977).

STEINBERGER, E.: Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol. Rev.* 51 (1971).

STEINBERGER, E.: Androgens and Spermatogenesis. *Acta Endocr. Suppl.* 177:388 (1971).

STEINBERGER, E. y NELSON, W.O.: Effect of hypophysectomy, cryptorchidism, estrogen and androgen upon the level of hyaluronidase in the rat testis. *Endocr.* 56:429 (1955).

STEINBERGER, E.; STEINBERGER, A. y FICHER, A.: Study of spermatid steroid metabolism in cultures of mammalian testes. *Rec. Progr. in Horm. Res.* 26:547 (1970).

STUMPF, W.E.: Radioactivity in the nuclei of the immature Leydig cells from rats treated with estradiol. *Endocr.* 85:31 (1969).

STUMPF, W.E.: Probable sites for estrogen receptors in brain and pituitary. *J. Neuro. Relat. (Suppl.)* 10:51 (1971).

SUSI, F.R.; LEBLOND, C.P. y CLERMONT, Y.: Changes in the Golgi

apparatus during spermiogenesis in the rat. Am. J. Anat. 130: 251 (1971).

SWERDLOFF, R.S. y ODELL, W.D.: Gonadotrophin suppression by estrogen treatment. Calif. Med. 109:467 (1968).

SWERDLOFF, R.S. y WALSH, P.C.: Testosterone and estradiol suppression of LH and FSH in adult male rats: duration of castration, duration of treatment and combined treatment. Acta Endocr. 73:11 (1973).

TELLUM, G.: Estrogen-producing Sertoli cell tumors (androblastoma tubulare lipoides) of the human testis and ovary. Homologous ovarian and testicular tumors. J. Clin. Endocr. 9:301 (1949).

TINDALL, D. J.; MENA, CH.R. y MEANS, A.R.: Hormonal regulation of Androgen-Binding Protein in Hypophysectomized Rats. Endocr. 103:589 (1978).

TINDALL, D.J. y MILLERAA MEANS, A.R.: Characterization of androgen receptor in Sertoli cell enriched testis. Endocr. 101:13 (1977).

TOYAMA, Y.: Actin-like filaments in the Sertoli cell functional specialization in the swine and mouse testis. Anat. Rec. 186:477 (1976).

TRESCUERRES, J.A.F.; ESQUIFINO, A.I.; PEREZ MENDEZ, L.F. y

LOPEZ CALDERON, A.: Possible Role of Prolactin in the Inhibitory effect of Estradiol on the Hypothalamic-Pituitary-Testicular Axis. *Endocr.* 108:83 (1981).

TUREK, F.W.: Role of the pineal gland in photoperiod induced changes in hypothalamo-pituitary sensitivity to Testosterone feed-back in castrated male hamsters. *Endocr.* 104:636 (1979).

VALLADARES, L.E. y PAYNE, A.H.: Induction of testicular aromatization by LH in mature rats. *Endocr.* 105:431 (1979).

VERJANS, H.L.; EIK-NES, K.B.; AAFJES, J.H.; VELS, F.J.M. y MOLEN, H.J., van der: Effects of testosterone propionate, 5- $\alpha$ -dihidrotosterone propionate and oestradiol benzoate on serum levels of LH and FSH in the castrated adult male rat. *Acta Endocr.* 77:643 (1974 b).

VERNON, L.G.; DEVER, N.W.: Effects of testosterone propionate and estradiol benzoate alone or in combination on serum LH and FSH in orchidectomized rast. *Endocr.* 89:161 (1971).

VILAR, O.M.; PEREZ DEL CERRO y MANAMI, R.E.: The Sertoli cells as a "bridge-cell" between the basal membrane and the germ cells. *Exptl. Cell Res.* 27:158 (1962).

VITALE, R.D.W.; FAWCETT, M. y DYM, M.: The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. *Anat. Rec.* 176:333 (1973).

VON EBNER, H.: Untersuchung über den Bau Samenkanälchen und die Entwicklung der Spermatozöiden bei den Säugetieren und beim Menschen. Rollet's Untersuch. Inst. Physio. 200 (1871).

VON EBNER, H.: Zur Spermatogenese bei den Säugetieren. Arch. Mikr. Anat. Ent. 31:236 (1888).

WALSH, E.L.; CUYLER y Mc CULLAGH, D.E.: Physiologic maintenance of male sex gonads; effect of androgens on hypophysectomized rats. Amer. J. Physiol. 107:508 (1934).

WALSH, P.C.; SWERDLOFF, R.S. y ODELL, W.D.: Feedback control of FSH in the male: role of oestrogen. Acta Endocr. 74:449(1973)

WATSON, M.: Spermatogenesis in the albino rat as revealed by Electron Microscopy. Biochem. Biophys. Acta. 8:369 (1952).

WEDDINGTON, S.C.; HANSSON, V. y RITZEN, E.M.: Sertoli cell secretory function after hypophysectomy. Nature 254:145 (1975).

WEISENBERG, L.S.; NICOLA, A.F. de; ARAKELIAN, M.C.: Effect of median eminence lesions on <sup>3</sup>H-estradiol binding in the anterior pituitary and hypothalamus. Endocr. 105:1152 (1979).

WELSH, M.J.; SICKLE, M. van y MEANS, A.R.: Possible involvement of cyclic AMP, calcium and cytoskeleton in control of protein secretion by Sertoli cells. Testicular Development, Structure, and Function. 89. A. Steinberger and E. Steinberger. Raven Press. New York (1980).

WELSH, M.J. y WIEBE, J.P.: Cellular localization of 5 -reductase and 3 -hidroxysteroid dehydrogenase in the seminiferous tubule of the rat testis. *Endocr.* 96:879 (1975).

WILKE, G. y SCHEUHARDT, E.: Elektronmikroskopische untersuchungen der Hodenzwischenzellen von normale und hypophysectomized Ratten. IV. *Int. Kongr. Elektron.* Berlin Bd 2:388(1958).

WOODRUFF, M. y UMIKER, W.: The effect of estrogen and androgen on the rat prostate gland and testes. *The J. of Urol.* 84:162 (1960).

YAMAMOTO, K.; KASAI, K. y IERI, T.: Control of pituitary functions of synthesis and release of PRL and GH by gonadal steroids in female and male rat. *Jpn. J. Physiol.* 25:645 (1975).

YANAIHARA, T. y TROEN, P.H.: Studies of the human testis. III. Effect of estrogen on testosterone formation in human testis in vitro. *J. Clin. Endocr. Metab.* 34:968 (1972).

ZAMORANO, L.; POBLETE, E.G.; VALERO, E.S. y URTIAGA DE VIVAR, M. Aspectos morfológicos de la regulación de la función testicular. I. Estudio con microscopía óptica. *Arch. Fac. Med. (M)*. Vol. XXXII 5:263 (1977).

ZIRKIN, B.R.; EWING, L.L.; KROMANN, N. y COH RAN, R.C.: Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocr.* 107:1867 (1980).

ZONDEK, B.: Estrogens isolated from stallion urine. *Nature* 133: 209 (1934).

ZUCKERMAN, S. y Mc KEOWN, T.: The canine prostate in relation to normal and abnormal testicular changes. *J. Pathol. Bacteriol.* 46:7 (1938).



24

V O L U M E N I I

INDICE

	Pg.
Esquemas .....	III
<b>Micrografías</b>	
. Microscopía de luz .....	XX
. Microscopía electrónica .....	LXVII

229

ESQUEMAS

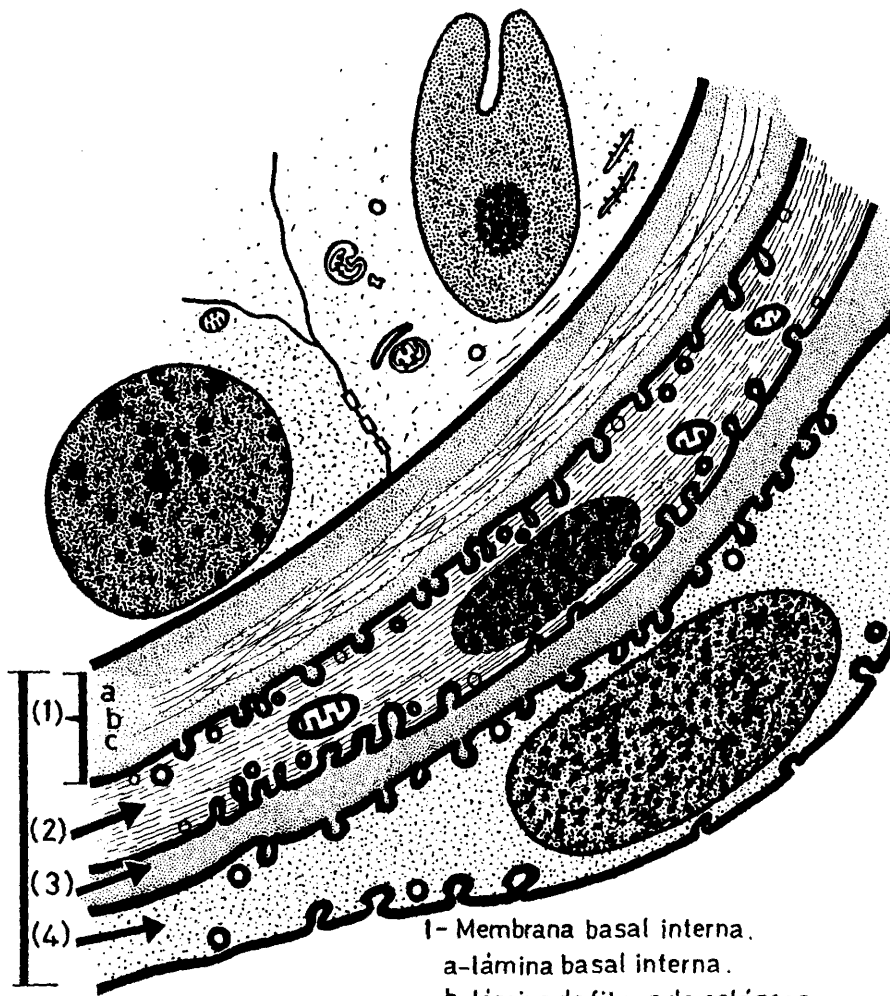
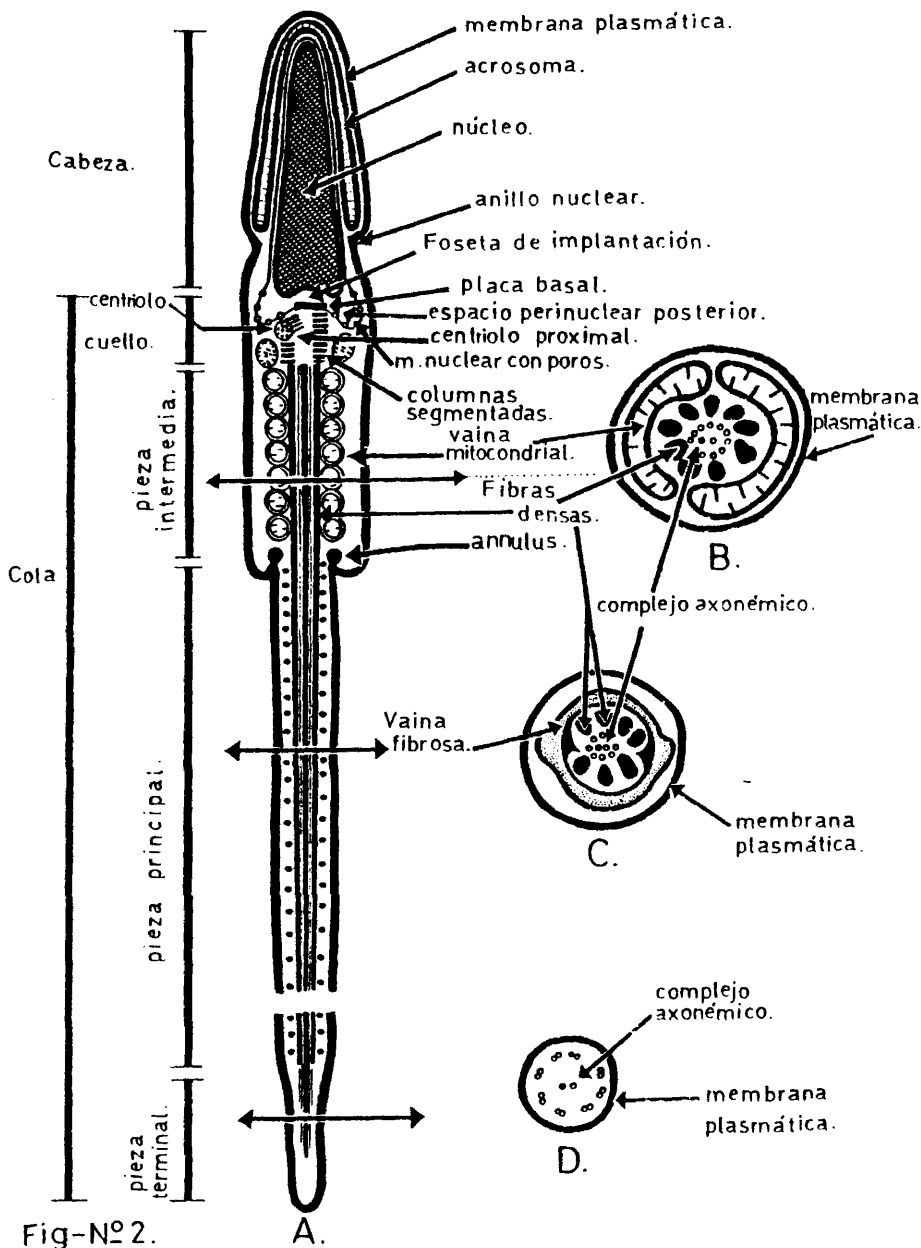


Fig-Nº1.

- 1- Membrana basal interna.  
a-lámina basal interna.  
b-lámina de fibras de colágena.  
c-lamina basal externa.
- 2- Célula mioide.
- 3- Membrana basal externa.
- 4- Célula endotelial.



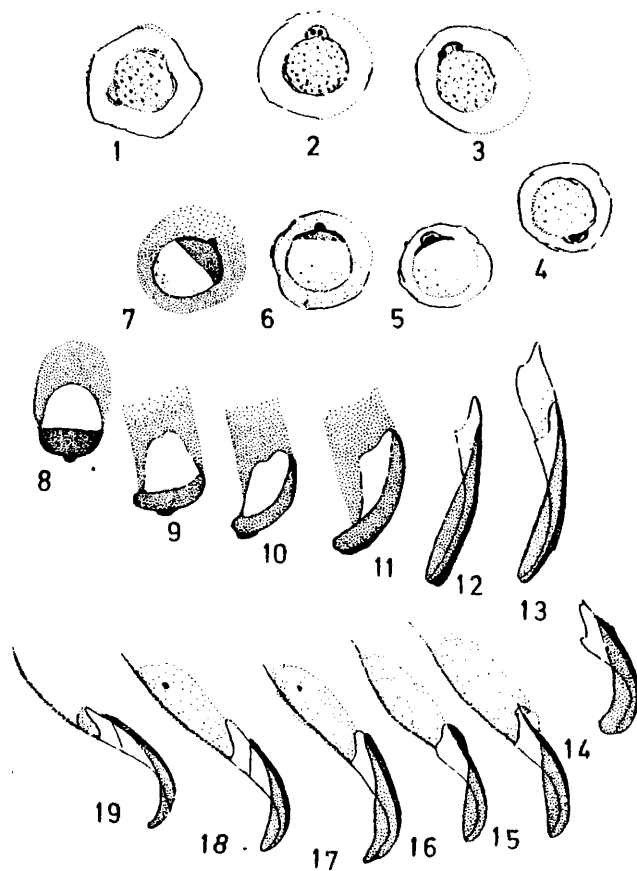


Fig-Nº 3. Estadios evolutivos de las espermátides en la rata (Leblond y Clermont, 1952)  
 1-3. Fase del Colgi.  
 4-7. Fase del Casquete.  
 8-14. Fase acrosómica.  
 15-19. Fase de maduración.

ETAPAS DEL CICLO DEL EPITELIO SEMINIFERO  
 DE LA RATA  
 (Dym y Clermont, 1970)

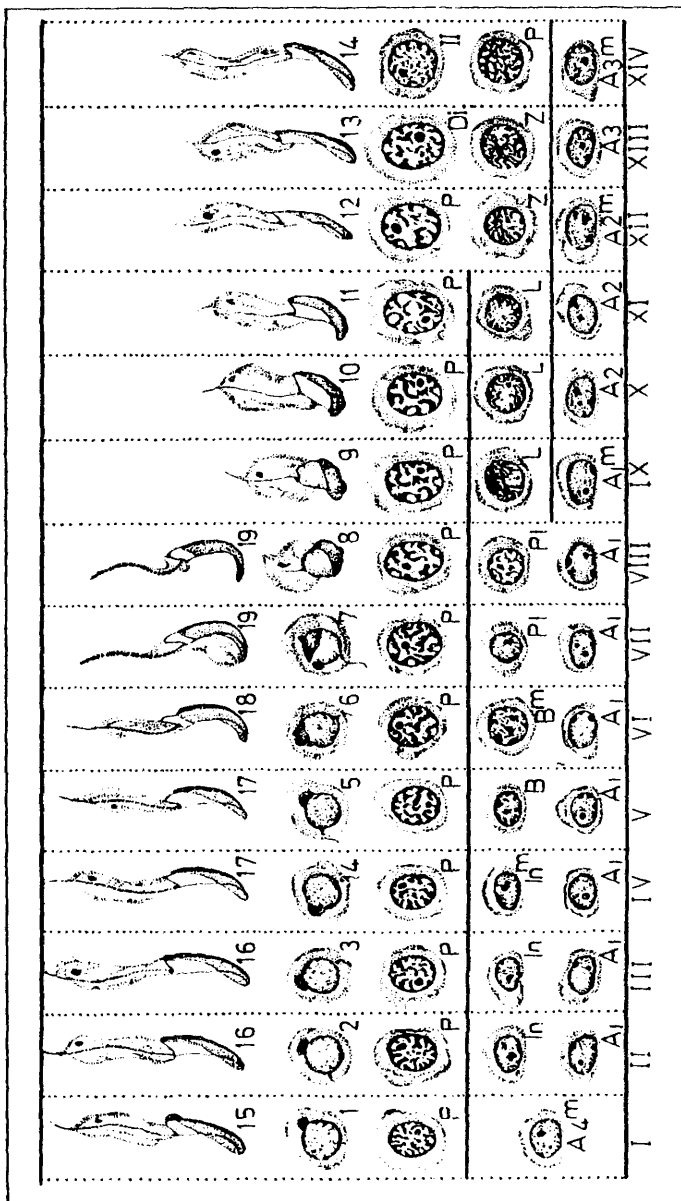


Fig. N° 4

Fig-N° 4

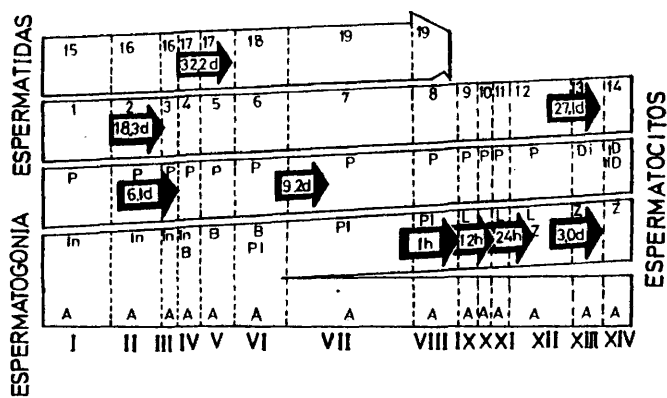


Fig-Nº 5.

Esquema que representa el tiempo de duración de difentes fases evolutivas de las células de la linea germinal del epitelio seminifero dela rata.

A - espermatogonia. A.

In- espermatogonia. In.

B - espermatogonia. B.

PI- espermatocito preleptoténico.

L- espermatocito leptoténico.

Z- espermatocito zigoténico.

P- espermatocito paquiténico.

Di- espermatocito diploténico.

D- espermatocito diacinéético.

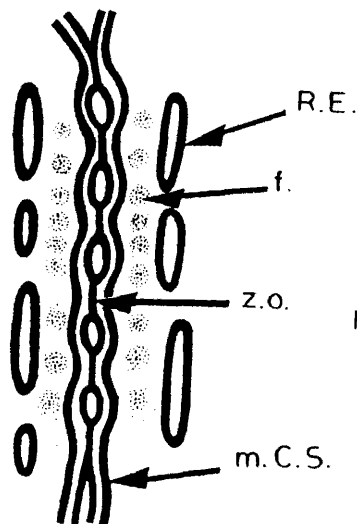
1-19- Espermátidas tipos. 1-19.

( Tomado de Clermont y cols. 1959.)



Esquema que ilustra la configuración del aparato de Golgi de una célula de Sertoli en las etapas V-VIII del ciclo del epitelio seminífero.

Fig-Nº6.



Esquema de los elementos constitutivos de la barrera hemato-testicular.  
 m.C.S.: membrana célula de Sertoli.  
 Z.O.: zónulas occludens.  
 f.: haces de microfilamentos.  
 R.E.: retículo endoplásmico.

Fig-Nº7.

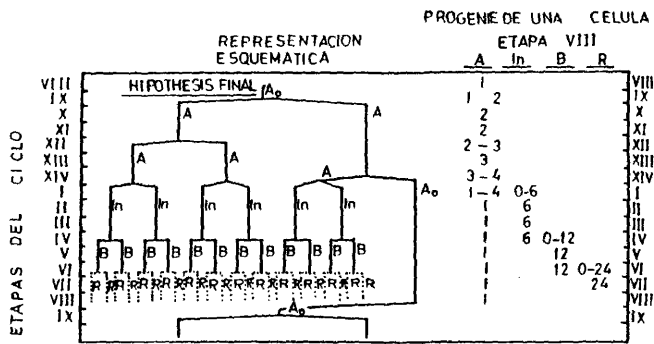


Fig - N°8.

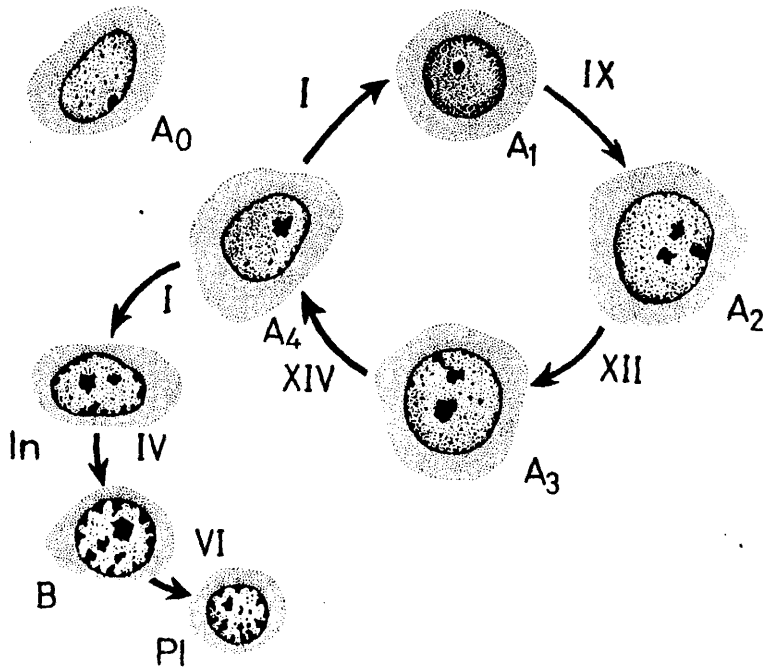


Fig - N°9.

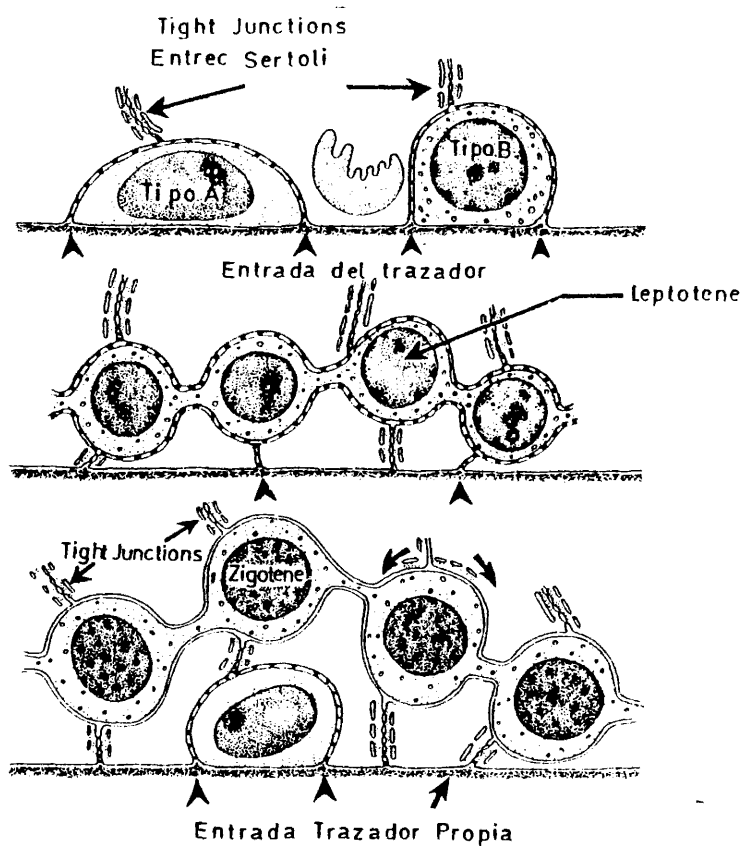


Fig-Nº-10. Los espermatoцитos leptoténicos atraviesan la barrera hemato-testicular, ocupando, por tanto el "compartimento intermedio" de Russell (1977). En el compartimento basal se localizan las espermatogonias y los espermatoцитos preleptoténicos cuyas membranas quedan enmarcadas por los trazadores extracelulares. La primera célula que encontramos después de la barrera es el espermatoцитo zigoténico (Compartimento luminal). Hasta él no llegan los trazadores extracelulares.

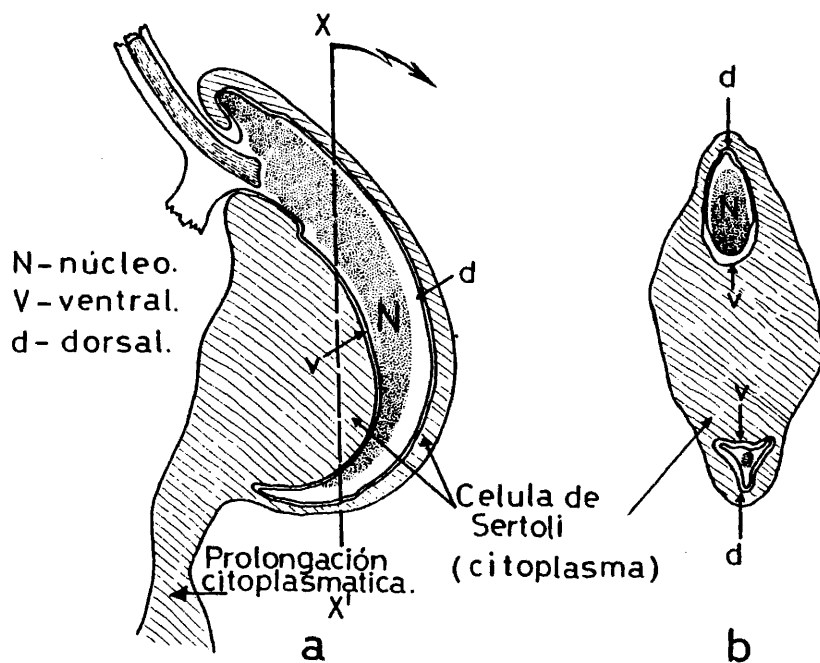


Fig- Nº11. Esquema que ilustra las relaciones entre la cabeza de la espermátida tipo 19 y la prolongación apical de la c. de Sertoli en la que se aloja a.visión sagital.b.corte frontal por x - x'.

(Tomado de Russell y Clermont,1976.

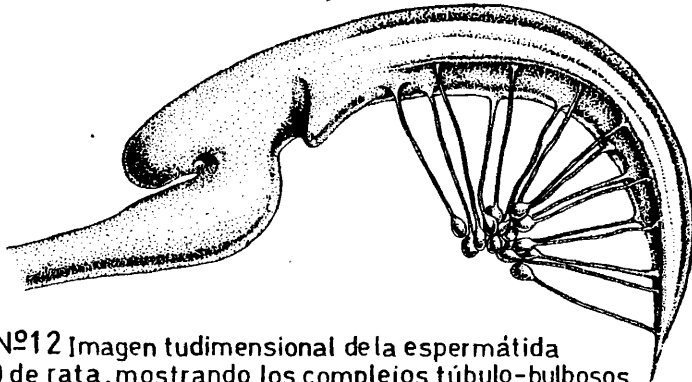


Fig- Nº12 Imagen tudimensional de la espermátida tipo 19 de rata, mostrando los complejos túbulo-bulbosos. (Tomado de Russell y Clermont, 1976)

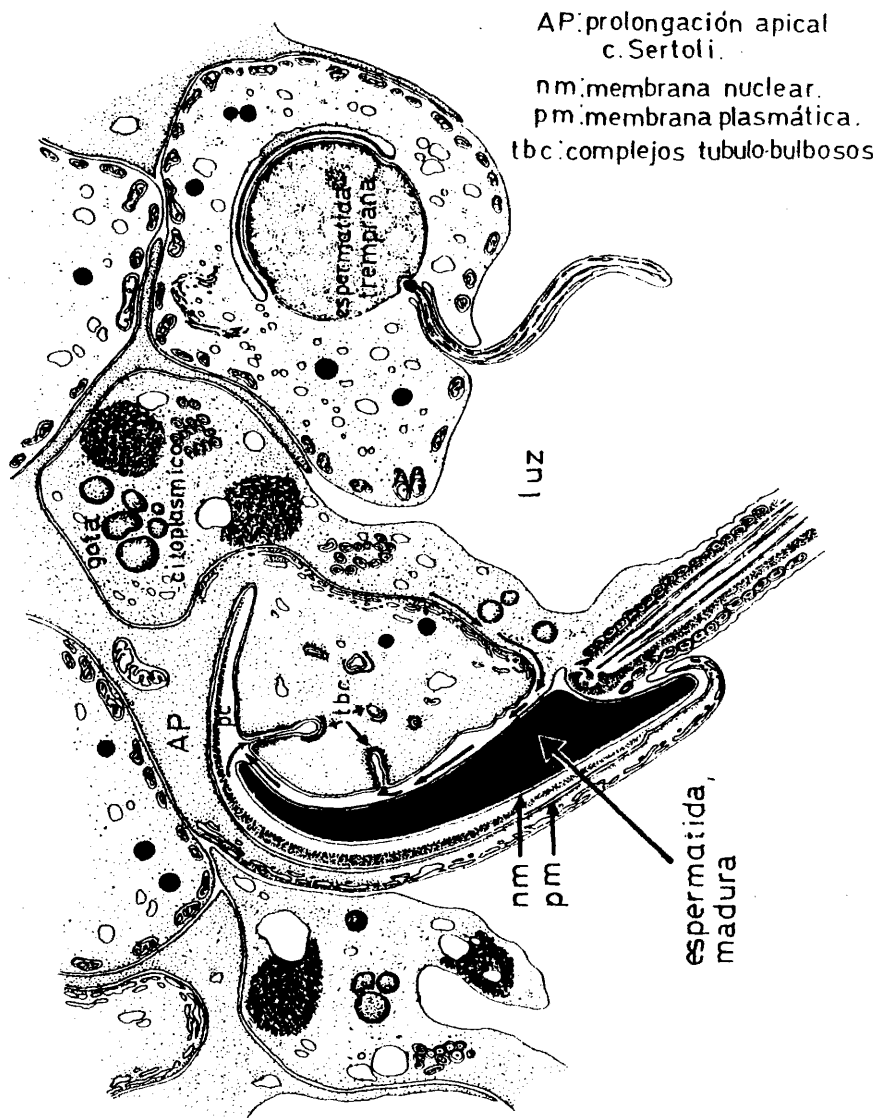


Fig- Nº13. Situación de las espermatidas en la etapa VII del ciclo del epitelio seminífero. En la espermatida tipo 19 aparecen los complejos túbulo-bulbosos en formación.  
( Según Russell, 1979 )

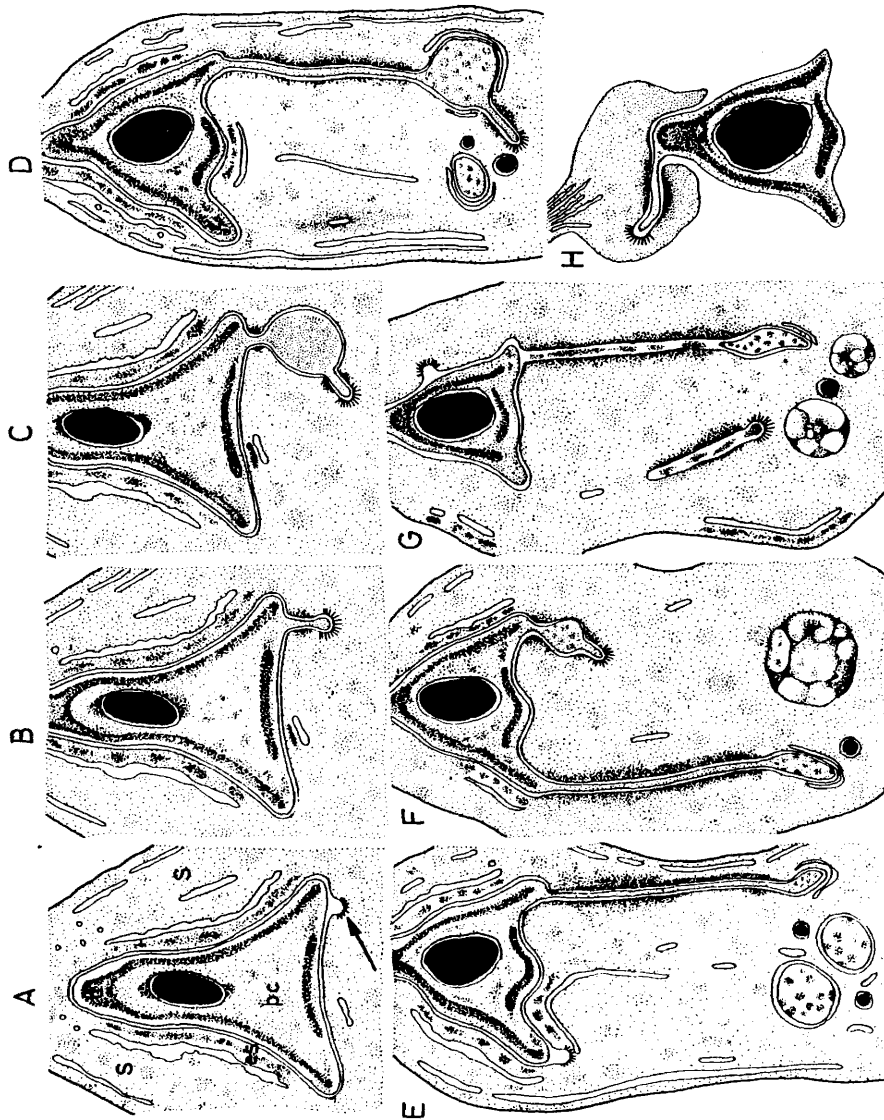
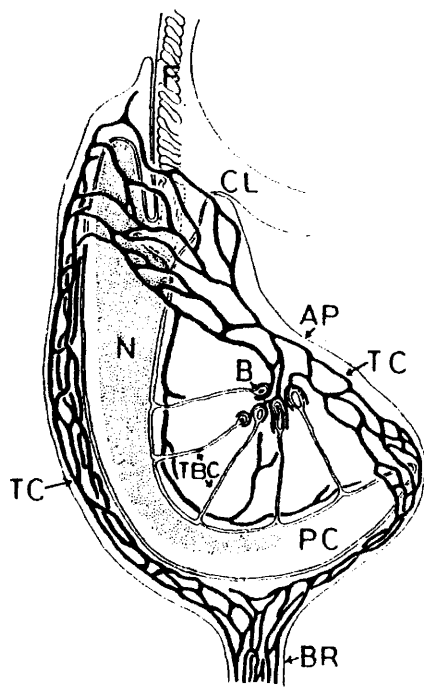


Fig- N°14. Formación, desarrollo y regresión de los complejos túbulo - bulbosos en la espermatida 19 hasta su liberación (etapas VII y VIII del ciclo del epitelio seminífero). ( Russell, 1979 )



- AP: prolongación apical de la c. de Sertoli.
- TC: cisternas tubulares de R.E.
- BR: puente citoplasmático de la c. de Sertoli.
- TBC: complejos túbulo-bulbosos.
- B: bulbos.
- N: núcleo de la espermatida.
- F: Flagelo.
- PC: citoplasma perinuclear.
- CL: gota citoplásmica.

Fig-Nº15.

Esquema que ilustra la distribución de las cisternas de retículo endoplásmico en la prolongación apical de la célula de Sertoli que aloja la cabeza de la espermatida tipo 19.  
( Según Clermont y cols. ,1980 )

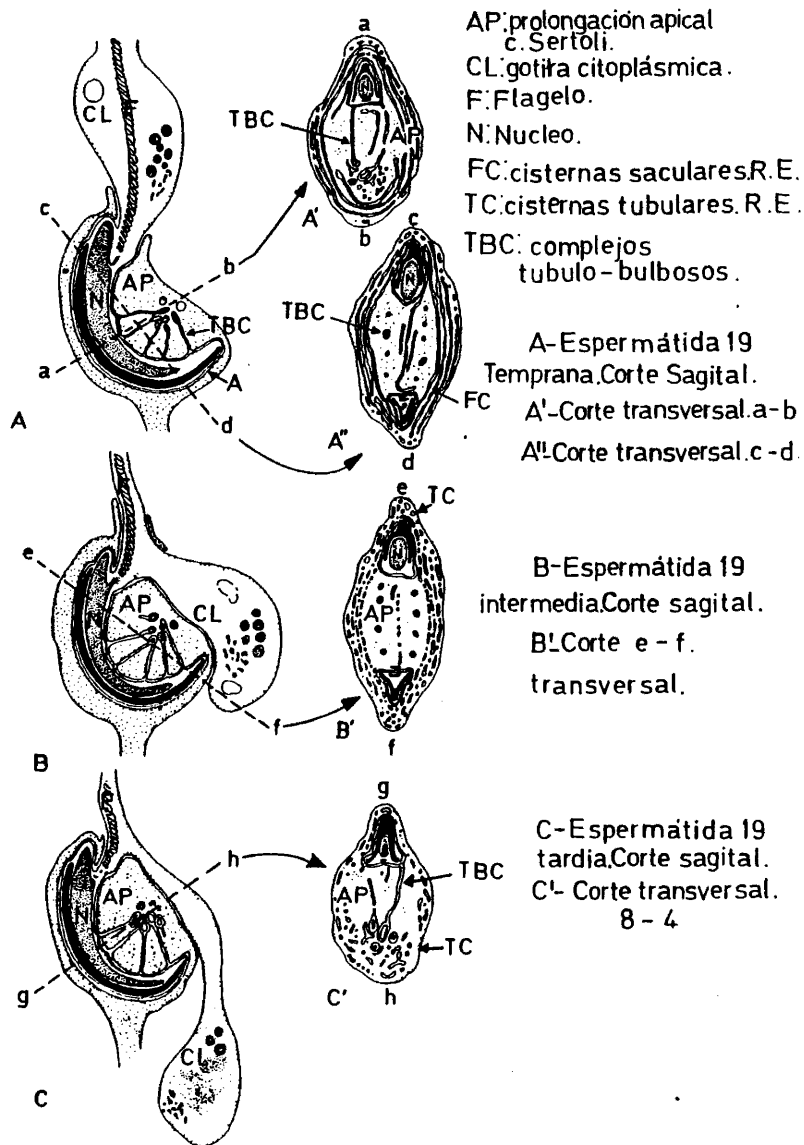
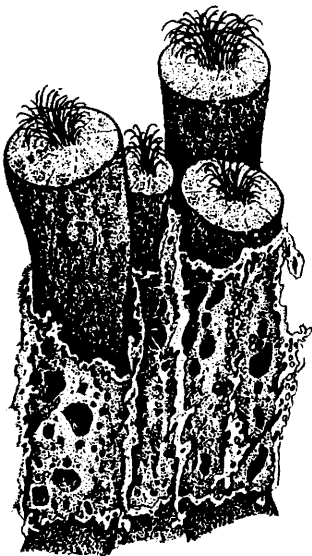


Fig - Nº16. Cabeza de una espermátida tipo 19 encapsulada en la prolongación apical (AP) de la célula de Sertoli en estadios sucesivos de su desarrollo.  
 ( Tomado de Clermont y cols. , 1980 )



Esquema tridimensional mostrando la disposición del intersticio en relación con los túbulos seminíferos.

Fig-Nº17.

- (1) Espacio cerrado.
- (2) Espacios abiertos.
- (3) Capilar.
- (4) Células endoteliales de la lámina propia del túbulo seminífero.
- (5) Cubierta endotelial.
- (6) Capilar.
- (7) Macrófago.
- (8) Células de Leydig.

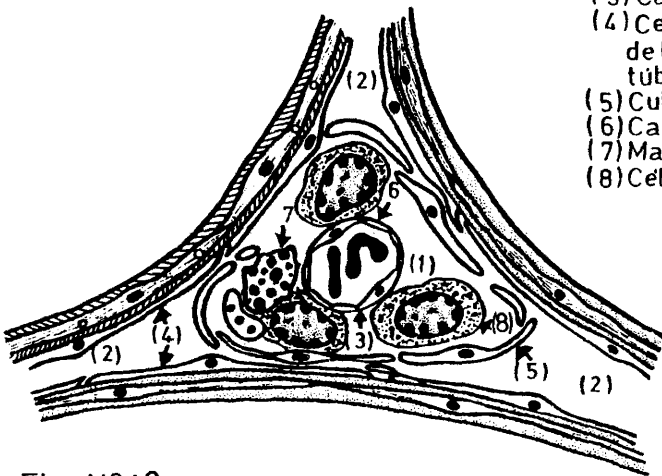


Fig-Nº18.

Disposición de los elementos del intersticio.

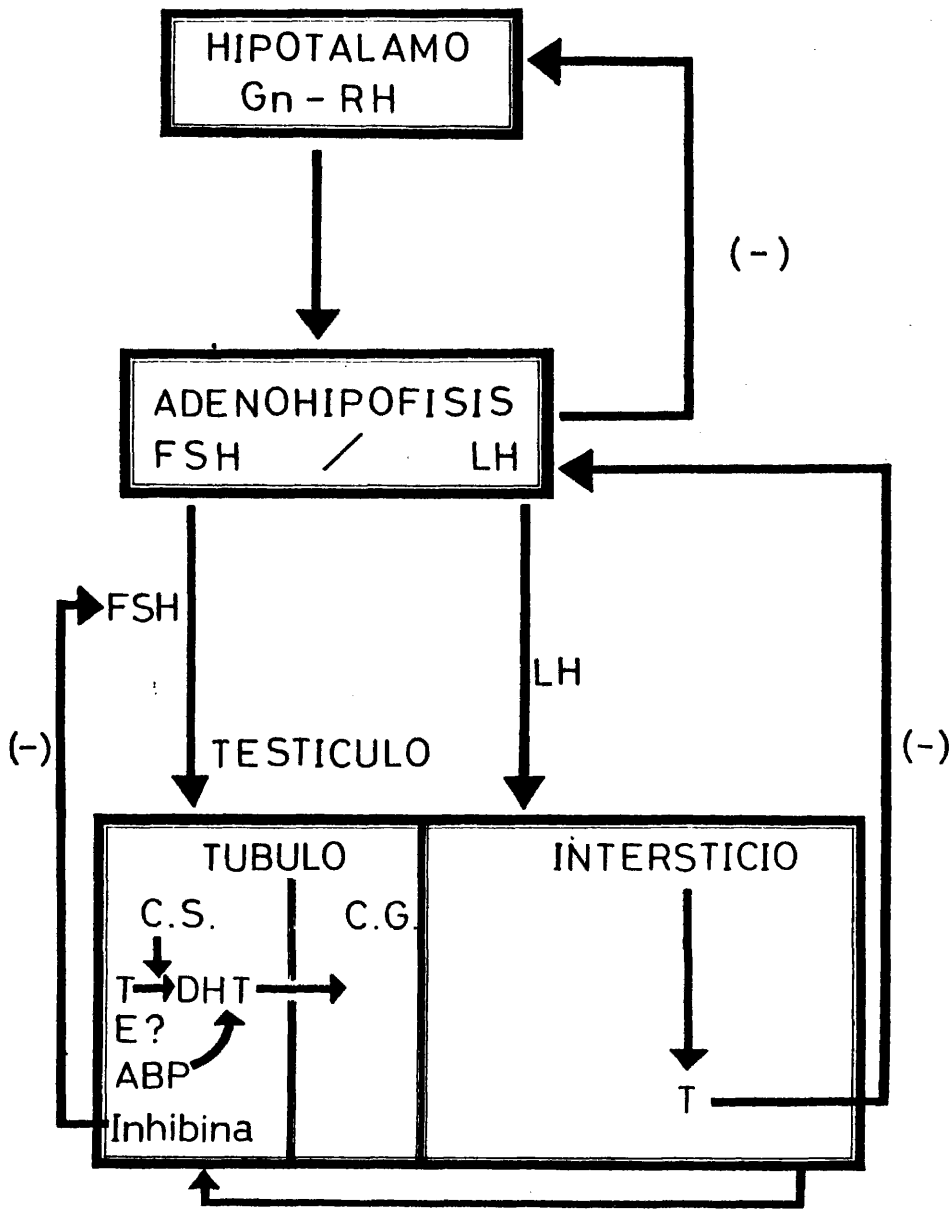


Fig-Nº19.

245

M I C R O G R A F I A S

246

M I C R O S C O P I A  
O P T I C A

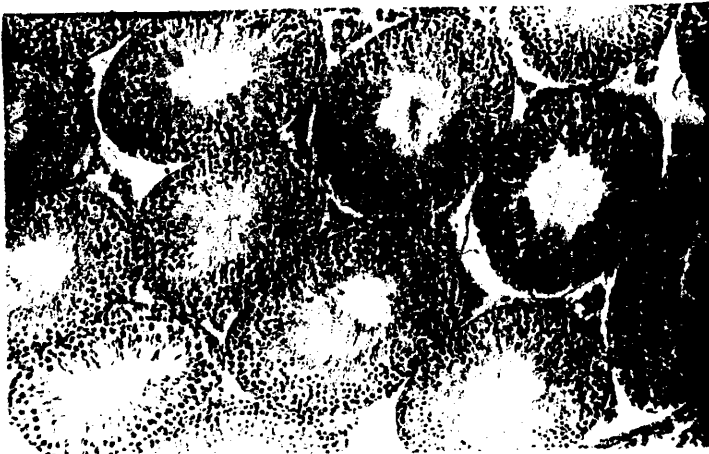


fig. nº 20

Micrografía óptica del aspecto que presenta un corte histológico de testículo de rata adulta, perteneciente al grupo de los animales utilizados como control. Los túbulos aparecen en diferentes etapas de la espermatogénesis, y se pueden apreciar gran cantidad de espermatozoides a punto de liberarse a la luz. (x100).

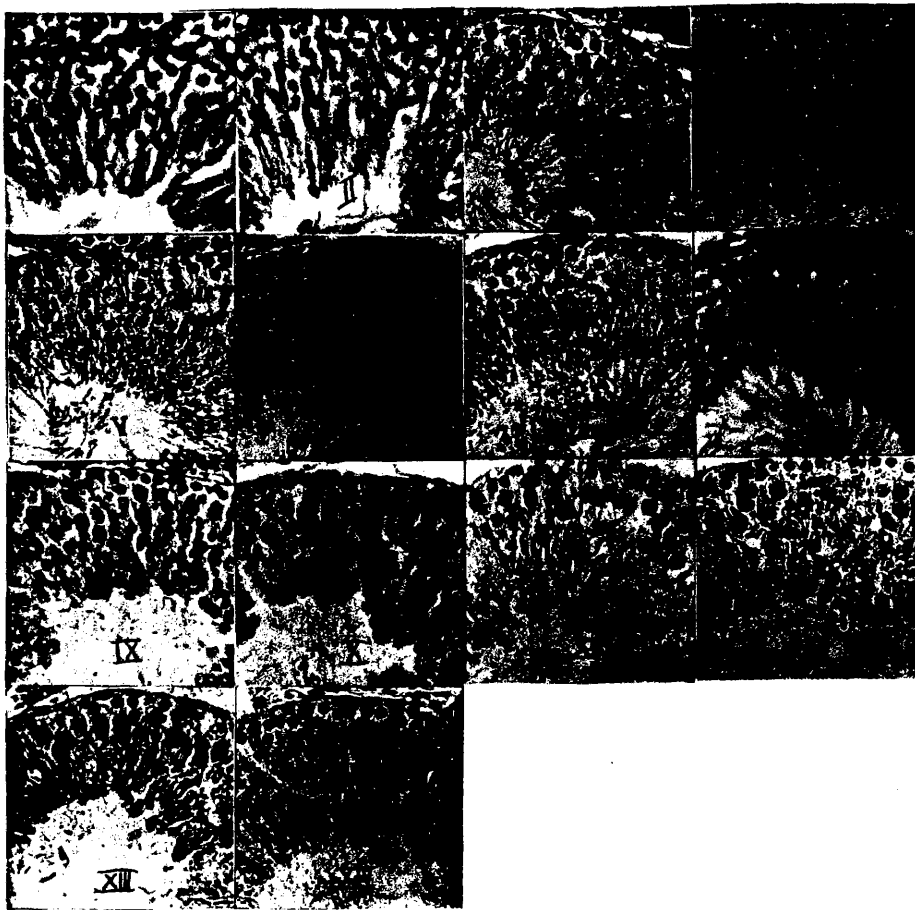


Figura nº 21

Micrografia óptica del aspecto que presentan las 14 etapas del ciclo del epitelio seminifero descritas por Leblond y Clermont (1952). (x250).

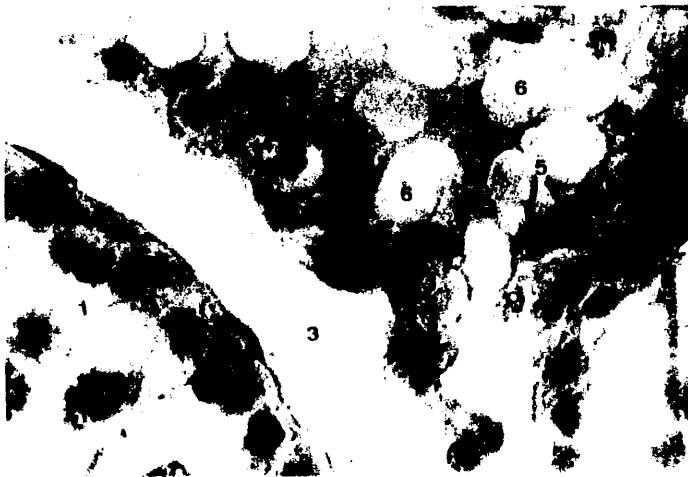


Fig. nº 22

Micrografía óptica del espacio intertubular del testículo de rata adulta, perteneciente a uno de los animales del grupo control. 1. Túbulo seminífero. 2. Espacio intertubular cerrado (según lo descrito por Clark, 1976). 3. Espacio linfático peritubular. 4. Capilar sanguíneo. 5. Células de Leydig. 6. Fenestraciones del tejido conectivo. (x1000).



Fig. nº 23

Micrografía óptica mostrando la disposición de las células de Leydig en las inmediaciones de los vasos sanguíneos. 1. Vaso. 2. Células de Leydig. (x1000).

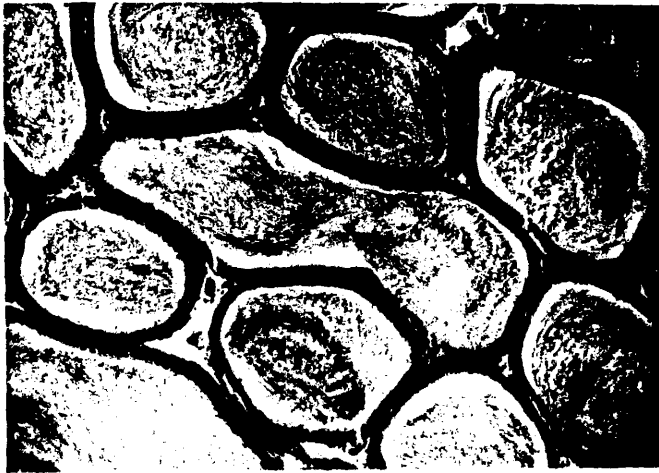


Fig. nº 24

Micrografía óptica del aspecto que presenta el epidídimo de ra ta adulta en uno de los animales del grupo control. Los tubos epididimarios aparecen repletos de espermatozoies. (x100).



Fig. nº 25

Detalle de la fotografía anterior. El tejido conjuntivo que queda entre los túbulos es muy escaso. (x1000)



Figura nº 26

Panorámica del testículo de un animal tratado durante 10 días con benzoato de estradiol, en dosis de 250  $\mu\text{g}/\text{d}$ . Los túbulos presentan aspecto casi normal. La flecha indica una espermátida tipo 9 degenerada. (x100).



Fig. nº 27

Panorámica del testículo de un animal tratado también 10 días, pero con una dosis de 50  $\mu\text{g}/\text{d}$  de benzoato de estradiol. A pesar de ser inferior la dosis, aparecen túbulos degenerados (1) o con algunos signos de degeneración. (2). (x100).

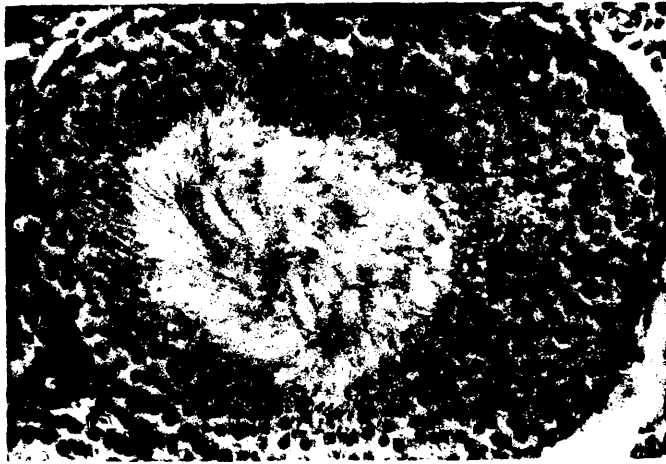


Fig. nº 28

Túbulo en etapa VII del testículo de un animal sometido 8 días a tratamiento con benzoato de estradiol. La flecha señala un espermatocito paquiténico desplazado de su localización habitual hacia la luz del túbulo. (x400).



Fig. nº 29

Túbulo en etapa VIII de un animal sometido a 10 días de tratamiento. 1. Espermatocito paquiténico degenerado. 2. Espermatogonias  $A_1$  en mitosis. (x400).

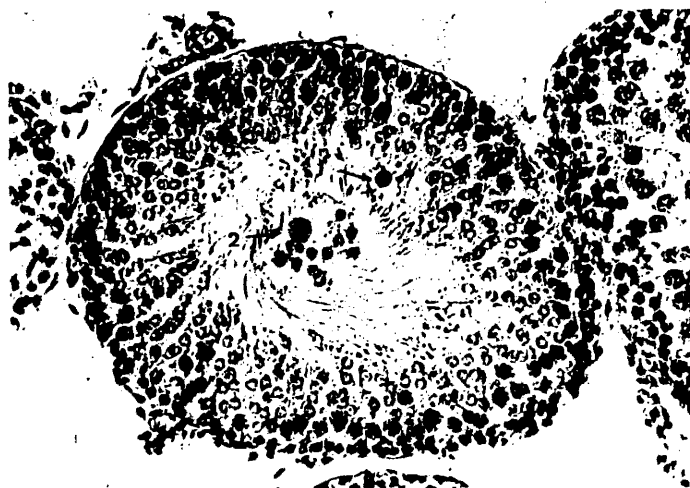


Fig. nº 30

Túbulo en etapa VII-VIII. Animal tratado 9 días. La luz aparece ocupada por células germinales inmaduras. 1. Espermatida 7 degenerada. 2. Célula gigante multinucleada atípica. (x250).



Fig. nº 31

Túbulo en etapa XIV. 10 días de tratamiento. 1. Espacios dejados por las células degeneradas. 2. Espermatocito II cayendo a la luz del túbulo. (x400).

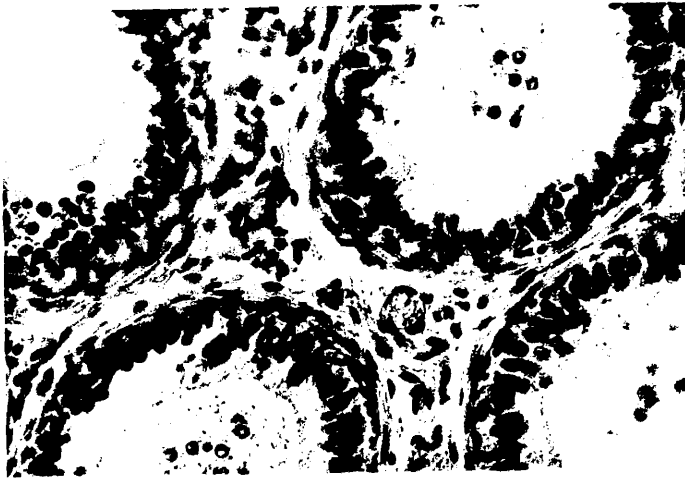


Figura nº 32

Aspecto que presenta el epidídimo de un animal sometido a tratamiento estrogénico 10 días. En el interior se ven espermátidas tipo 7, espermatozoides y otros restos celulares. (x250).



Fig. nº 33

Luz de un túbulo seminífero en etapa VIII de un animal tratado 8 días. Aparecen células de una etapa XIV, descamadas en otro lugar. 1. Espermatida 8 degenerada. 2 Espermatocito paquiténico. 3. Espermatocito II. 4. Célula g. multinucl.(x1000)



Fig. nº 34

Túbulo en la etapa XIII del ciclo, perteneciente a un animal sometido a 10 días de tratamiento. Aparecen espermatocitos diploténicos en la luz, mientras que cerca de la basal se ven espermátidas 13. (x400).

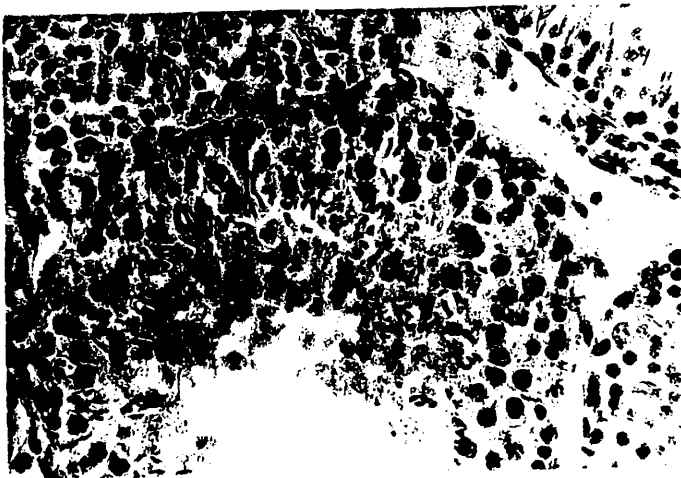


Fig. nº 35

Túbulo en la etapa XII. Animal tratado 10 días. Aunque aparece la asociación celular completa, se aprecia un claro desorden del epitelio seminífero. La proporción células de Sertoli/células germinales está aumentada. (x400).

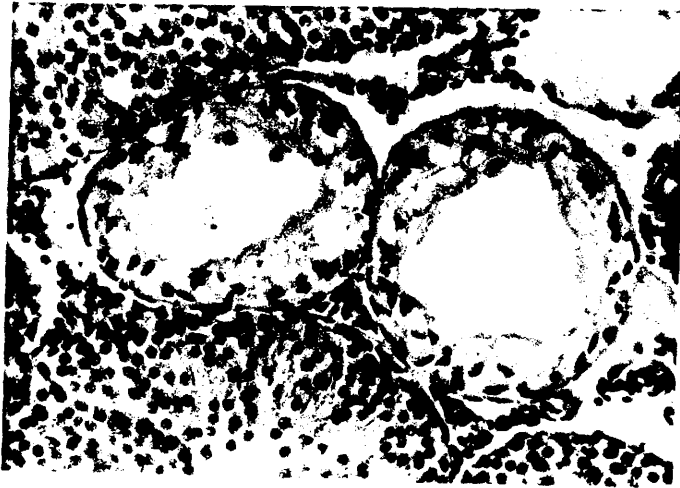


Fig. nº 36

Túbulos degenerados rodeados por otros de aspecto casi normal. Animal tratado 10 días. Los núcleos de las células de la lámina propia aparecen muy cerca unos de otros. Casi sólo quedan células de Sertoli. (x250).

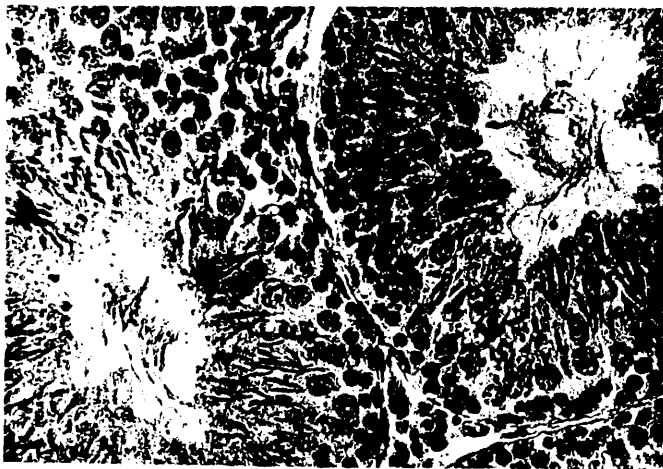


Fig. nº 37

Túbulo seminífero en la etapa XIII. Animal sometido a 10 días de tratamiento. Aspecto casi normal. (x400).

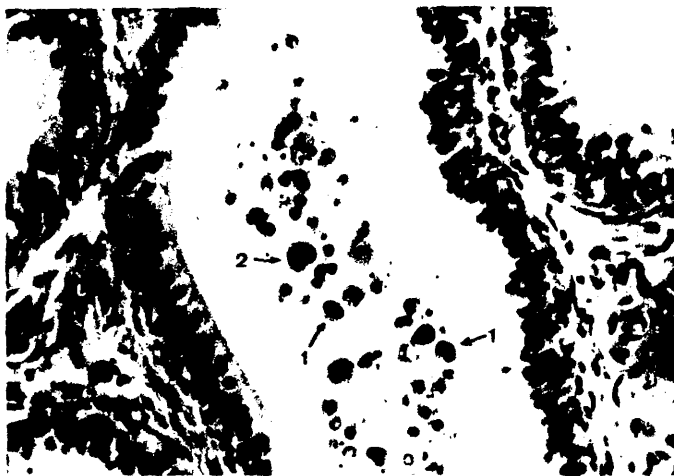


Fig. nº 38

Túbulo del epidídimo de animal tratado 9 días. En la luz apa-  
recen varias espermátidas degeneradas, que no han sufrido ci  
tocinesis (1), lo que puede dar lugar a células gigantes mul-  
tinucleadas (2). (x400).

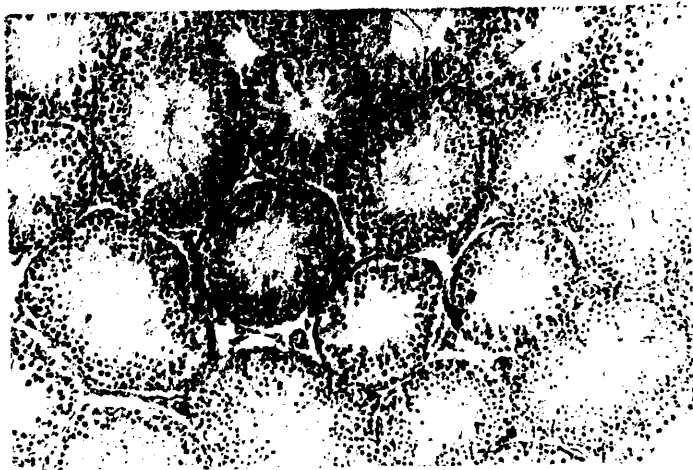


Fig. nº 39

Visión panorámica del testículo de un animal sometido a tra-  
tamiento durante 14 días. Todavía se ven algunos espermato-  
zoides, aunque todos los túbulos están afectados. (x100).



Fig. nº 40

Panorámica del testículo de un animal tratado 15 días. Todos los túbulos aparecen afectados. (x100).



Fig. nº 41

Etapa XIII. Animal tratado 13 días. Aparece un espermatozocito Z degenerado. (x1000).



Fig. nº 42

Etapa XIV. Animal tratado 13 días. Aparece un espermatozocito II a punto de liberarse a la luz. (x1000).



Fig. nº 43

Túbulo en la etapa VI. Animal tratado 14 días. Se aprecia un claro aumento en la proporción células de Sertoli/células germinales. (x400).

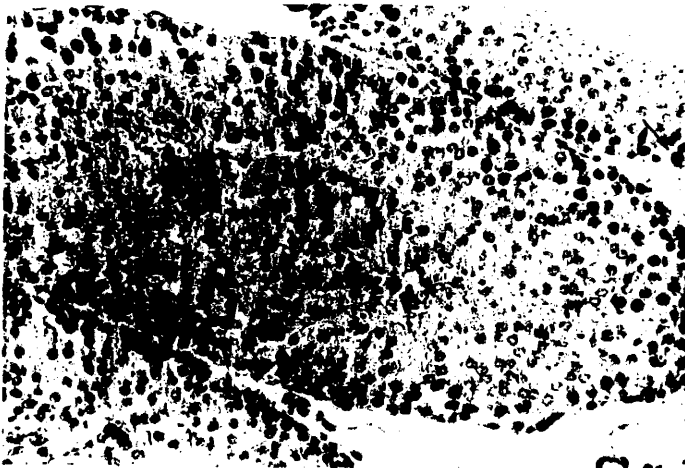


Fig. nº 44

Túbulo en etapa VIII. Animal tratado durante 8 días. Las células que aparecen en la luz pertenecen a la misma etapa. Se aprecia una desorganización de todo el epitelio. La flecha señala un espermatozoido P degenerado en túbulo vecino. (x400)

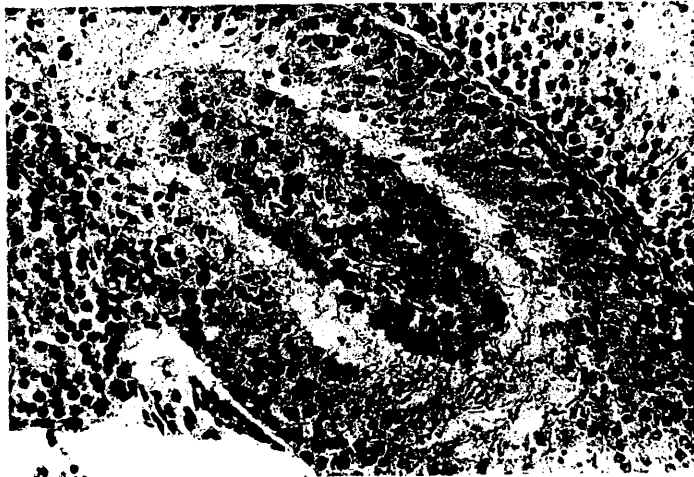


Fig. nº 45

Etapa VIII. Animal tratado 13 días. El epitelio aparece desorganizado. Las células que se ven en la luz pertenecen a la asociación celular de la etapa XII. (x400).

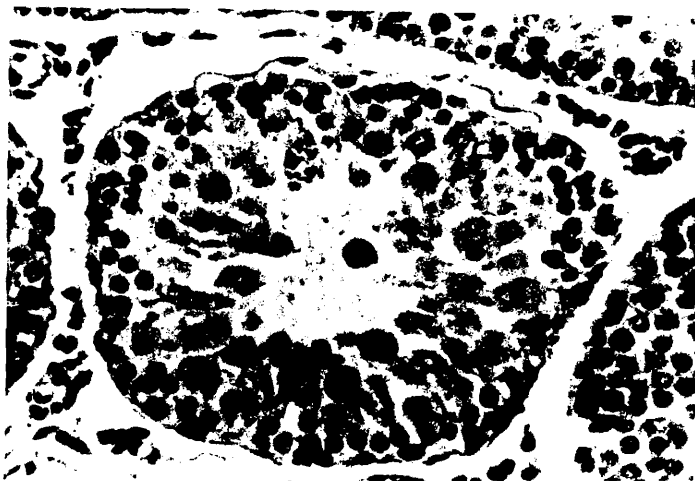


Fig. nº 46

Etapa XIII-XIV. 14 días de tratamiento. Aunque presenta un alto grado de descamación, la espermiogénesis continúa, apareciendo espermátidas 14. (x400).

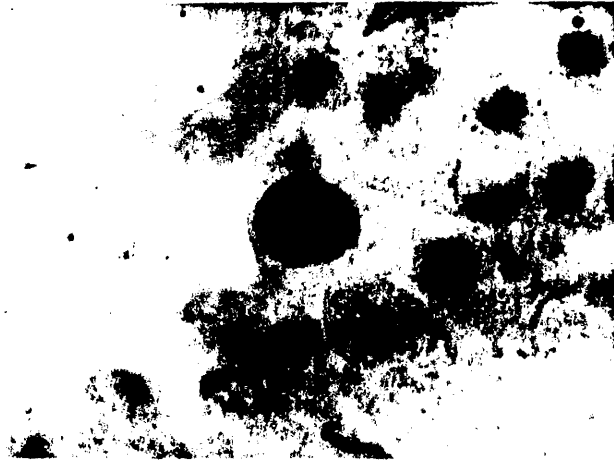


Fig. nº 47

Luz de un túbulo del testículo de un animal tratado 14 días. Aparecen células gigantes multinucleadas a punto de caer a la luz. (x1000).



Fig. nº 48

Panorámica del testículo de un animal tratado 18 días. Todavía se ven espermátidas en fase de maduración. (x100).

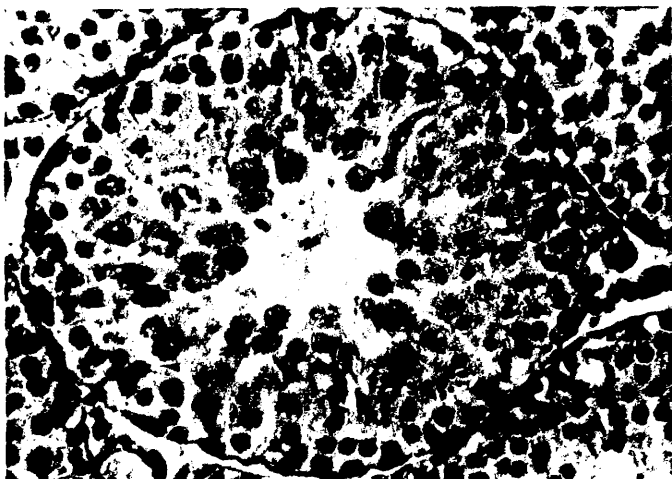


Fig. nº 49

Túbulo en etapa XIII-XIV. Animal tratado durante 20 días. A pesar del alto grado de descamación, continúan ocurriendo mitosis. Las espermátidas, aunque escasas, evolucionan hasta etapas avanzadas. (x400).

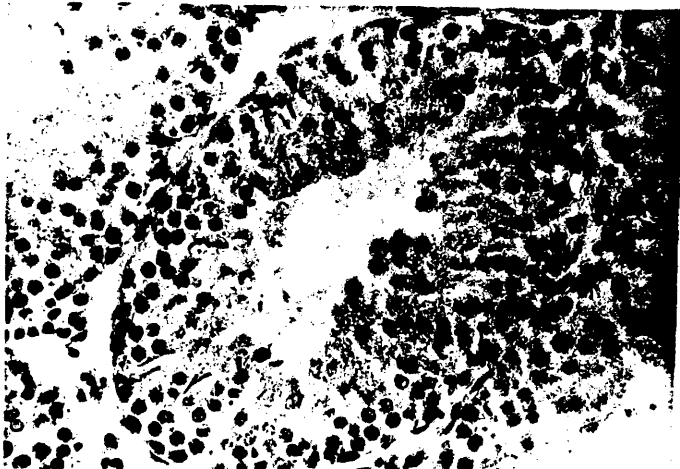


Fig. nº 50

Etapa XIV en túbulo del testículo de un animal tratado durante 18 días. Todo el epitelio aparece muy desorganizado y se ven células en la luz, pero hay espermátidas 14. (x250).

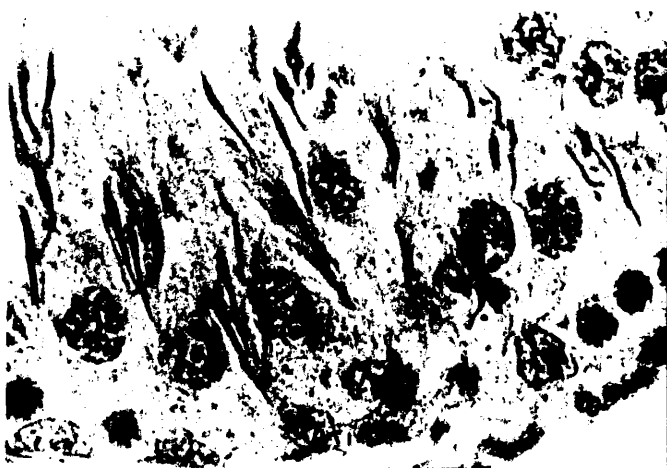


Fig. nº 51

Túbulo en etapa XIII perteneciente a un animal del grupo control. Las espermatidas 13 aparecen formando "penachos" entre el resto de las células del epitelio. (x1000).

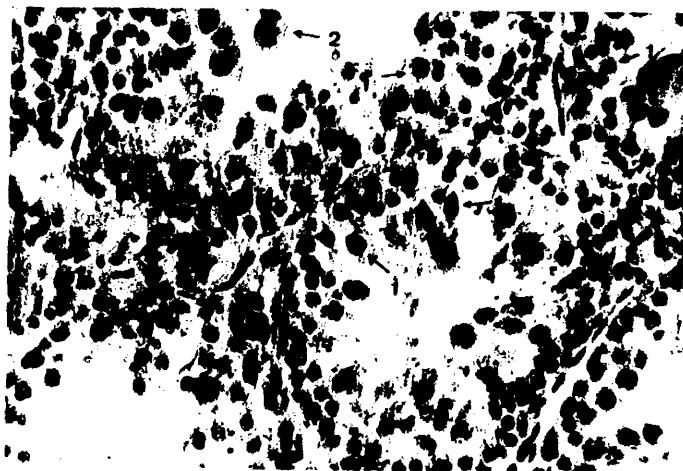


Fig. nº 52

Túbulos en avanzado estado de degeneración pertenecientes a un animal tratado 19 días. Las células germinales necróticas son muy frecuentes (1). A veces, forman células gigantes multinucleadas (2). (x250).

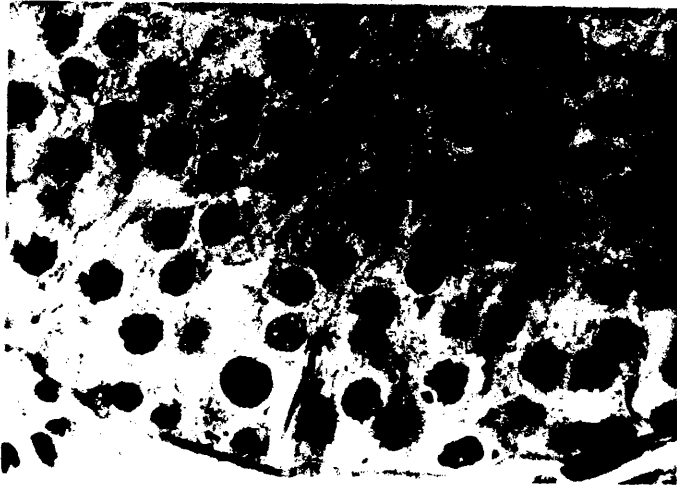


Fig. nº 53

Túbulo en la etapa II. Animal tratado 20 días. Faltan las espermátidas 16. La flecha señala un espermatocito paquiténico degenerado (hipercromático y rodeado de un espacio vacío). (x1000).

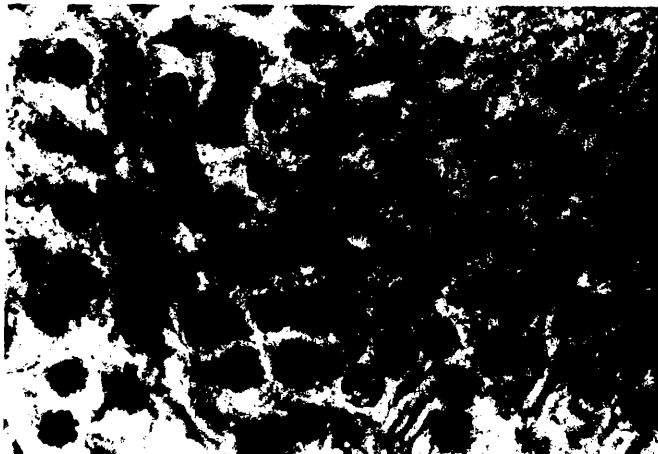


Fig. nº 54

Túbulo en la misma etapa (II) que el de la fotografía anterior. Compárese la densidad de espermátidas en un animal del grupo control. (x1000).

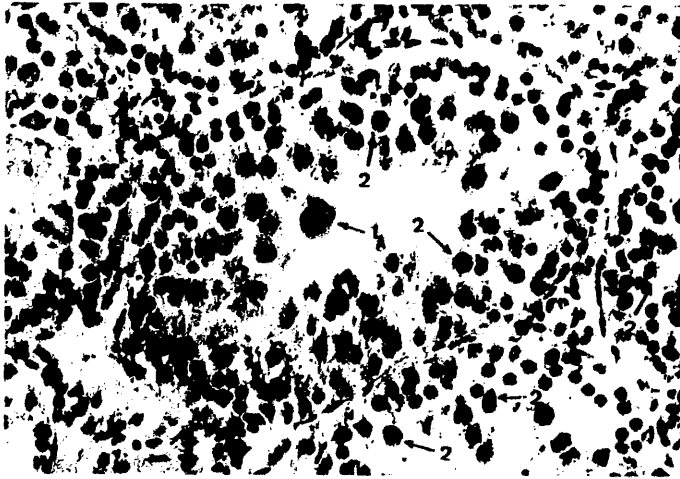


Fig. nº 55

Animal tratado 19 días. Los túbulos presentan un avanzado estado de degeneración. 1. Acúmulo de espermatidas 7 degeneradas que aparecen como una célula gigante multinucleada. 2. Espermatocitos paquiténicos degenerados. (x250).

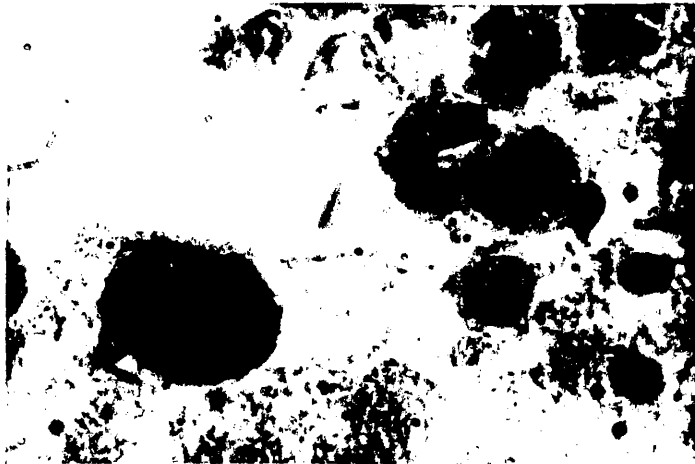


Fig. nº 56

Luz de un túbulo perteneciente a un animal sometido 19 días a tratamiento. La flecha señala una espermatida 8 degenerada. (x1000).

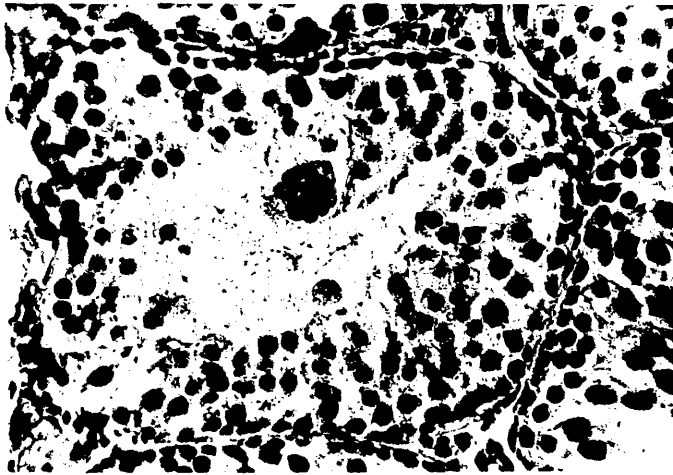


Fig. nº 57

Túbulo seminífero perteneciente a un animal tratado durante 17 días. Aparecen muchos espermatozoides paquítenicos y espermatidas tipo 8 degeneradas. (x400).

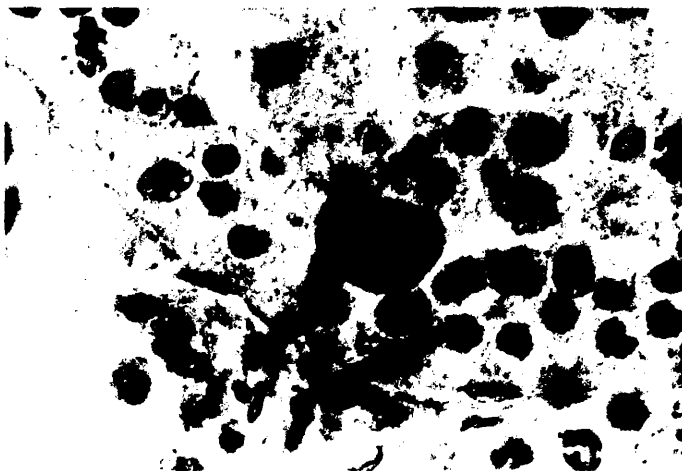


Fig. nº 58

Túbulo perteneciente a un animal tratado durante 20 días. Casi todo el epitelio se ha descamado. La flecha señala un cúmulo de restos de células degeneradas, en el que ya no se aprecia su procedencia. (x1000).

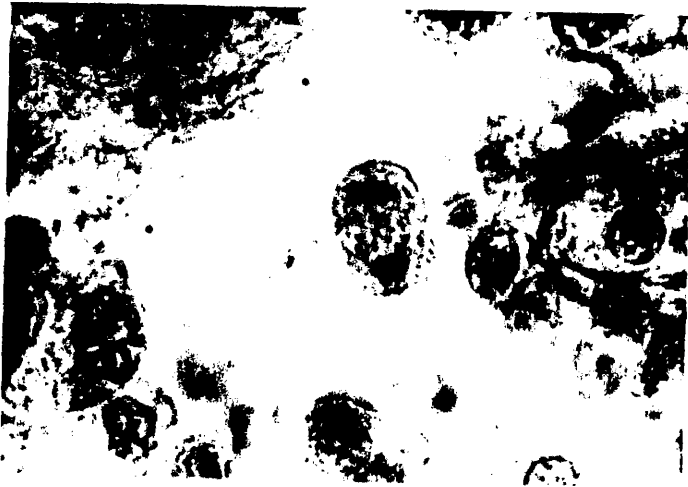


Fig. nº 59

Luz de un túbulo seminífero de un animal tratado 19 días.  
Se ve la telofase de un espermatocito II.



Fig. nº 60

Luz de un túbulo perteneciente a un animal tratado durante  
18 días. 1. Espermatocito II a punto de descamarse a la luz.  
2. Prolongación del citoplasma de una c. de Sertoli que lo  
sujeta. (x1000).

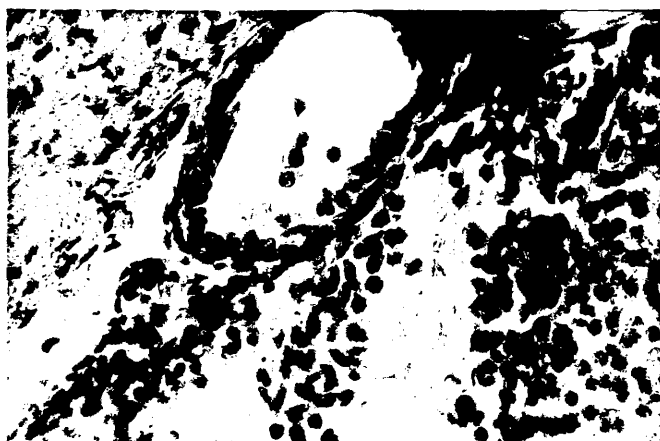


Fig. nº 61

Tubulo de la rete testis de un animal tratado durante 19 días. En su interior aparecen dos espermatidas inmaduras. (x250).

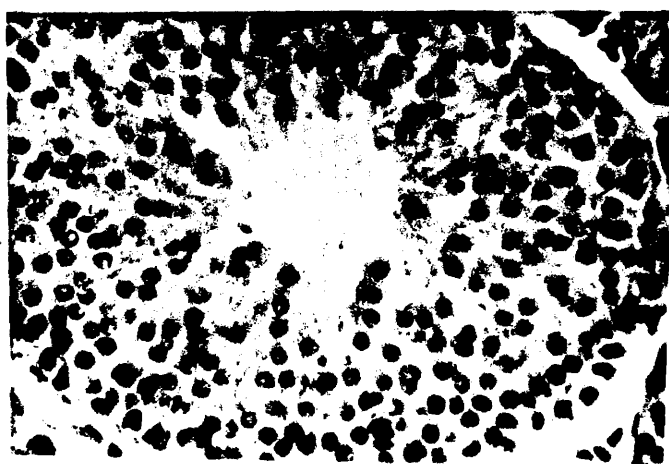


Fig. nº 62

Etapa VI-VII. Animal tratado durante 17 días. A pesar de la falta de espermatidas maduras y la desorganización de todo el epitelio, las espermatogonias B siguen entrando en mitosis. (punta de la flecha). La proporción c.S./c.g. es muy alta. (x400)

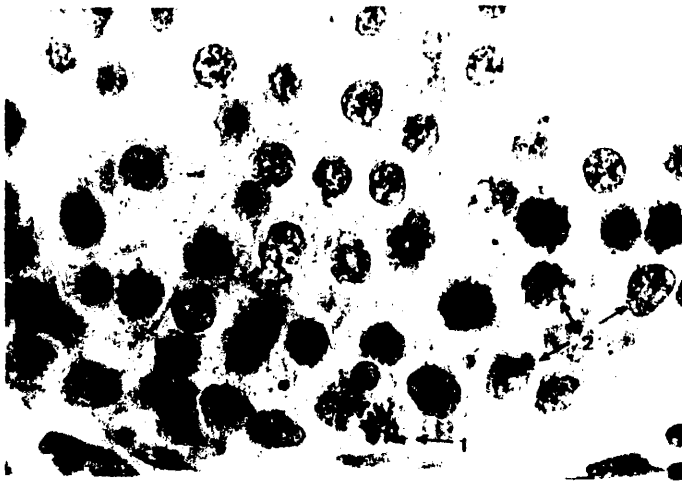


Fig. nº 63

Túbulo seminífero en etapa I. 16 días de tratamiento. La proporción células de Sertoli/células germinales, está muy aumentada. 1. Espermatogonia A4 en mitosis. 2. Célula de Sertoli con localización anormal. (x1000).

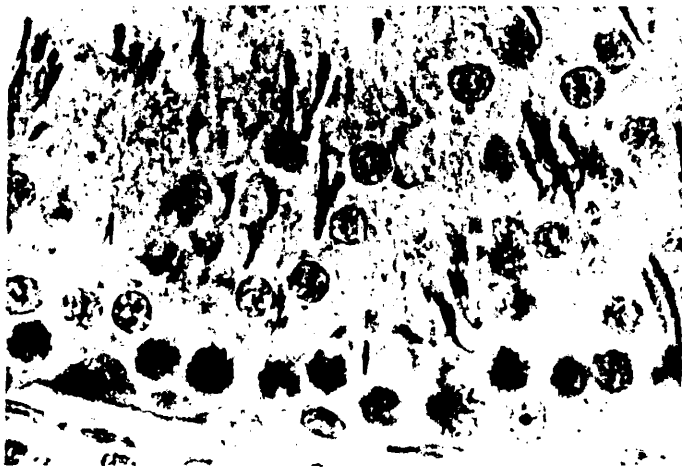


Fig. nº 64

Túbulo seminífero en la etapa I perteneciente a un animal del grupo control. Compárese con la fotografía anterior. (x1000).



Fig. nº 65  
Etapa VI. 16 días de tratamiento. Las células de Sertoli señaladas aparecen desplazadas hacia la luz. (x1000)

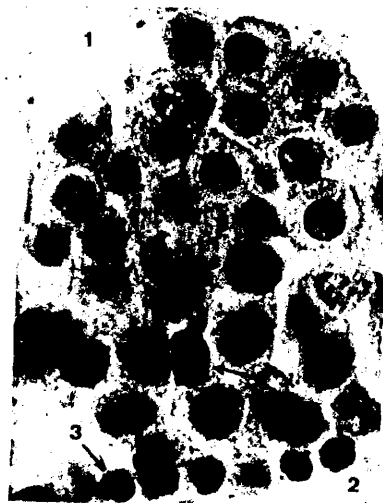


Fig. nº 66  
Etapa VII. 17 días de tratamiento. 1. Luz del túbulo. 2. Espacio linfático peritubular. 3. Espermatozocito PL. 4. C. de Sertoli. 5. Espermatozocito P. 6. Espermátida 7. (x1000).

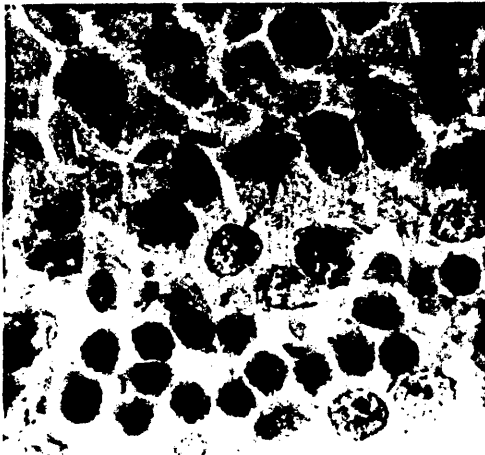


Fig. nº 67  
Etapa X. 17 días de tratamiento. 1. Células de Sertoli desplazadas hacia la luz. (x1000).

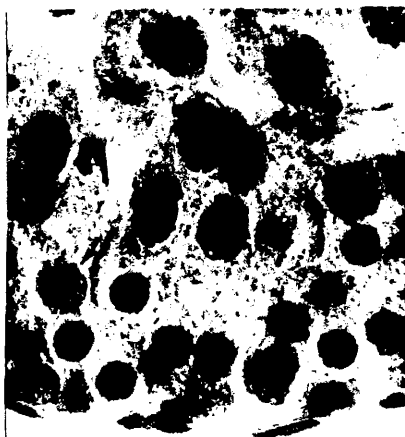


Fig. nº 68  
Etapa XII. 17 días de tratamiento. Célula de Sertoli desplazada hacia la luz. (x1000).



Fig. nº 69

Etapa VII-VIII. 20 días de tratamiento. Los núcleos de las células de Sertoli aparecen localizados sobre los espermatocitos preleptoténicos. (x1000).

Fig. nº 70

Etapa VII-VIII perteneciente a un animal del grupo control. Compárese con la fotografía anterior la localización de los núcleos de las células de Sertoli. (x1000).





Fig. nº 71

Túbulo seminífero en etapa XII perteneciente a un animal del grupo control. Los espermatocitos zigoténicos aparecen ordenados en una sola fila y los núcleos de las células de Sertoli cercanos a la lámina propia. (x1000).

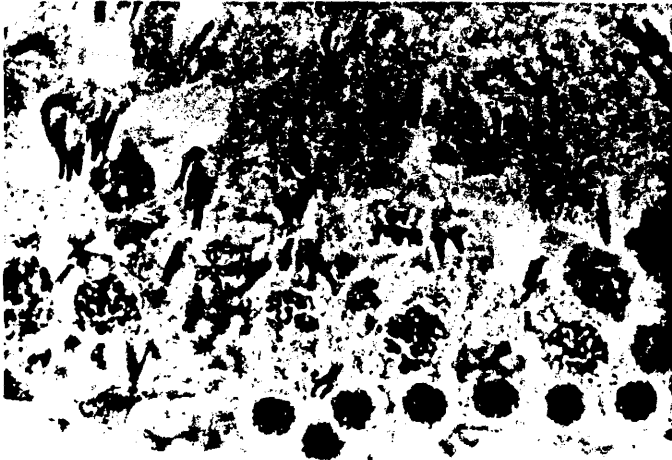


Fig. nº 72

Otro ejemplo igual al anterior. Los espermatocitos zigoténicos aparecen aquí perfectamente ordenados. (x1000).

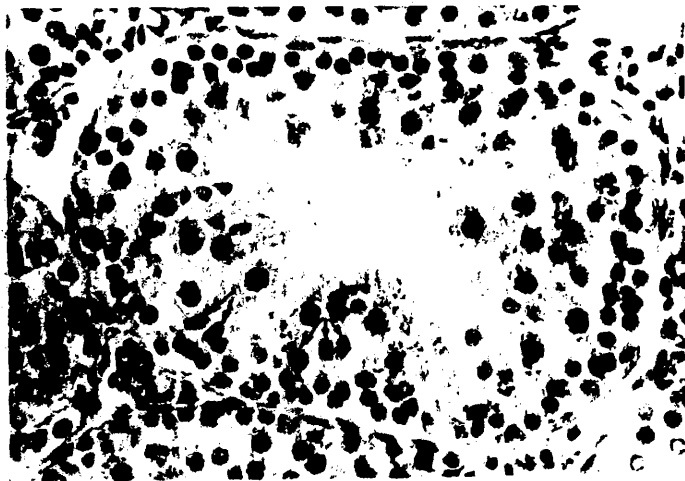


Fig. nº 73

Etapa X. 16 días de tratamiento. Descamación casi total del epitelio. Las células de Sertoli aparecen agrupadas y fuera de su localización habitual. (Flechas). (x400).



Fig. nº 74

Pared de un túbulo cuyo epitelio está casi totalmente descamado. Algunas células de Sertoli aparecen en la superficie.



Fig. nº 75

Otro ejemplo del fenómeno recogido en la fotografía anterior.

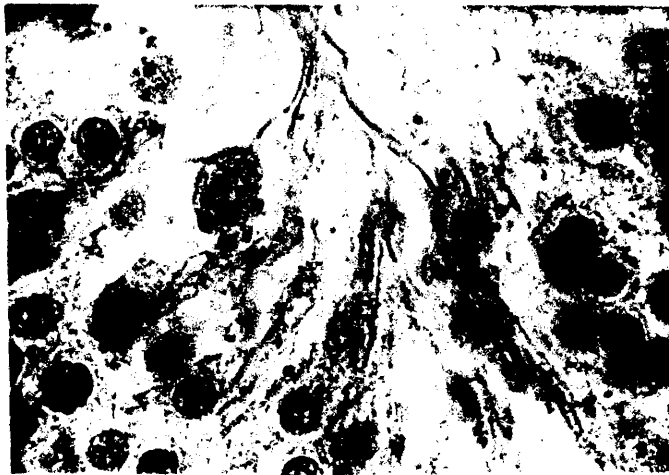


Fig. nº 76

Etapa VI. 17 días de tratamiento. Aparece una célula de Sertoli a punto de caer a la luz del túbulo. (x1000).



Fig. nº 77

16 días de tratamiento. Células de Sertoli en la luz del túbulo. (x1000).



Fig. nº 78

18 días de tratamiento. Célula de Sertoli en la luz del túbulo. (x1000).



Fig. nº 79

Aspecto que presenta el testículo de un animal tratado durante 19 días. Los túbulos totalmente degenerados son muy abundantes y siempre están rodeados por otros cuyo proceso de degeneración es también avanzado. (x100).

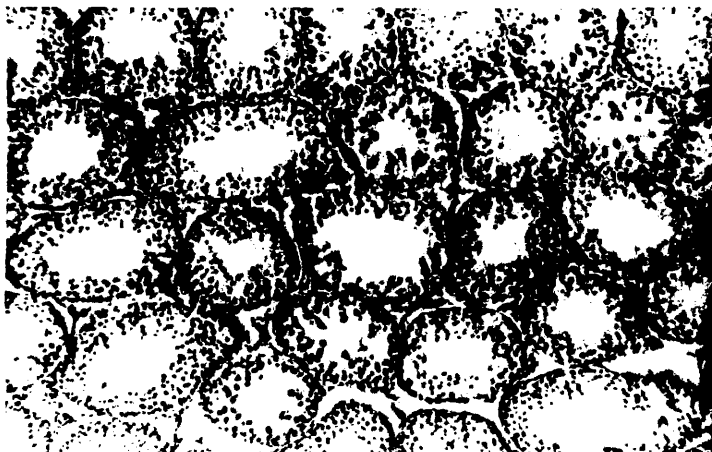


Fig. nº 80

Aspecto que presentan los túbulos seminíferos en un animal sometido a 21 días de tratamiento. La descamación en el epitelio de todos los túbulos es muy patente, así como la disminución de su diámetro. Las flechas señalan el acercamiento entre los núcleos de las células de la l. propia. (x100).

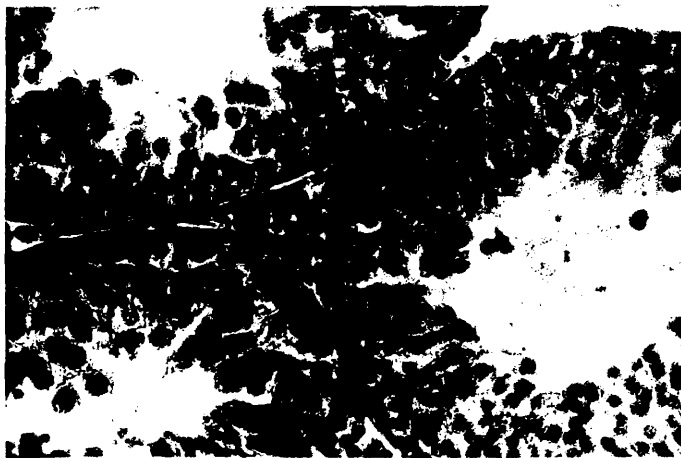


Fig. nº 81

Detalle de tres túbulos seminíferos de un animal tratado 22 días. 1. Espermatogonia B en mitosis. 2. Espermatogonia A<sub>4</sub> en mitosis. 3. Espermatida 6. 4. Espermatida 1. 5. Espermatidas 13. (x400).

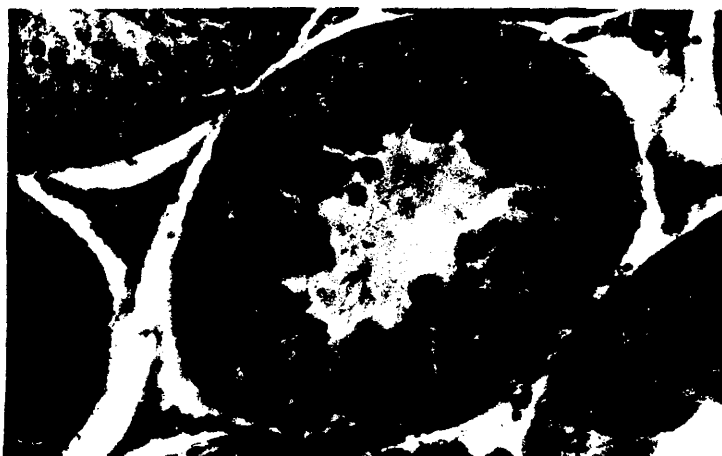


Fig. nº 82

Etapa XIII-XIV en un túbulo de un animal tratado 21 días. Se aprecia la segunda mitosis de los espermatocitos I, y espermatocitos II. Todavía quedan en el epitelio espermatidas 14. (x400).

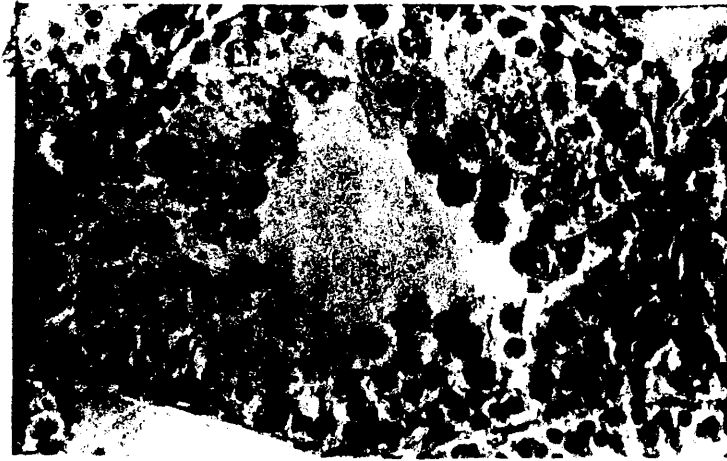


Fig. nº 83

Túbulo en etapa XIII. Animal tratado 24 días. Se observan varias fases de la mitosis de los espermatocitos I. (x400).

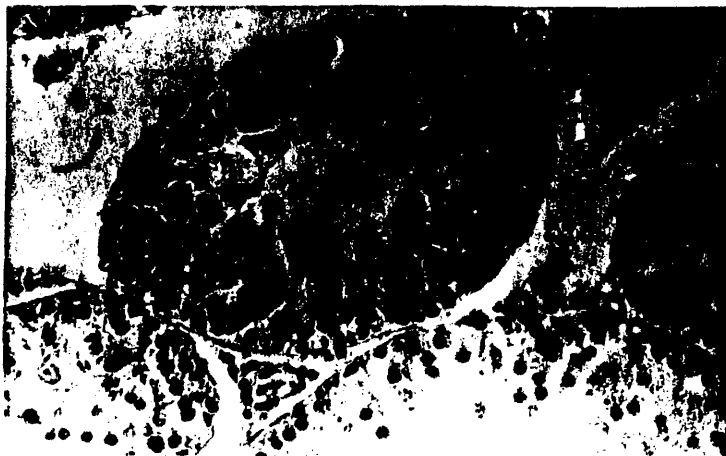


Fig. nº 84

Etapa IX en un animal tratado durante 21 días. Aunque todo el epitelio está muy desestructurado, encontramos la asociación celular completa. (x250).



Fig. nº 85

Etapa XIII en un animal sometido a 26 días de tratamiento. Faltan las espermátidas y el desorden entre las células que se mantienen en la pared del túbulo, es manifiesto. (x400).

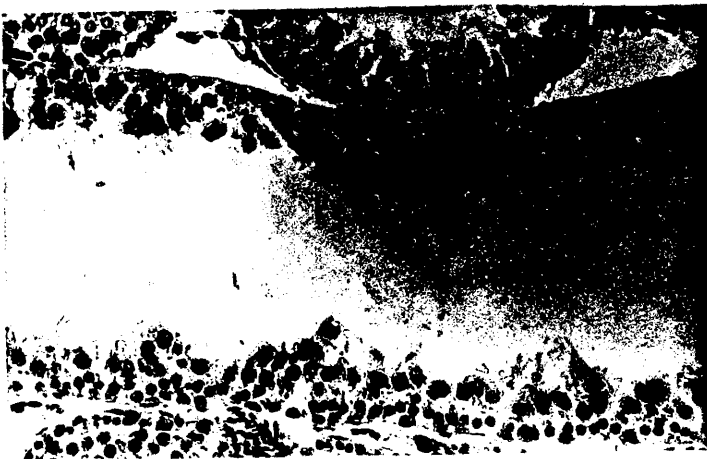


Fig. nº 86

Túbulo en etapa 10 u 11, en un animal tratado durante 27 días  
1. Espermatogonia A<sub>2</sub>. 2. Espermatocito leptoténico. 3. Espermatocito paquiténico. (x400).



Fig. nº 87

Túbulo en el que sólo se distinguen células de Sertoli, perteneciente a un animal tratado durante 27 días. (x400).

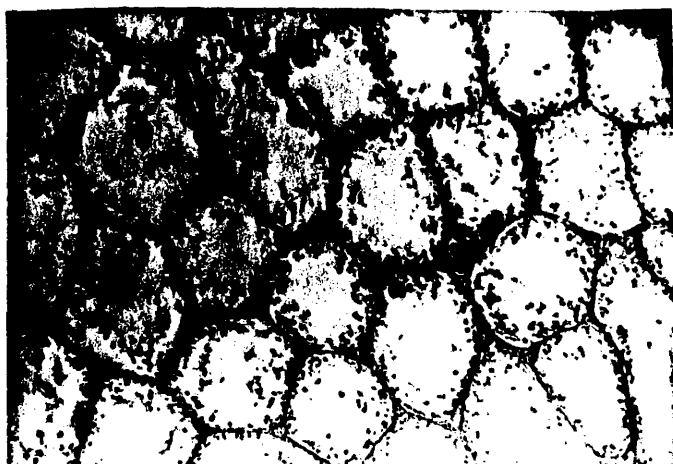


Fig. nº 88

Aspecto que presenta el testículo de un animal sometido a 32 días de tratamiento estrogénico. El epitelio de todos los túbulos ha sufrido una fuerte descamación y sólo quedan las células más basales. (x100).

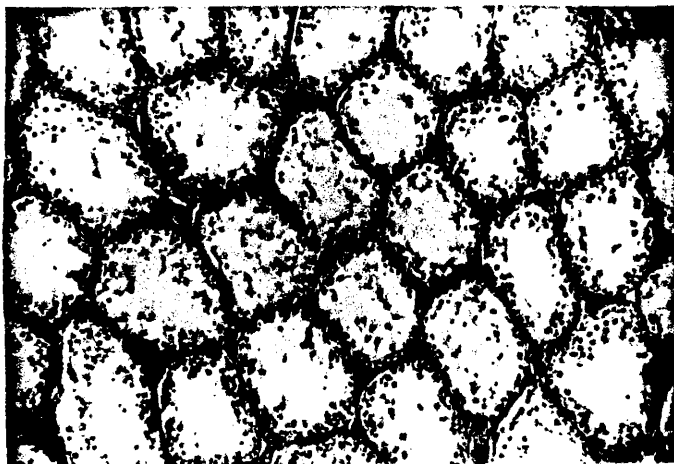


Fig. nº 89

Aspecto que presenta el testículo de un animal sometido a 35 días de tratamiento. Todos los túbulos presentan una fuerte descamación de su epitelio y sólo se conservan las células que ocupan posiciones más basales. (x100).



Fig. nº 90

Grupo de células de Leydig de un animal sometido a 10 días de tratamiento. Se observa la presencia de células oscuras y de contorno irregular. (x1000).



Fig. nº 91

Espacio intersticial abierto, en el que se observan, al lado de las células de Leydig, otra especie celular que se tiñe muy intensamente, y de tamaño más reducido. (x1000). Animal tratado 14 días.

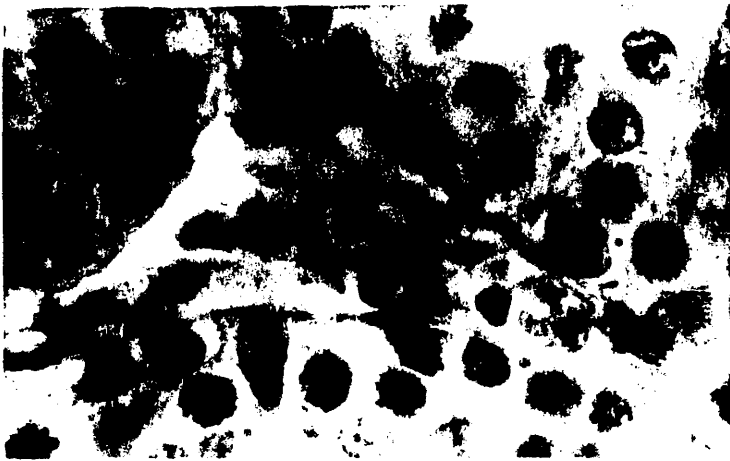


Fig. nº 92

Espacio intersticial cerrado, Animal tratado 20 días. (x1000)



Fig. nº 93

Espacio intersticial cerrado en animal tratado 23 días. Obsérvese el progresivo aumento de las células oscuras, pequeñas y de contornos irregulares, con relación a las células de Leydig. (xl.000).

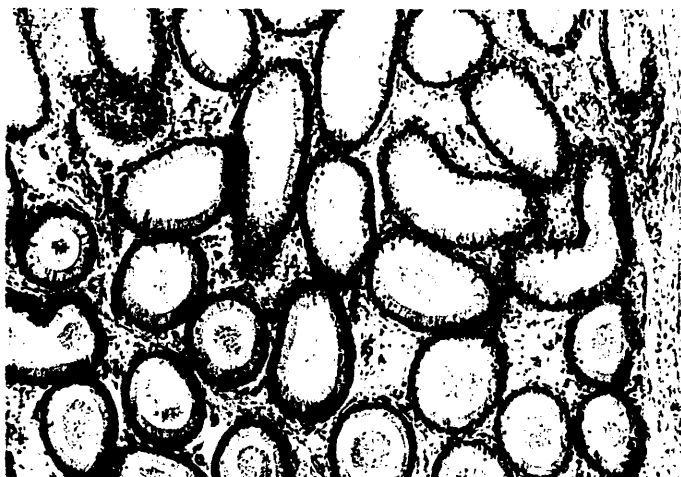


Fig. nº 94

Aspecto que presenta el epidídimo después de 10 días de tratamiento con 50 µg/d. de benzoato de estradiol. Los espermatozoides son más escasos que en los animales del grupo control. El diámetro de los tubos es menor y el epitelio que los tapiza más alto. El conjuntivo también aparece aumentado. (x100).

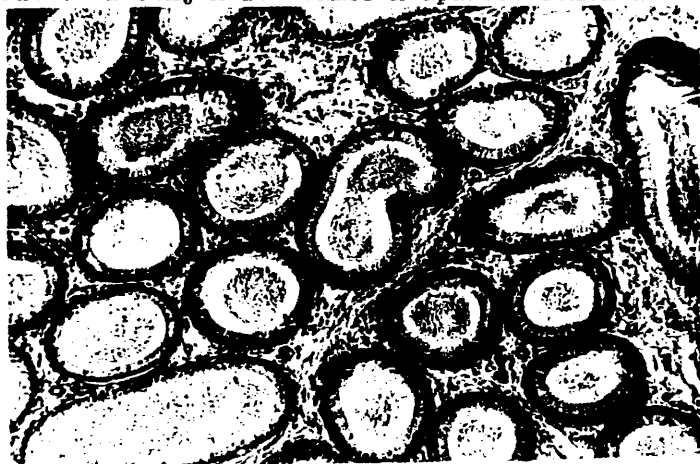


Fig. nº 95

Aspecto del epidídimo después de 10 días de tratamiento cuando la dosis de benzoato de estradiol administrada es de 250 µg/d.



Fig. nº 96

Detalle de la fotografía anterior. (x400)



Fig. nº 97

Epidídimo de un animal sometido a 10 días de tratamiento. Muchos túbulos pueden aparecer vacíos. (x400).

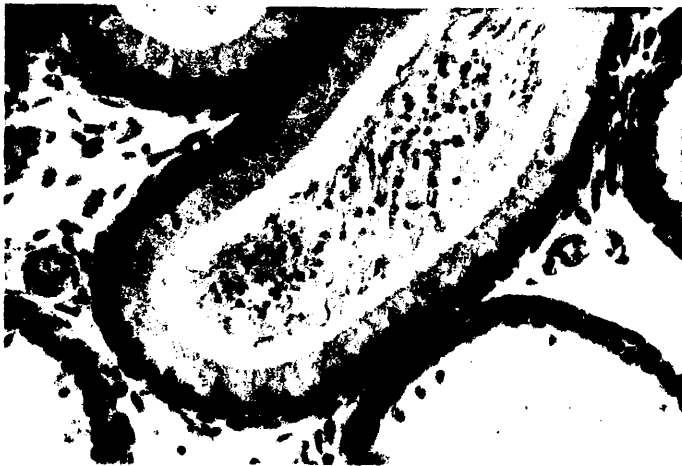


Fig. nº 98

Epidídimo de un animal tratado durante 10 días. Junto a los espermatozoides, aparecen otras células de la línea germinal (x400).

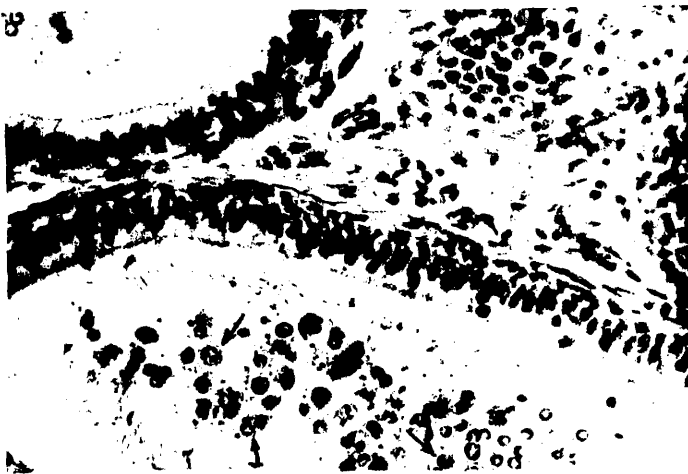


Fig. nº 99

Aspecto del epidídimo a los 14 días de tratamiento. Junto a los escasos espermatozoides, aparecen células de la línea germinal inmaduras. (x400).

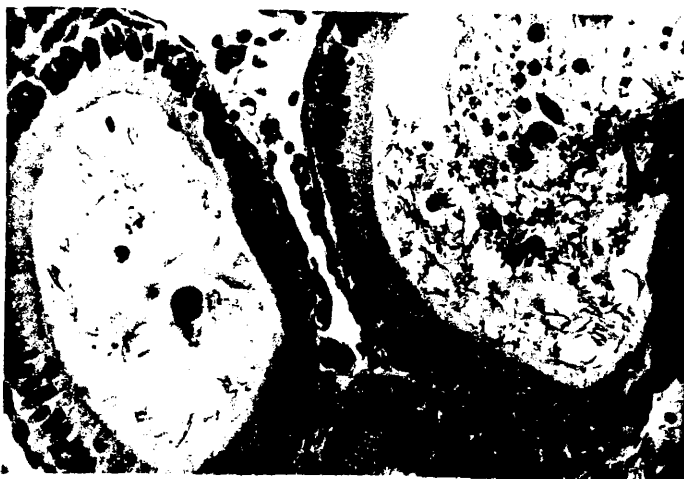


Fig. nº 100

Aspecto del epidídimo a los 15 días de tratamiento. Los espermatozoides son muy escasos. Aparecen muchas células de la línea germinal alteradas. (x400).

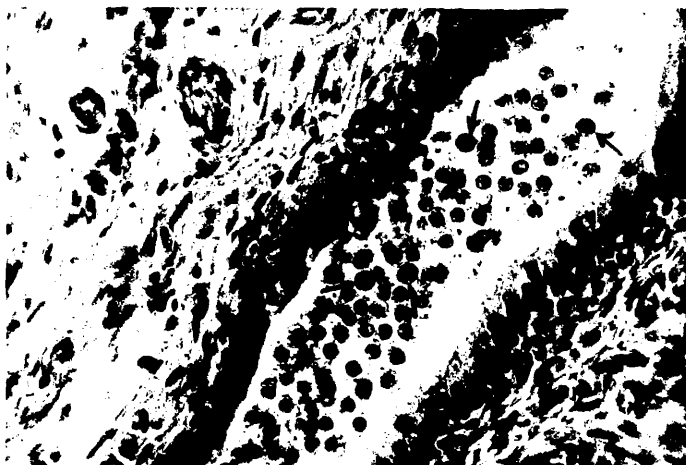


Fig. nº 101

Aspecto del epidídimo a los 18 días de tratamiento. Ya no se ven espermatozoides y las células germinales inmaduras son muy abundantes. (x400).

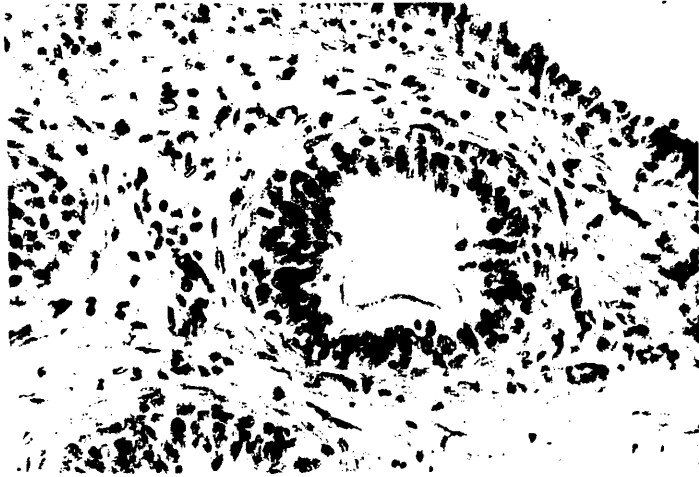


Fig. nº 102

Aspecto del epidídimo a los 24 días de tratamiento. El diámetro tubular está muy disminuído. Los tubos aparecen vacíos. El epitelio y la membrana basal sobre la que se apoya están muy engrosados. Hay gran cantidad de tejido conjuntivo. (x400).



Fig. nº 103

Epidídimo a los 20 días de tratamiento. Todos los tubos aparecen vacíos. (x100).



Fig. nº 104

Epidídimo a los 30 días de tratamiento. (x100)

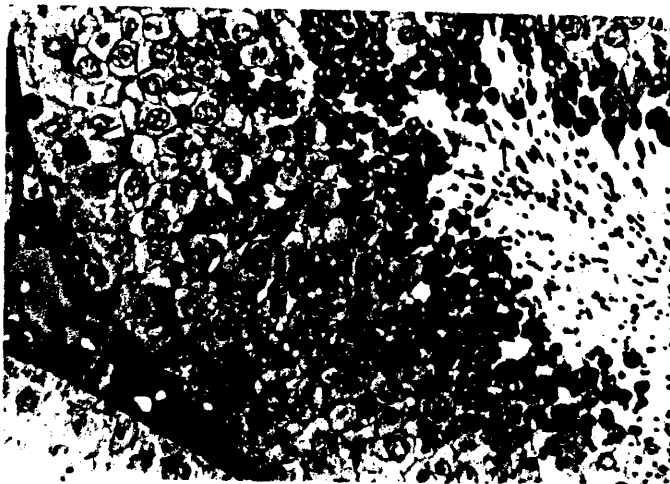


Fig. nº 105

Etapa VI de un animal del grupo control. 1. Espermatogonia B  
2. Espermatocito paquiténico. 3. Espermatida 6. 4. Espermatida 18. Corte semifino ( $1 \mu$ ), teñido con azul de toluidina. (x400).

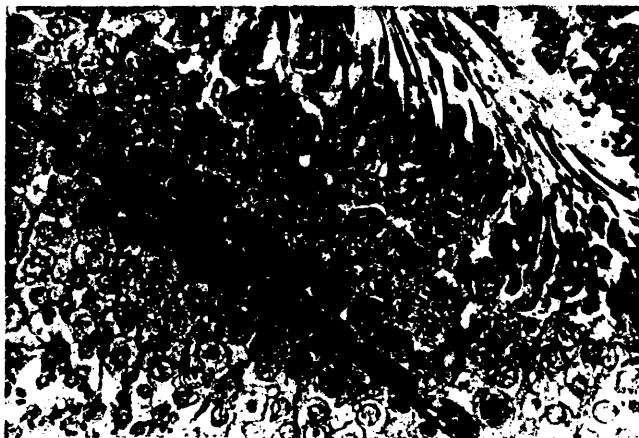


Fig. nº 106

Etapa VI-VII en un animal del grupo control. 1. Espermatogonia B. 2. Núcleo de célula de Sertoli. 3. Espermatocitos paquiténicos. 4. Espermatida 6-7. 5. Espermatida 18-19. La gota citoplásmica se está deslizando hacia el cuello. (x400).

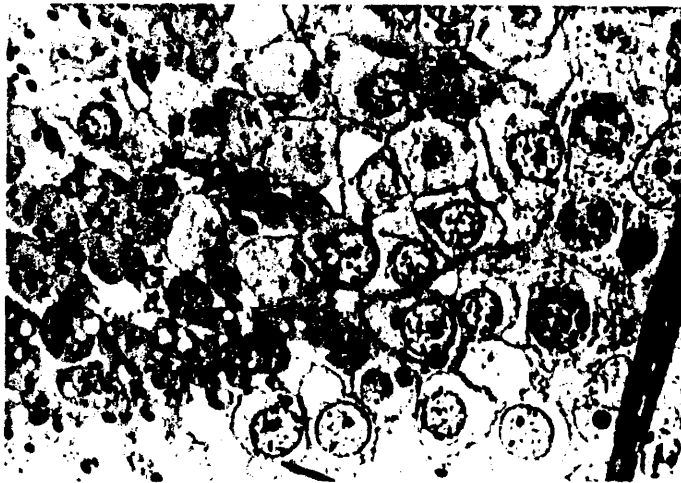


Fig. nº 107

Etapa VI-VII. Animal del grupo control. 1. Célula de Sertoli. 2. Espermatocito preleptoténico. 3. Espermatocito paquiténico. 4. Espermátida 7. 5. Espermátida 19. Corte semifino (x1000)

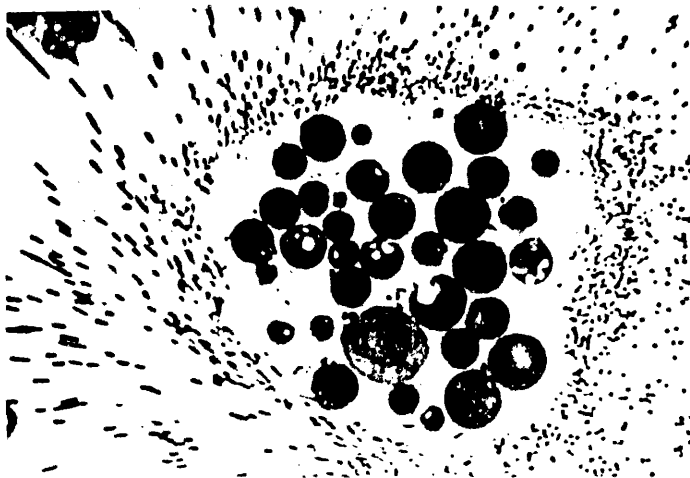


Fig. nº 108

Luz de un túbulo en etapa VII. Animal tratado 12 días. Las gotas citoplasmáticas aparecen libres en la luz. (x1000).

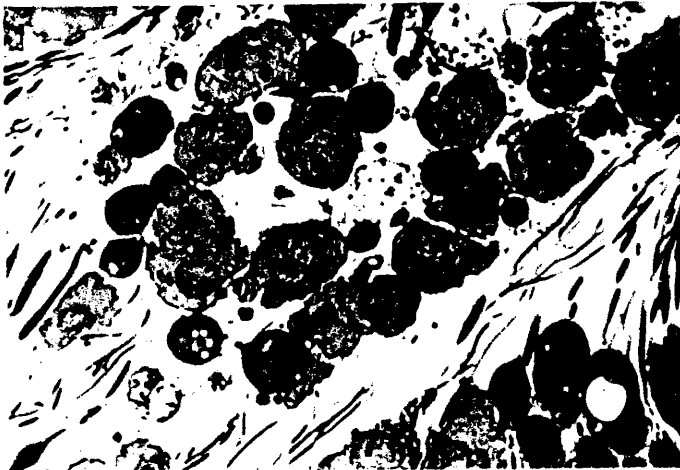


Fig. nº 109

Gotas citoplasmáticas y espermátidas en la luz de un túbulo. Animal tratado 12 días. (x1000).

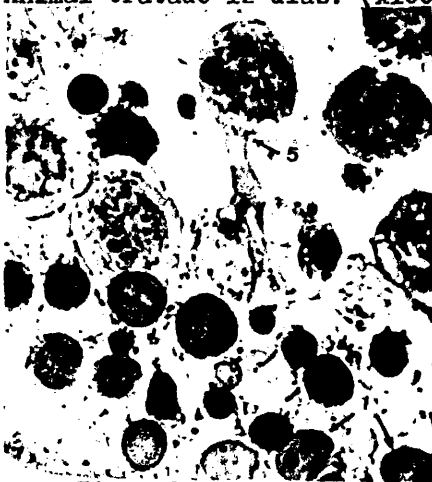


Fig. nº 110

35 días de tratamiento. Epitelio formado sólo por: 1. C de Sertoli, 2. espermátocitos zigoténicos y 3. paquiténicos, escasos y alterados, 4. abundantes gotas lipídicas. En la luz célula muy alterada, sujeta todavía por prolongación de c. de Sertoli(5).(x1000).



Fig. nº 111

Etapa VII. 17 días de trat. 1. Espacio dejado por células degeneradas. 2. Espermátocito P. junto a lámina propia (3). 4. C. de Sertoli. 5. Espermátocito leptoténico. (x1000).

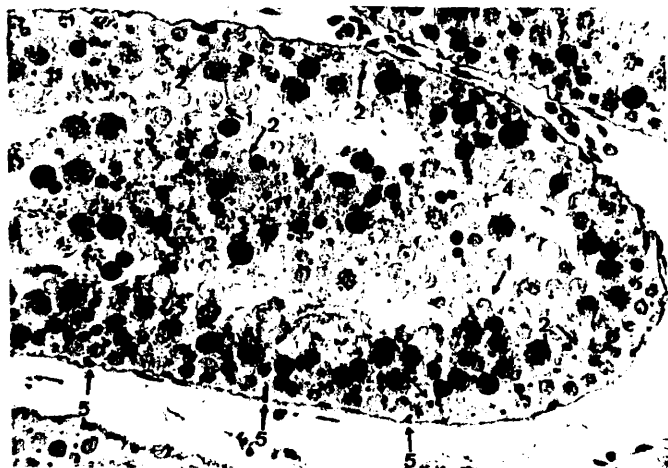


Fig. nº 112

Etapa VI. Animal tratado 32 días. Todavía pueden verse algunas espermátidas 6 (1). La proporción células de Sertoli/cél. germinales está muy aumentada (2). Se observa gran acúmulo de gotas lipídicas (3). En la luz aparecen todas las células de la asociación celular de esta etapa, incluidas las c. de Sertoli. Aparecen células atípicas en las que ha fallado la citocinesis (4). Las células mioides, para adaptarse al nuevo diámetro tubular, se pliegan sobre sí mismas (5) (x400).

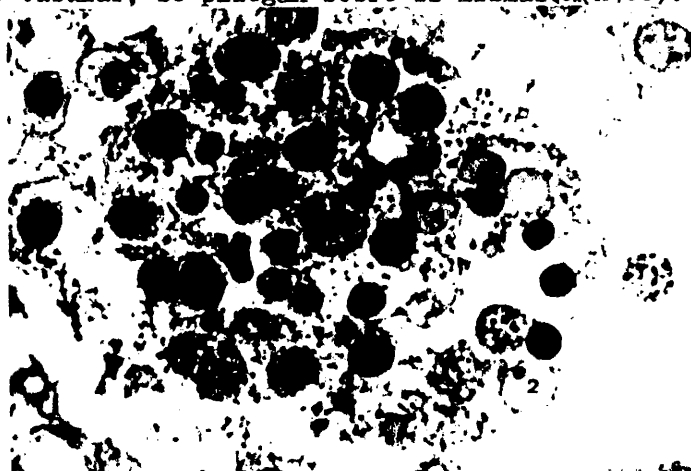


Fig. nº 113

Animal tratado 35 días. Luz del túbulo en la que aparecen espermátocitos (1), c. de Sertoli (2) y gotas lipídicas (3).



Fig. nº 114

Túbulo muy degenerado de un animal tratado 35 días. Sólo quedan en el epitelio células de Sertoli (1), algún espermatocito cigoténico (2) y gotas lipídicas(3)(x400).



Fig. nº 115

Células de Leydig de un animal tratado durante 17 días. (x1000).



Fig. nº 116

Células de Leydig a los 35 días de tratamiento.(x1000)

293

M I C R O S C O P I A  
E L E C T R O N I C A

294

**Micrografías correspondientes  
a animales del  
grupo control**

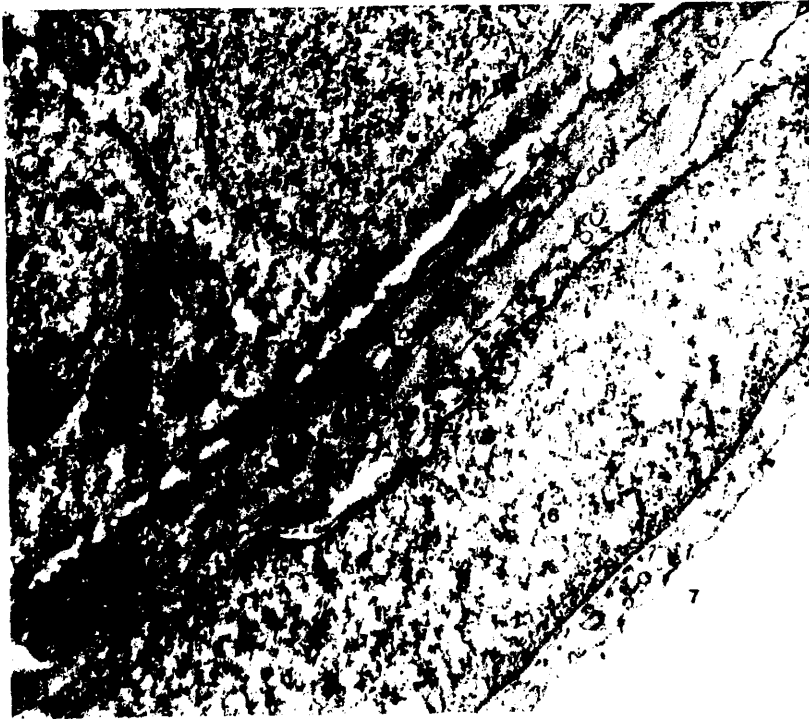


Fig. nº 117

Lámina Propia

1. Célula de Sertoli. 2. Espermatogonia. 3. Membrana basal interna (con sus tres subláminas: homogénea, fibrilar y homogénea). 4. Célula mioide. 5. Membrana basal externa. 6. Célula endotelial. 7. Espacio linfático peritubular (Según Clark, 1976). (x 20.000 aprox.)

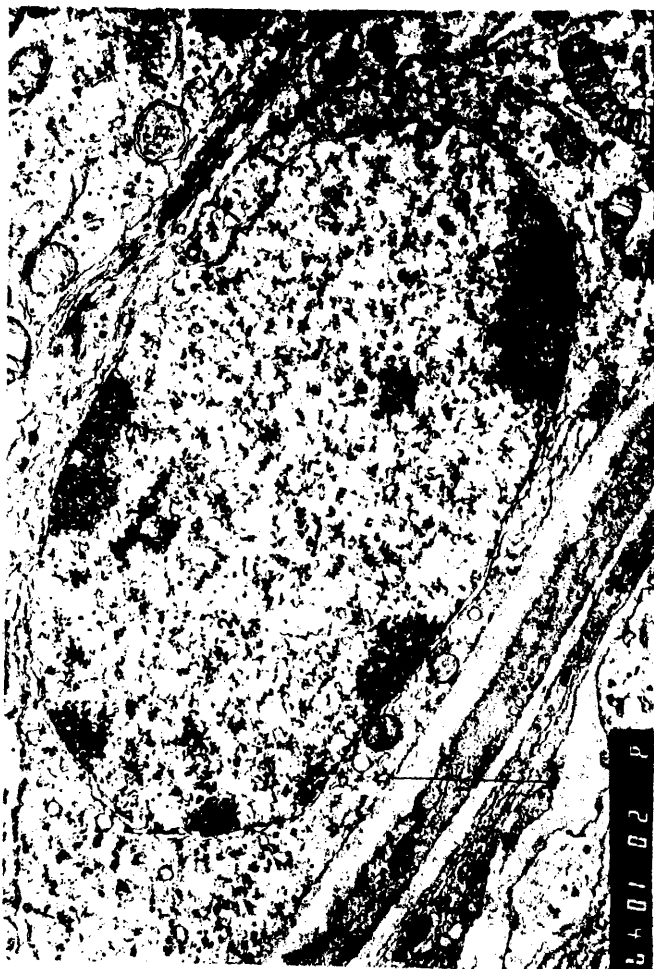


Fig. nº 118

Espermatogonia A1 en la etapa VI del ciclo espermatogénico, correspondiente a un animal del grupo control. 1. Lámina propia. 2. Espermatogonia. 3. Unión espermatogonia/célula de Sertoli. 4. Vesícula con cubierta. 5. Célula de Sertoli. 6. Complejo túbulo-bulbar entre células de Sertoli vecinas. 7. Zona especializada de unión entre células de Sertoli.



Fig. nº 119

Espermatogonia B

1. Lámina propia. 2. Espermatogonia B. 3. Célula de Sertoli  
Obsérvese la diferencia entre las mitocondrias de la espermatogonia y las de la célula de Sertoli. (x 20.000 aprox.)



Fig. nº 120

Espermatocito preleptoténico

1. Lámina propia. 2. Espermatocito preleptoténico. 3. Célula de Sertoli. 4. Vesículas de micropinocitosis (con cubierta). (x 15.000)



Fig. nº 121

## Espermatocito paquiténico

1. Citoplasma del espermatocito.
  2. Citoplasma de una célula de Sertoli.
  3. Mitocondria con la morfología característica de los espermatocitos.
  4. Poros de la membrana nuclear.
- (x 8.000 aprox.)



Fig. nº 122  
Espermatocito paquiténico (VIII)

1. Núcleo. 2. Cuerpo cromatoideo en formación. 3. Cisternas de retículo endoplásmico. (x12.000 aprox.)

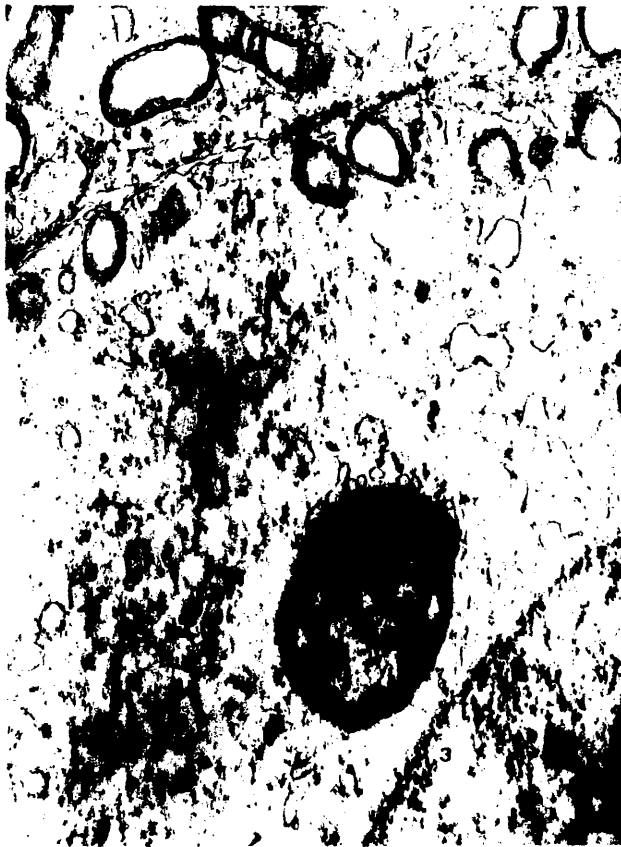


Fig. nº 123

Espermátida tipo 1

1. Cuerpo cromatoideo. 2. Vesículas de retículo endoplásmico asociadas al cuerpo cromatoideo. 3. Núcleo. (x12.000)

Explicación de la figura nº 124

Espermátida tipo 7.

1. Gránulo acrosómico. 2. Vesícula acrosómica. 3. Refuerzo del borde inferior interno del acrosoma. 4. Centriolos. 5. Mitocondrias. 6. Vesícula con cubierta. 7. Espermátida tipo 19. (x 15.000 aprox.).



Fig. n° 124

Explicación de la Fig. nº 125

1. Refuerzo del borde inferior interno de la vesícula acrosómica.
2. Hendidura de la membrana nuclear enfrente al refuerzo acrosómico.
3. Engrosamiento de la región subacrosómica de la cara interna de la membrana nuclear.
4. Unión espermatida/Célula de Sertoli.
5. Citoplasma de la célula de Sertoli.
6. Cisterna del retículo endoplásmico asociadas a vesículas con cubierta.
7. Vesícula con cubierta en las cercanías de las vesícula acrosómica. (x8.000 aprox.).

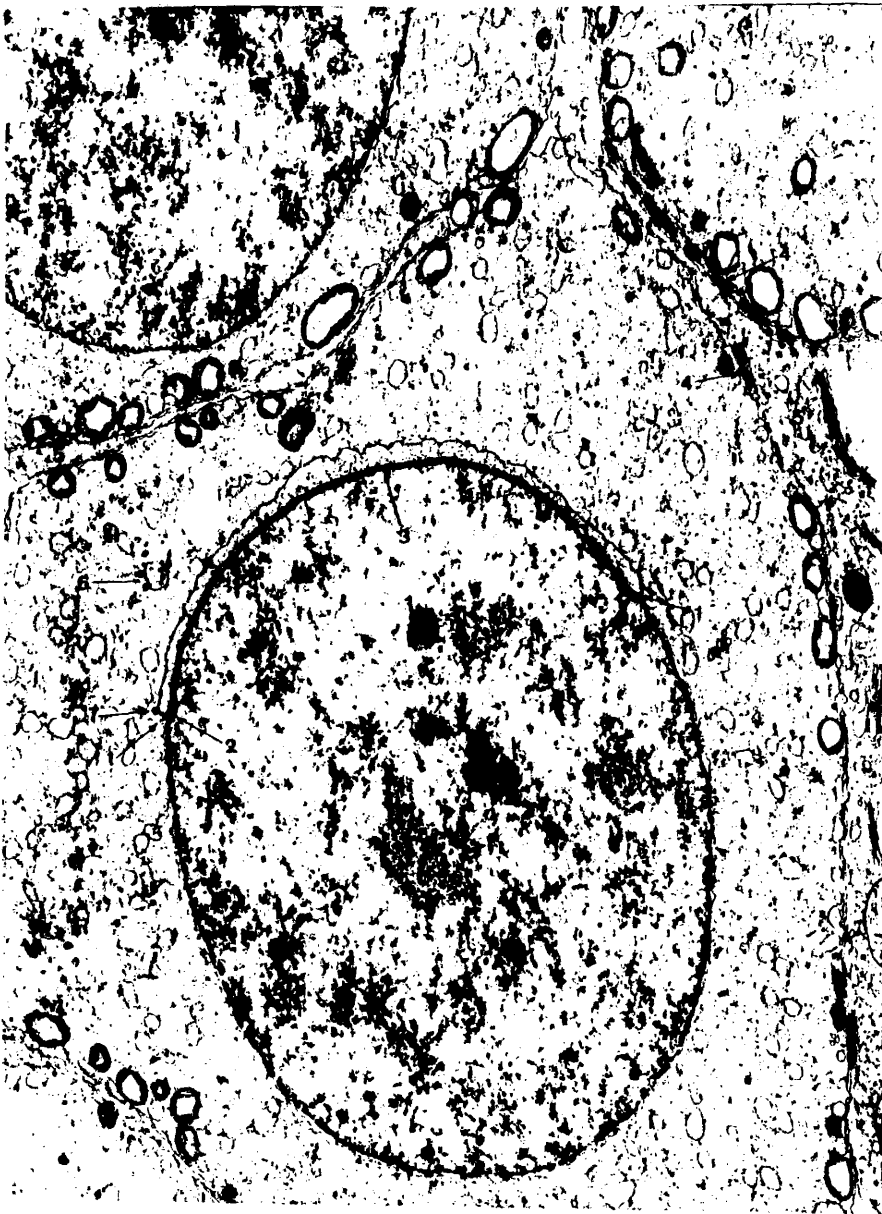


Fig. n° 125



Fig. nº 126

1. Vesículas con cubierta en el seno del aparato de Golgi.
2. " " " asociadas a la vesícula acrosómi
- ca. 3. Refuerzo del borde inferior interno de la vesícula acrosómica. (x20.000 aprox.).



Fig. nº 127

Espermátida tipo 6

Las flechas señalan vesículas con cubierta en el seno del aparato de Golgi. (20.000 aprox.).



Fig. nº 128

Corte transversal de la cola de una espermátida 16. En la go  
ta citoplásmica se pueden apreciar: 1. Gotas lipídicas. 2.  
Restos de mitocondrias. 3. Lamelas anilladas. 4. Lisosomas.  
5. Polisomas. 6. Vesículas con cubierta.



Fig. nº 129

Luz del túbulo.

Aparecen espermátidas 16 en un corte transversal. Las flechas señalan restos citoplasmáticos rodeados por cisternas de retículo endoplásmico liso. En las gotas citoplásmicas se ven además vacuolas autofágicas (1), Lisosomas (2), vesículas con cubierta (3)... (x20.000 aprox.).

Explicación de la figura nº 130

- A) Corte craneal de una espermátida tipo 18, perteneciente a la etapa VI del ciclo del epitelio seminífero.
1. Núcleo de la espermátida 18:
  2. Prolongación apical de la célula de Sertoli.
  3. Material fibrilar electrodensó entre la espermátida y la célula de Sertoli.
  4. Microtúbulos.
  5. Luz del túbulo.
- B) Corte transversal de espermátida 18.  
(x25.000).



Fig. n° 130

Explicación de la figura nº 131

Sección craneal de una espermátida tipo 18

1. Núcleo.
2. Prolongación apical de la Célula de Sertoli.
3. Microtúbulos.
4. Célula de Sertoli.
5. Luz del túbulo.

(x25.000).



Fig. n° 131

Explicación de la figura nº 132

Célula de Sertoli.

1. Núcleo.
  2. Nucleolo.
  3. Poros nucleares.
  4. Escotadura nuclear.
  5. Mitocondrias.
  6. Cisternas del aparato de Golgi.
  7. Lisosoma.
  8. Cuerpos multilaminares.
  9. Microtúbulos.
  10. Unión espermatogonia/célula de Sertoli.
  11. Espermatocito paquiténico.
  12. Espermatogonia.
- (x10.000).

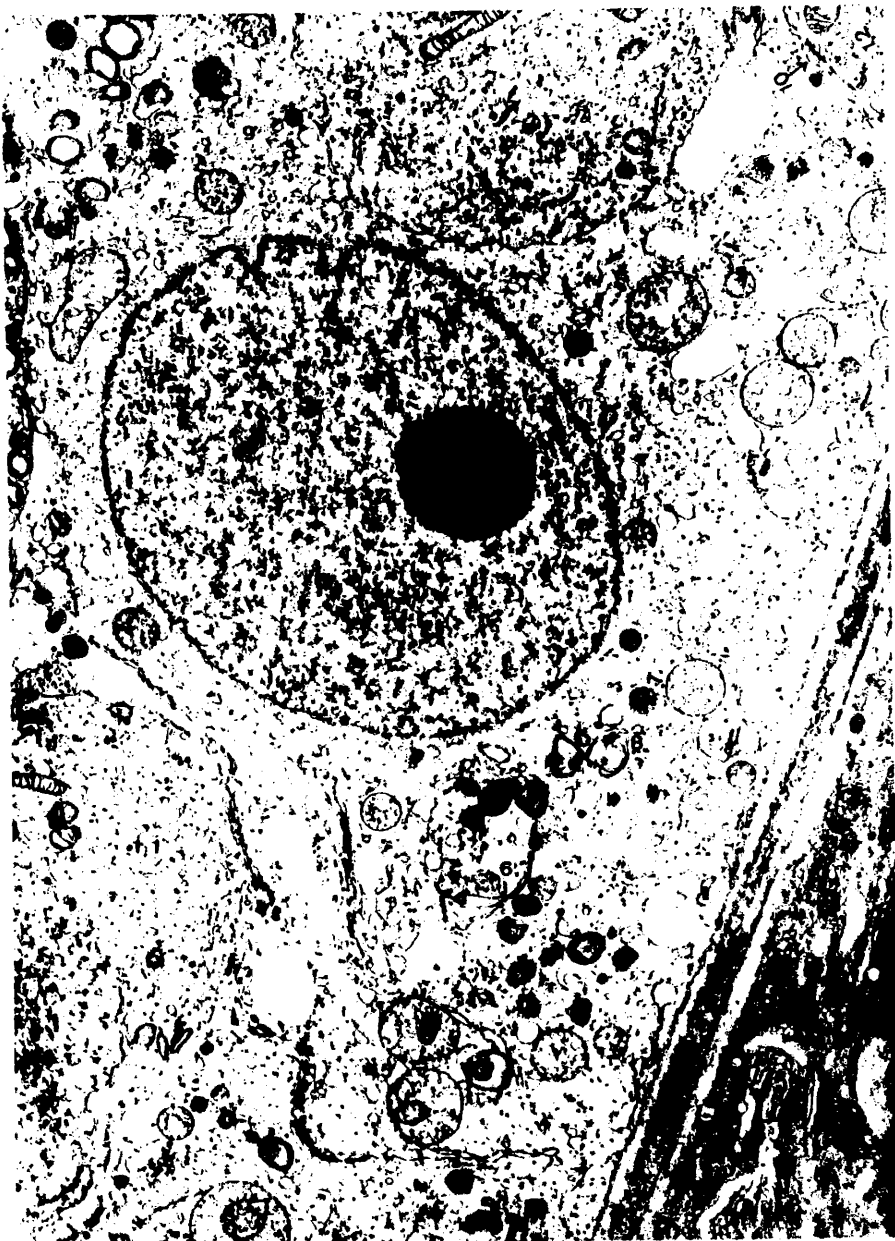


Fig. n° 132



Fig. nº 133.

Unión especializada entre células de Sertoli.

1. Citoplasma de célula de Sertoli.
  2. Cisternas de R.E.
  3. Haces de microfilamentos. 4. Zónula adherens.
- (x25.000).



Fig. nº 134  
Célula de Sertoli

Aspecto normal de una célula de Sertoli a Microscopía electrónica. 1. Citoplasma de la célula de Sertoli. 2. Espermatozito paquiténico. 3. Sucesión de zónulas occludens (barrera hemato-testicular). Unión entre células de Sertoli. (x10.000).

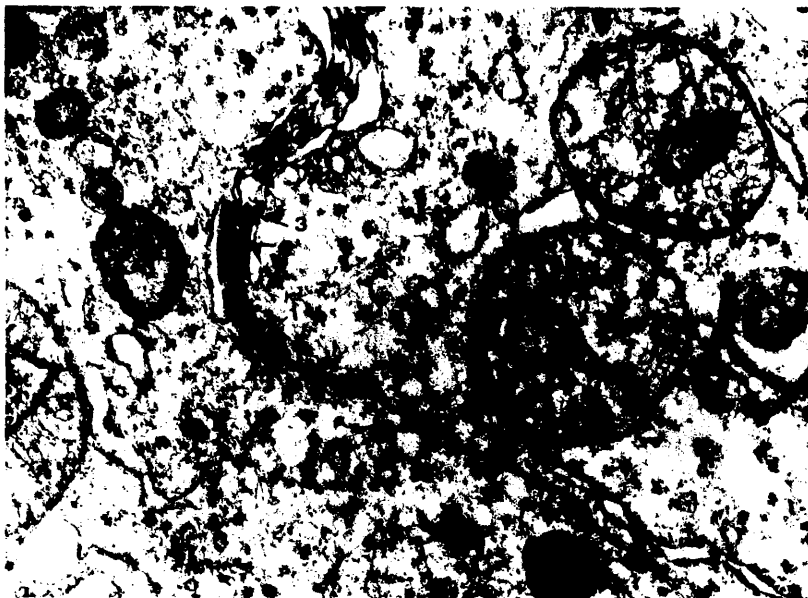


Fig. nº 135

Detalle de la fotografía anterior.

1. Zónula occludens.
  2. Haces de microfilamentos.
  3. Cisternas de retículo endoplásmico.
- (x25.000).



Fig. nº 136

Compartimento basal del túbulo seminífero.

1. Espermatogonia B de una etapa V.
2. Célula de Sertoli.
3. Zónulas occludens, expresión morfológica de la barrera hemato-testicular.
4. Unión espermatogonia/C.de Sertoli.



Fig. nº 137

Compartimento luminal

1. Zónulas occludens que constituyen la barrera hemato-tes-  
ticular. 2. Célula de Sertoli. 3. Espermatocito paquiténico.
4. Espermatocito leptoténico. 5. Complejo túbulo-bulbar.  
(x8.000 aprox.).



Fig. nº 138  
Célula de Leydig.  
(x8.000 aprox)

Micrografías pertenecientes  
a los grupos de animales so  
metidos a tratamiento.



Fig. nº 139

Pared de un túbulo en etapa V, perteneciente a un animal so  
metido a tratamiento con benzoato de estradiol durante 10  
días. (x8.000 aprox.).



Fig. nº 140

Zona superficial del epitelio seminifero de un túbulo en la etapa I, perteneciente a un animal sometido a tratamiento estrogénico durante 14 días. (x4.000 aprox.)

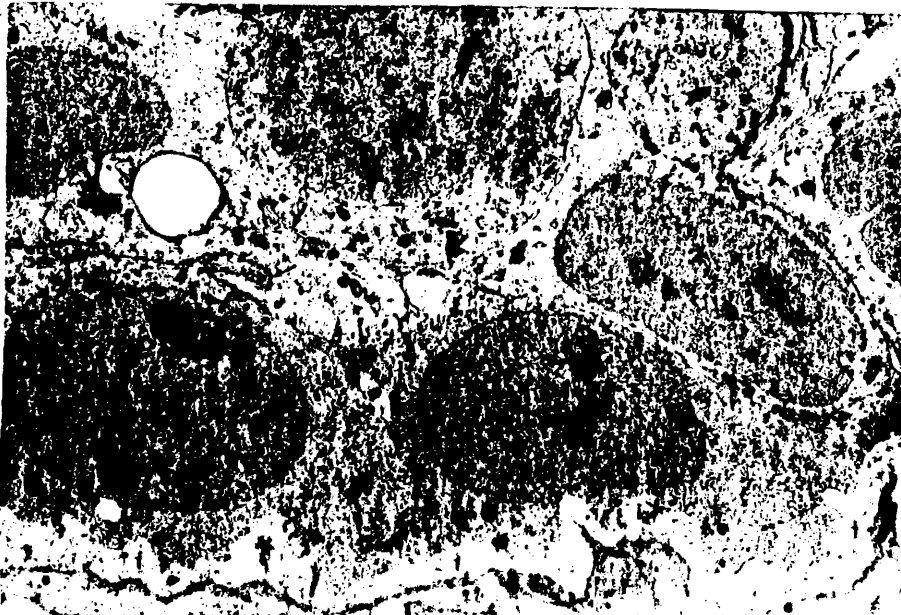


Fig. nº 141

Zona basal del epitelio de un túbulo perteneciente a un animal sometido a tratamiento durante 32 días. Las flechas señalan las invaginaciones y evaginaciones citoplasmáticas atípicas entre las células. 1. Lámina propia. 2. Espermatogonias alteradas. 3. Puente citoplasmático entre las espermatogonias. 4. Células de Sertoli. 5. Espermatocito muy alterado. 6. Gota lipídica. (x5.000).

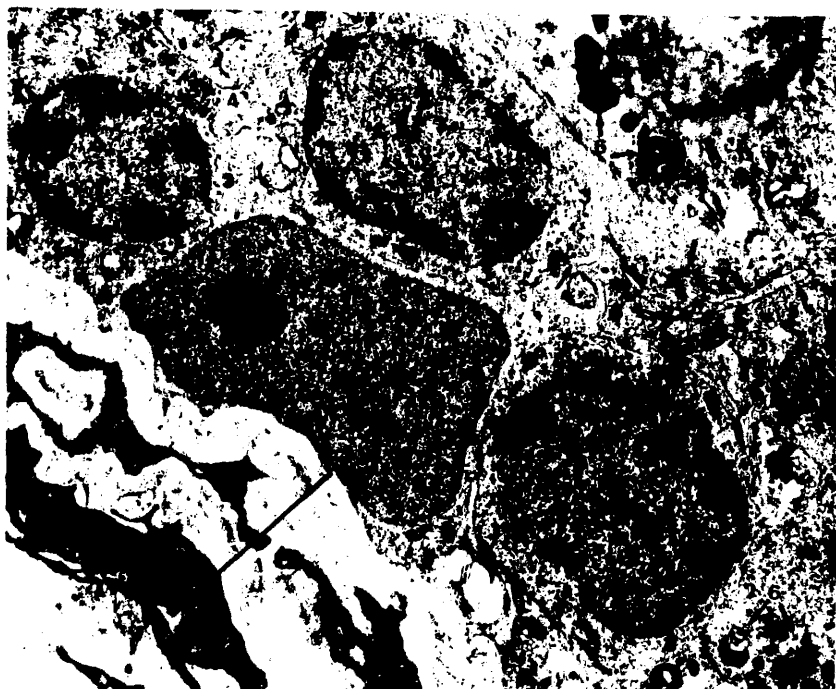


Fig. nº 142

Zona basal del epitelio seminifero de un animal sometido a 27 días de tratamiento. Las flechas señalan las invaginaciones y evaginaciones de las membranas plasmáticas. Todas las células presentan signos claros de degeneración. 1. Lámina propia. 2. Células de Sertoli. 3. Espermatocitos leptoténicos. 4. Puente citoplasmático entre espermatocitos. 5. Unión entre células de Sertoli. 6. Residuos celulares. 7. Gota lipídica. (x10.000).



Fig. nº 143

Pared de un túbulo seminífero de un animal tratado durante 22 días. 1. Células de Sertoli fuera de su localización habitual y muy alteradas. 2. Espermatocitos paquiténicos, también muy alterados (intensa vacuolización y tinción muy débil). 3. Estructura similar al satélite nucleolar de las células de Sertoli de animales inmaduros. 4. Diferenciaciones de unión de las membranas. 5. Residuos celulares. (x4.000)

**Explicación de la figura nº 144 .**

**Pared de un túbulo perteneciente a un animal tratado durante 22 días, en el que se ha descamado casi todo el epitelio.**

- 1. Lámina propia**
  - 2. Luz del túbulo**
  - 3. Intersticio.**
  - 4. Células de Sertoli, visiblemente alteradas.**
  - 5. Espermatoцитos muy alterados.**
  - 6. Gotas lipídicas.**
- (x 8.000 aprox.)**



Fig. nº 144



Fig. nº 145

1. Espermatogonia B (etapa V).
2. Célula mioide invaginada en el epitelio y con el núcleo lobulado.
3. Lámina basal de la membrana basal interna.
4. Lámina reticular " " "
5. Lámina propia, cuyo conjunto, debido a la intensa contracción de la célula mioide, aparece engrosado.
6. Zónulas ocludens de la unión entre células de Sertoli, (faltan los haces de microfilamentos y las cisternas de retículo endoplásmico asociados).
7. Citoplasma de células de Sertoli.

Pertenece a un animal sometido a 27 días de tratamiento.  
(x15.000 aprox.).



Fig. nº 146

Pared del tubo seminífero de un animal tratado durante 25 días. Los citoplasmas de las células endoteliales de la lámina propia (1) se solapan, quedando los núcleos más cerca (2). Quedan casi sólo células de Sertoli (3), cuyos citoplasmas no contienen casi organelas pero están llenos de restos celulares (4), de composición heterogénea (áreas claras y oscuras). (x10.000 aprox.)



Fig. nº 147

Detalle de la lámina propia del túbulo seminífero de un animal tratado durante 22 días. La contracción intensa de la célula mioide (1), hace que las membranas basales se plieguen, despegándose la lámina basal (2) de la reticular (3), y que los citoplasmas de las células endoteliales (4) se solapen. (x15.000).

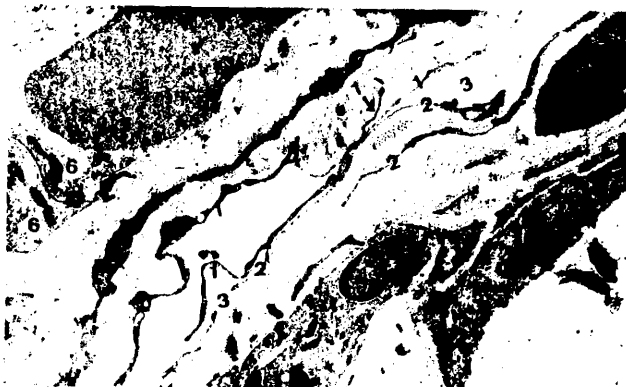


Fig. nº 148

Detalle de la lámina propia en un animal sometido a 25 días de tratamiento. El solapamiento entre los citoplasmas de las células endoteliales es aquí más patente que en la fotografía anterior. 1.Célula endotelial de la lámina propia. 2.Célula endotelial que enmarca los "espacios cerrados" del intersticio.3. Espacio linfático peritubular. 4. Célula de Leydig.5. Célula endotelial de un capilar. 6.C. de Sertoli.(x8.000).



Fig. nº 149

Mitosis de una espermatogonia B en un túbulo en la etapa VI, de un animal sometido a 22 días de tratamiento. 1. Espermatogonia B<sup>m</sup>. 2. Gota lipídica. 3. Célula de Sertoli. (x10.000)



Fig. nº 150

Mitosis de una espermatogonia en un túbulo totalmente degenerado, perteneciente a un animal tratado durante 22 días. 1. Espermatogonia en mitosis. 2. Célula de Sertoli (citoplasmas cargados de restos celulares). 3. Gota lipídica. Las flechas señalan las uniones entre c. de Sertoli. (x15.000).



Fig. nº 151

Espermatogonia B en un túbulo muy alterado. Animal sometido a 32 días de tratamiento. 1. Célula de Sertoli. 2. Espermatogonias B. 3. Puente citoplásmico. 4. Uniones entre células de Sertoli. 5. Lámina propia. (x8.000 aprox.).



Fig. nº 152

Región basal de un túbulo en etapa VII, perteneciente a un animal sometido a 20 días de tratamiento. 1. Espermatocito preleptoténico. 2. Célula de Sertoli. 3. Zónulas occludens de la barrera hemato-testicular. Obsérvese el gran desarrollo de las vesículas del retículo endoplásmico, el fuerte proceso de vacuolización de las mitocondrias, y la gran cantidad de diferenciaciones de unión que aparecen entre los espermatocitos y las células de Sertoli. (x8.000).



Fig. n° 153

Detalle de las uniones que aparecen entre dos espermatocitos preleptotécnicos y las células de Sertoli vecinas. La flecha señala un corte oblicuo de una sucesión de zónulas occludens. 1. Espermatocitos preleptotécnicos. 2. Células de Sertoli. Corresponde a una etapa VII de un animal sometido a 20 días de tratamiento. (x10.000)

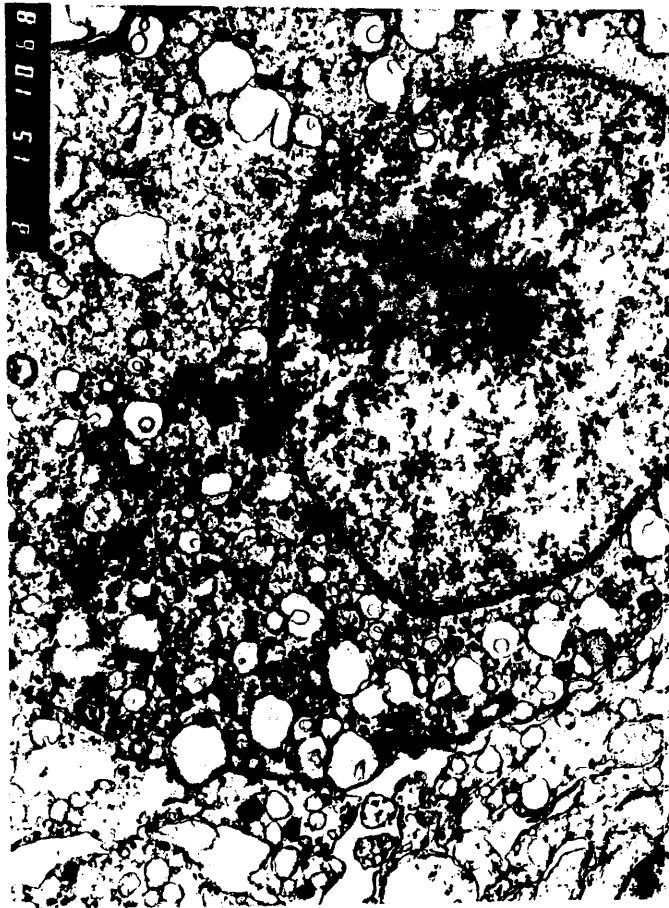


Fig. nº 154

Detalle de una espermátida 5 en un animal tratado 17 días. Obsérvese el gran desarrollo alcanzado por las vesículas de REL y los lisosomas. El proceso de autofagocitosis ha transformado a las mitocondrias en espacios rodeados por una membrana. (Señalados por flechas). (x8.000 aprox.).

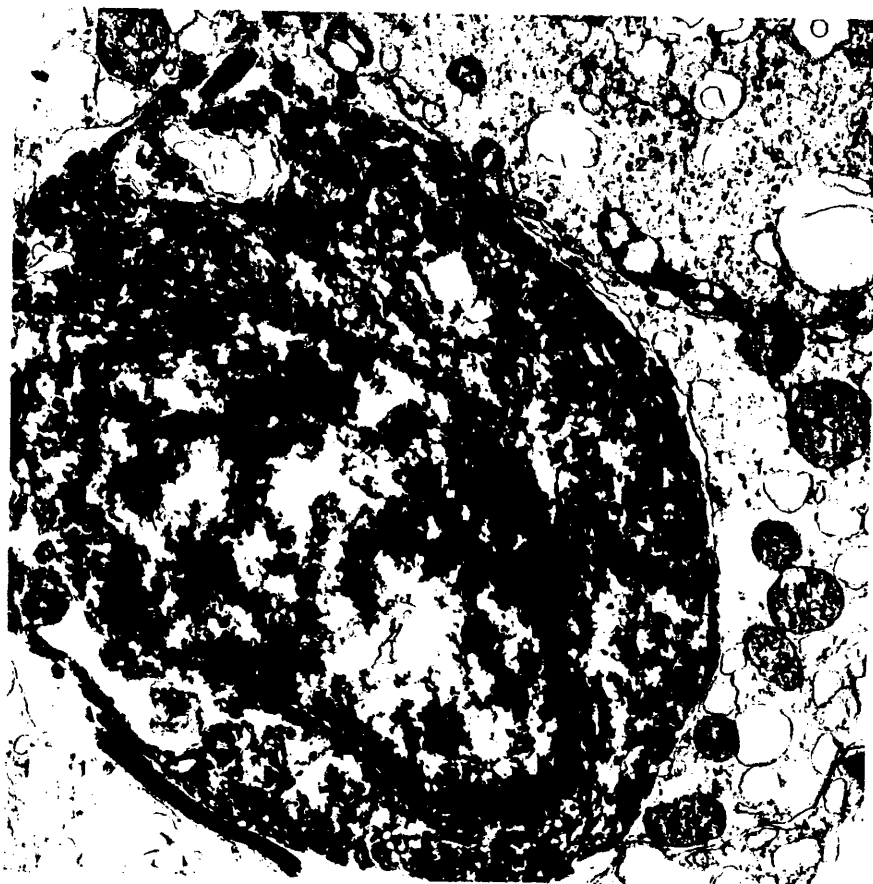


Fig. nº 155

Espermátida 6, perteneciente a un animal tratado durante 17 días. Es un ejemplo de una célula germinal necrótica que se mantiene en la pared rodeada por el citoplasma de la célula de Sertoli (1), que presenta gran cantidad de vesículas. El citoplasma del espermatocito paquiténico adyacente (2), también presenta signos de autofagocitosis.

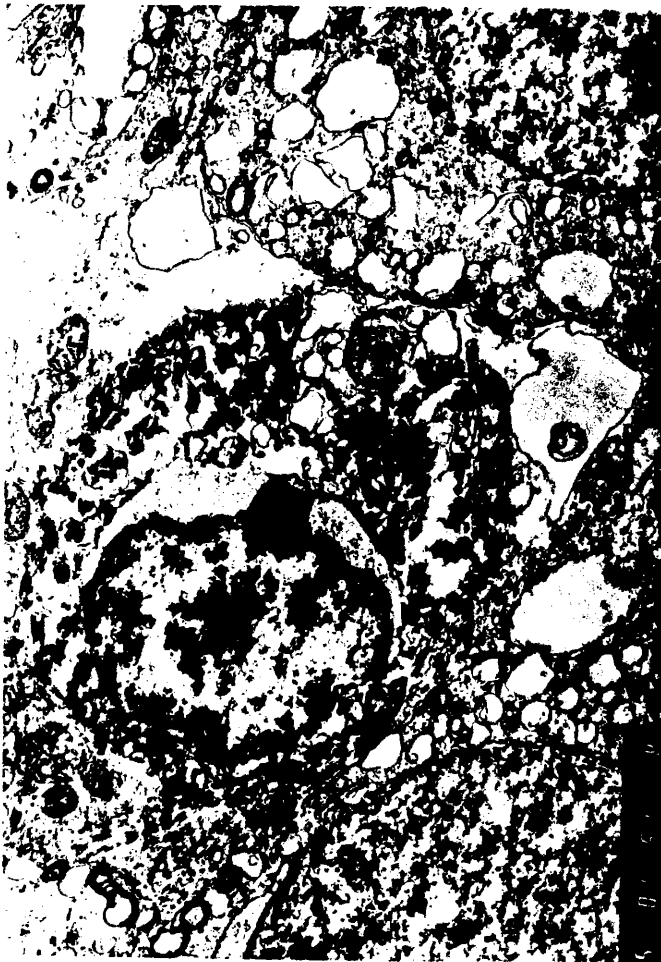


Fig. 156

Necrosis de una espermátida 7, de un animal tratado 20 días. Todavía se reconocen las estructuras que la caracterizan. Aunque el aparato de Golgi aparece con una localización que no es la que le corresponde en esta etapa y está muy alterado, da la impresión de que sigue formando vesículas. En la célula de Sertoli que la envuelve, el aumento de vesículas es muy marcado. (x15.000).

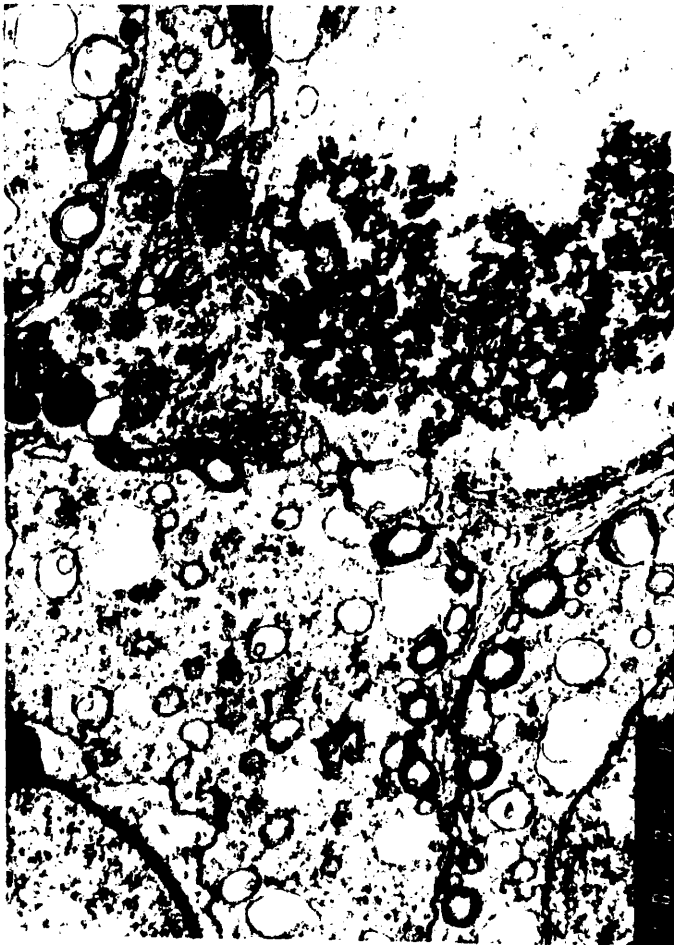


Fig. 157

Lisis de los restos de una espermátida 7.(1). Al final del proceso, quedará un espacio vacío. 2. Citoplasma de la célula de Sertoli en el que aparece un par de centriolos y gran cantidad de microtúbulos, lisosomas y otras vesículas. (20.000).

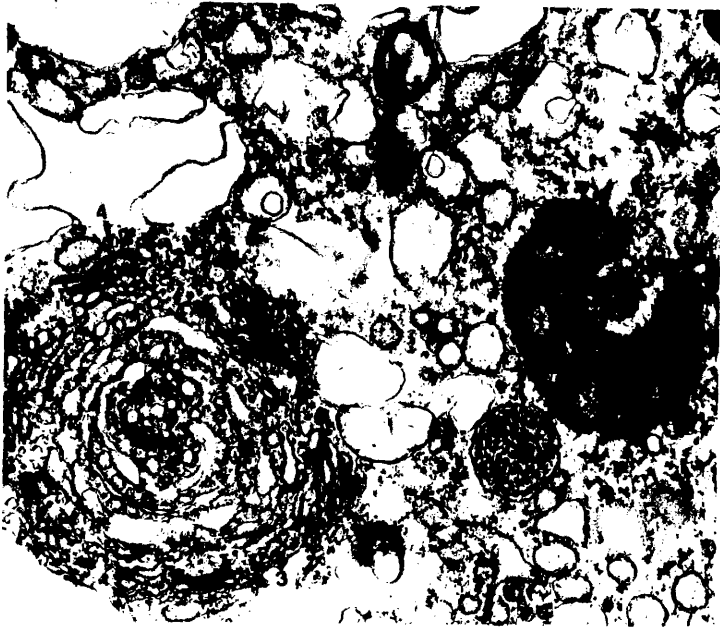


Fig. nº 158

Detalle del aspecto de un corte transversal de una espermatida 17 a la altura del cuerpo cromatoideo (1), que aparece rodeando la cola(2) y del aparato de Golgi (3), en el que parece se están formando lamelas anilladas (4) y, en cuyo seno, se ven vesículas con cubierta (5). El avanzado estado de degeneración se pone de manifiesto por el gran desarrollo del sistema de vesículas y los grandes espacios vacíos dejados por la autofagocitosis.(x20.000)



Fig. nº 159

1. Espermátida 18 degenerada. 2. Célula de Sertoli. En el citoplasma de la célula de Sertoli aparecen espacios citoplasmáticos cerrados por cisternas de REL (\*). (x25.000). Animal tratado 17 días.



Fig. nº 160

Luz de un túbulo de un animal tratado 17 días. Junto con algunos restos celulares, aparece una espermátida tipo 18 alterada (1) y varios cortes transversales de colas de espermátidas 18 con signos de alteración. (señaladas por las flechas). (x8.000).



Fig. nº 161

Luz de un túbulo de un animal tratado 18 días. Aparecen restos celulares, incluyendo colas de espermátidas 18, totalmente alteradas. (x20.000 aprox.).



Fig. nº 162

Luz de un túbulo de un animal tratado durante 14 días. Aparecen varias colas de espermátidas 14 rodeadas de la gota citoplásmica, cortadas a distintos niveles, y cuyo aspecto es normal. (x4.000).



Fig. nº 163

Luz del túbulo de un animal tratado 14 días. Aparecen varias espermátidas 14 cortadas a diferentes niveles de la cola, rodeada de su gota citoplásmica. 1. Cuerpo radial. 2. Aparato de Golgi residual. Aspecto normal. (x 8.000 aprox.).



Fig. nº 164

Detalle de la gota citoplásmica de una espermátida 14. El cuerpo radial presenta un aspecto normal. Corresponde a un animal tratado durante 15 días. (x20.000).



Fig. nº 165

Espermátida 15 de aspecto normal, en túbulo de animal tratado durante 15 días. (x8.000 aprox.).

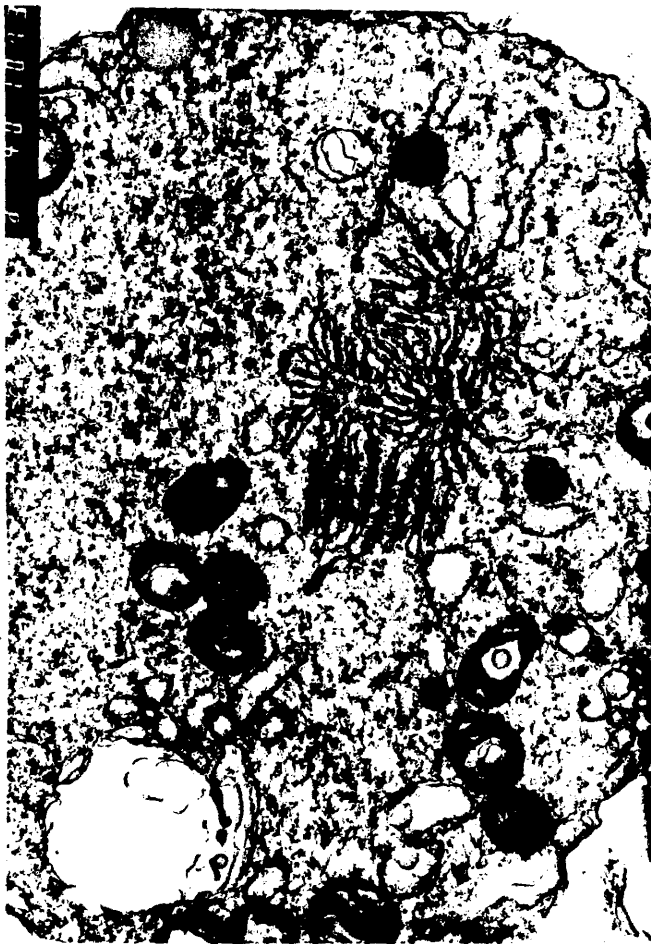


Fig. nº 166

Detalle del cuerpo radial en conexión con lamelas anilladas(\*)Pertenece a un espermátida 17 de un animal tratado 17 días. (x20.000 aprox.).



Fig. nº 167

Formación de los complejos túbulo-bulbares en espermatidas 19 (etapa VII), de un animal tratado durante 20 días. Aspecto normal. (x10.000 aprox.).



Fig. nº 168

Luz de un túbulo en etapa XIV. Aparece un espermatocito de aspecto normal, pero liberado a la luz (no está rodeado por citoplasma sertoliano), rodeado de colas de espermátidas 14 cortadas a distintos niveles y cuyo aspecto es también normal. Animal tratado durante 16 días. (x5.000 aprox.).



Fig. nº 169

Detalle del núcleo de una célula de Sertoli. Aparece una estructura asociada al nucleolo, del mismo aspecto que el satélite nucleolar, que en la rata aparece sólo antes de la pubertad. (x15.000 aprox.). Animal tratado 10 días.



Fig. nº 170

Células de Sertoli de un animal tratado 32 días. Se mantienen algunas de las estructuras que caracterizan la unión entre células de Sertoli (señaladas por las flechas). Faltan los haces de microfilamentos, aunque sí se ven microfilamentos por el citoplasma (1). Aparece la estructura semejante al satélite nucleolar(2)(x15.000 aprox.).

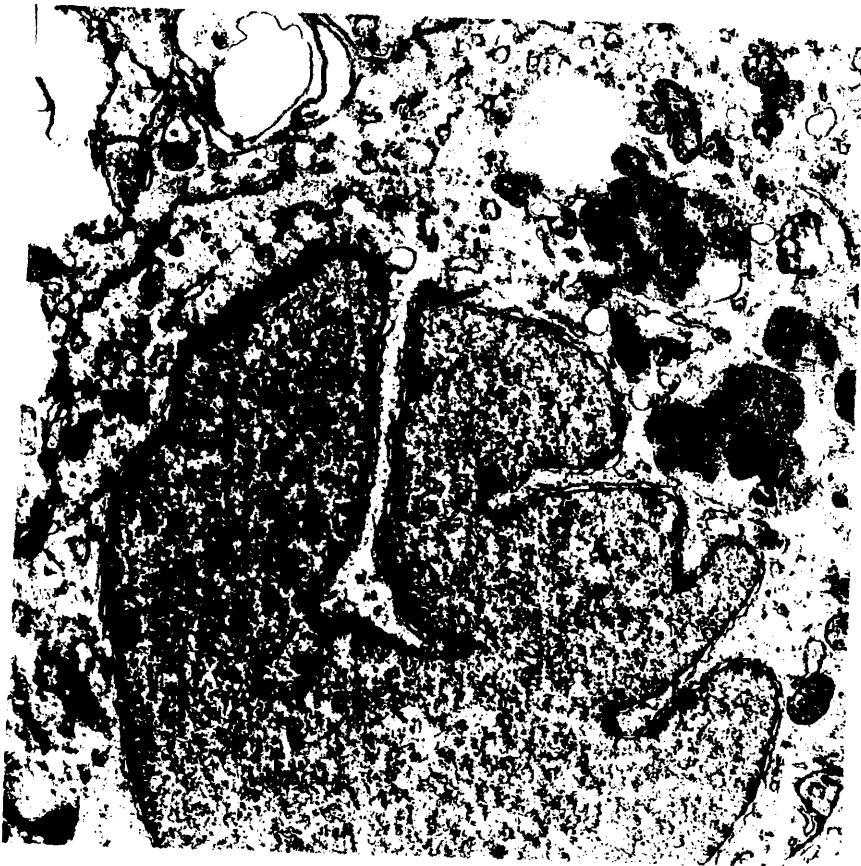


Fig. nº 171

Detalle del aspecto que presenta una célula de Sertoli de un animal tratado 20 días. Obsérvese el abigarramiento del citoplasma, que presenta un aumento de vesículas y de residuos celulares. La flecha señala el aspecto que presenta la unión especializada entre células de Sertoli, visiblemente alterada. (x15.000 aprox.).

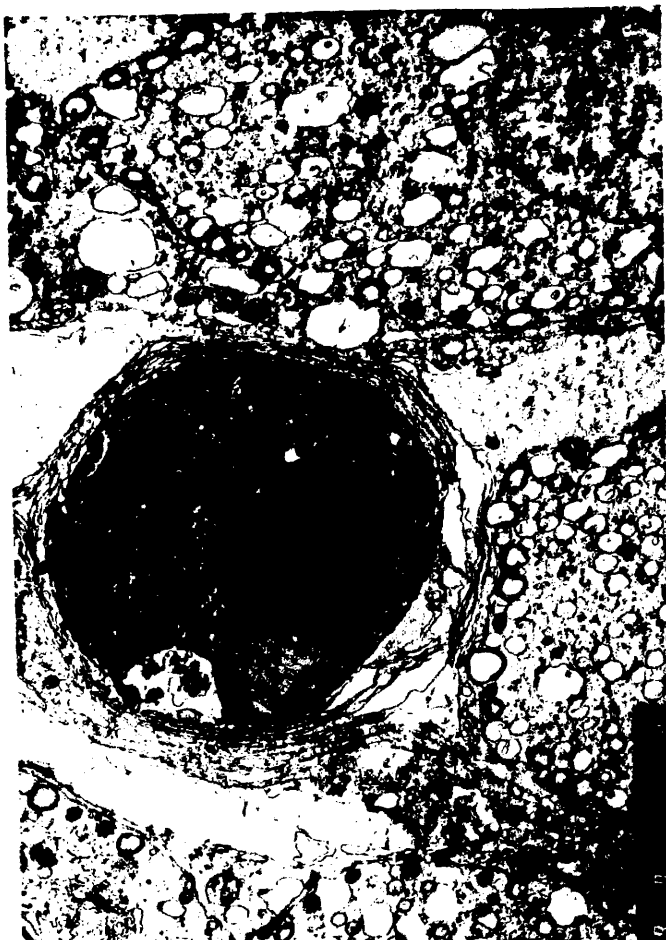


Fig. nº 172

Detalle de una zona del citoplasma de una célula de Sertoli de un animal tratado 21 días. Cisternas del retículo endoplásmico rodean totalmente los residuos celulares. (x15.000).



Fig. nº 173

Detalle de la zona basal del epitelio seminífero. Corresponde a un túbulo muy degenerado de un animal sometido a 32 días de tratamiento. Obsérvese cómo las células de Sertoli, en algunas regiones, no se apoyan sobre la lámina propia (señalado por las flechas). 1. Lámina propia. 2. Célula de Sertoli. (x8.000 aprox.).

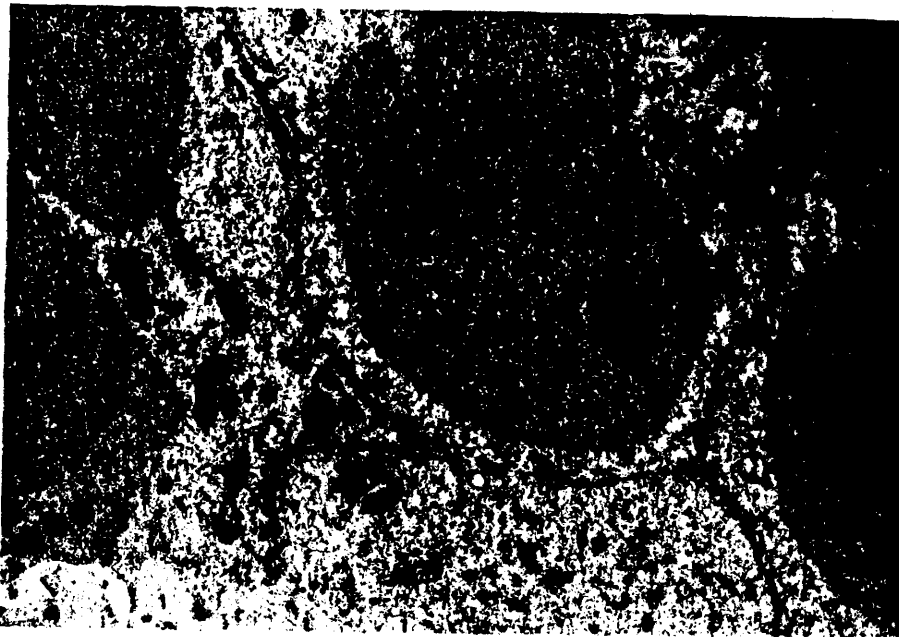


Fig. nº 174

Células de Sertoli en un túbulo muy degenerado de un animal tratado 33 días. 1. Lámina propia. 2. Células de Sertoli. 3. Espermatogonia. Obsérvese la localización de las células de Sertoli. Las flechas señalan cómo han quedado las uniones entre estas células después del tratamiento. (x15.000).

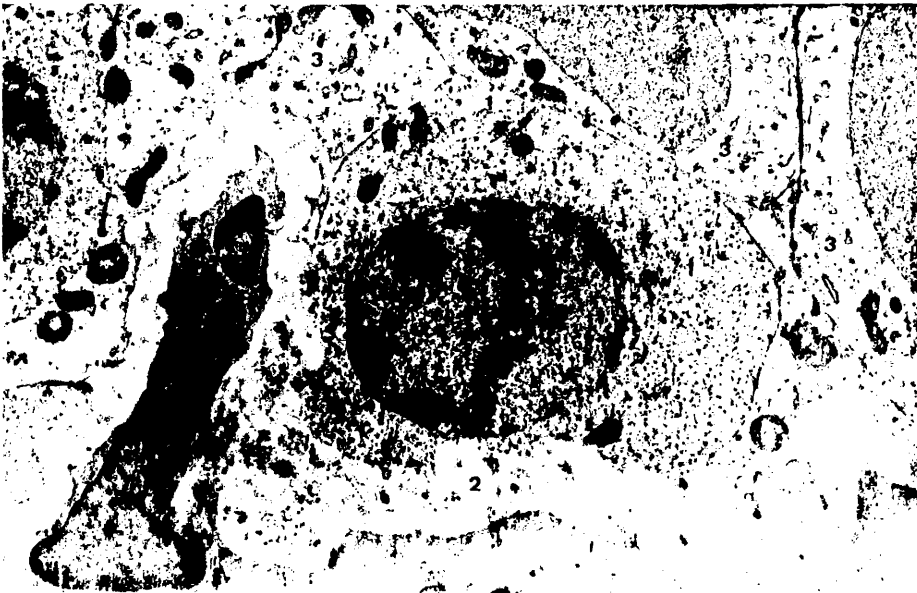


Fig. nº 175

Célula germinal muy alterada (1), interpuesta entre la lámina propia (2) y la célula de Sertoli (3). La célula mioide (4) está fuertemente contraída e invaginada en el epitelio seminífero, para adaptar la superficie de la lámina propia al contenido tubular, que está muy disminuído. (x8.000, aprox.).

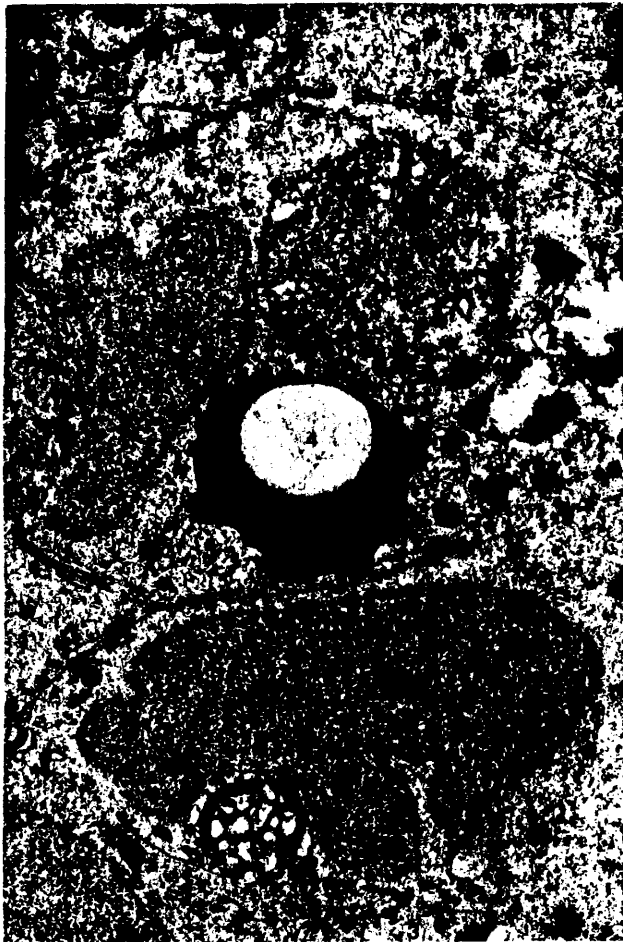


Fig. nº 176

Células de Sertoli muy alteradas. Sus citoplasmas casi no contienen organelas y están cargados de residuos. Adoptar formas poligonales y dejan de apoyarse sobre la lámina propia. Los contactos entre ellas están también muy alterados. 1. Célula de Sertoli. 2. Célula germinal. 3. Lámina propia. 4. Residuos. Corresponde a un animal tratado 31 días. (x8.000 aprox.).

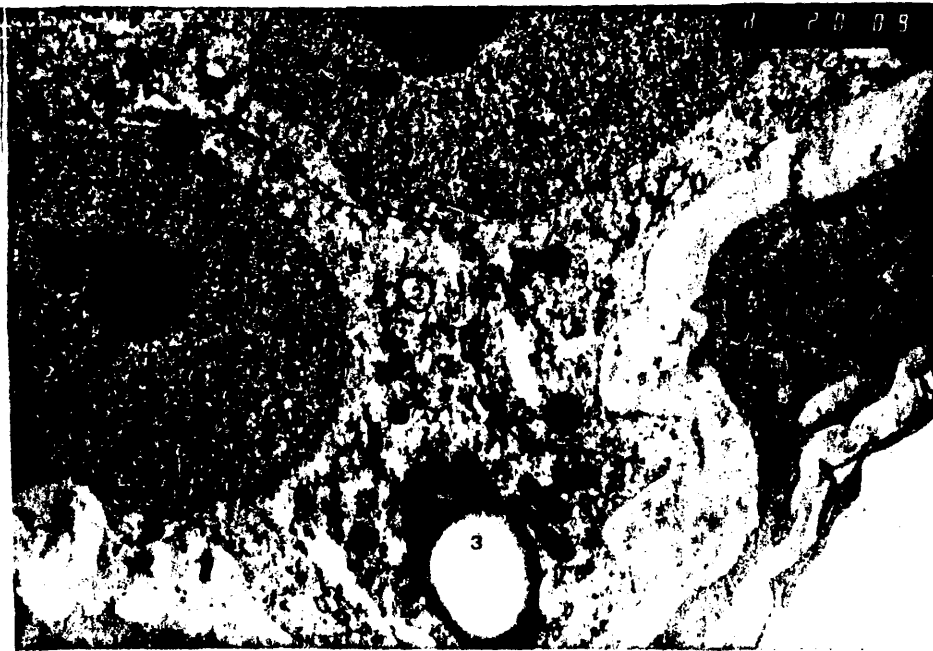


Fig. nº 177

Contacto entre células de sertoli de un animal tratado 32 días Han desaparecido los haces de microfilamentos y los perfiles de R.E. están muy reducidos. 1.Célula de Sertoli. 2. Complejo túbulo-bulbar. 3. Residuo. 4. Satélite nucleolar. 5. Cito plasmas de las c.endoteliales solapados. (x.10.000, aprox.).



Fig. nº 178

Detalle del contacto entre o. de Sertoli.(1). y complejo túbulo-bulbar.(2) (x100.000).

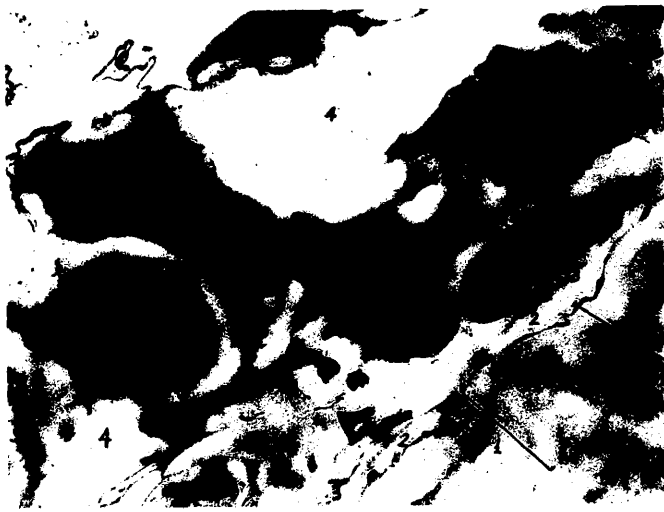


Fig. nº 179

Aspecto que presenta el intersticio de un animal tratado durante 21 días.

1. Lámina propia.
  2. Espacio linfático peritubular.
  3. Células endoteliales que rodean los componentes del intersticio.
  4. Fibras de colágena.
  5. Células de Leydig, con aspecto de células mesenquimales indiferenciadas, después del tratamiento.
- (x8.000 aprox.).



Fig. nº 180

Aspecto que presenta el intersticio a los 33 días de tratamiento. 1. Célula endotelial de un capilar. 2. Fibras conjuntivas. 3. Células de Leydig, que se han desdiferenciado y presentan el aspecto de células mesenquimales indiferenciadas. (x8.000, aprox.).

