

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE DVETERINARIA

**Departamento de Patología Animal II
(Patología y Clínica Médico-Quirúrgica)**



**EVOLUCIÓN TESTICULAR FELINA: ESTUDIO
HISTORIOLOGICO, INMUNOHISTOQUÍMICO Y
ULTRAESTRUCTURAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Belén Sánchez Maldonado

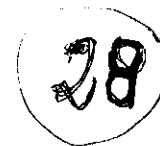
Bajo la dirección de los doctores

Juana María Flores Landeira

Manuel Pizarro Díaz

Madrid, 1994

ISBN: 978-84-669-1337-9



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DPTO. PATOLOGIA ANIMAL II
HISTOLOGIA Y ANATOMIA PATOLOGICA

***EVOLUCION TESTICULAR FELINA:
ESTUDIO HISTOLOGICO, INMUNOHISTOQUIMICO
Y ULTRAESTRUCTURAL***

BELEN SANCHEZ MALDONADO

TRABAJO PRESENTADO PARA OPTAR AL GRADO
DE DOCTOR EN VETERINARIA

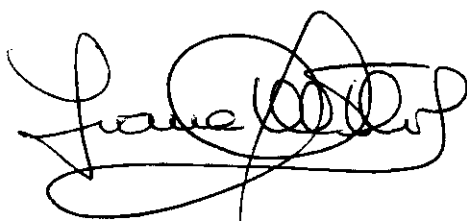
Madrid, Mayo de 1994

D^a JUANA MARIA FLORES LANDEIRA, Catedrática, y **D. MANUEL PIZARRO DIAZ**, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid

CERTIFICAN:

que la Tesis Doctoral titulada **EVOLUCION TESTICULAR FELINA: ESTUDIO HISTOLOGICO, INMUNOHISTOQUIMICO Y ULTRAESTRUCTURAL**, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria D^a **BELEN SANCHEZ MALDONADO**, se ha realizado en la Unidad Docente de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, bajo nuestra dirección.

Madrid a 20 de Mayo de 1994

A highly stylized, cursive handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juana María Flores'.

Juana María Flores

A cursive handwritten signature in black ink, appearing to read 'Manuel Pizarro'.

Manuel Pizarro

A Diego

A mis padres

INDICE

INDICE

1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	6
2.1. Consideraciones generales	7
2.2. Fases evolutivas en el desarrollo testicular	9
2.2.1. Desarrollo embriológico	10
2.2.2. Fases perinatal e infantil	15
2.2.3. Fases puberal y adulta	30
2.2.4. Túbulos rectos y red testicular	50
3. Material y métodos	54
3.1. Animales estudiados	55
3.2. Toma de muestras	55
3.3. Procesado de muestras	55
3.3.1. Fijación	55
3.3.2. Inclusión	56
3.3.3. Obtención de cortes	56
3.3.4. Tinciones	57
3.3.4.1. Microscopía óptica	57
3.3.4.2. Microscopía electrónica	60
3.4. Observación de las preparaciones	61
3.5. Estudio morfométrico	61
3.6. Iconografía	61
4. Resultados	64
4.1. Fase perinatal	66
4.1.1. Características histológicas	66
4.1.1.1. Sistema tubular	66
4.1.1.2. Intersticio	68
4.1.1.3. Cápsula testicular	69

4.1.2. Estudio inmunohistoquímico	70
4.1.2.1. Sistema tubular	70
4.1.2.2. Intersticio	70
4.1.2.3. Cápsula testicular	71
4.1.3. Características ultraestructurales	72
4.1.3.1. Sistema tubular	72
4.1.3.2. Intersticio	74
4.1.3.3. Cápsula testicular	74
4.2. Fase infantil	76
4.2.1. Características histológicas	76
4.2.1.1. Sistema tubular	76
4.2.1.2. Intersticio	77
4.2.1.3. Cápsula testicular	78
4.2.2. Estudio inmunohistoquímico.....	79
4.2.2.1. Sistema tubular	79
4.2.2.2. Intersticio	79
4.2.2.3. Cápsula testicular	80
4.2.3. Características ultraestructurales	81
4.2.3.1. Sistema tubular	81
4.2.3.2. Intersticio	82
4.2.3.3. Cápsula testicular	82
4.3. Fase Puberal	83
4.3.1. Características histológicas	83
4.3.1.1. Sistema tubular	83
4.3.1.2. Intersticio	85
4.3.1.3. Cápsula testicular	85
4.3.2. Estudio inmunohistoquímico	87
4.3.2.1. Sistema tubular	87
4.3.2.2. Intersticio	87
4.3.2.3. Cápsula testicular	88
4.3.3. Características ultraestructurales	89
4.3.3.1. Sistema tubular	89

4.3.3.2. Intersticio	91
4.3.3.3. Cápsula testicular	91
4.4. Fase adulta	92
4.4.1. Características histológicas	92
4.4.1.1. Sistema tubular	92
4.4.1.2. Intersticio	94
4.4.1.3. Cápsula testicular	95
4.4.2. Estudio inmunohistoquímico	96
4.4.2.1. Sistema tubular	96
4.4.2.2. Intersticio	96
4.4.2.3. Cápsula testicular	96
4.4.3. Características ultraestructurales	97
4.4.3.1. Sistema tubular	97
4.4.3.2. Intersticio	98
4.4.3.3. Cápsula testicular	98
4.5. Tablas	99
5. Iconografía	105
6. Discusión	141
7. Conclusiones	166
8. Resumen	169
Summary	171
9. Bibliografía	172
Agradecimientos	191

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

En los últimos años hemos asistido a espectaculares avances en prácticamente todos los campos de la ciencia. Quizás una de las áreas donde se han producido cambios más notables, ha sido en la de la reproducción y estos hechos han sido posibles gracias a un conocimiento más profundo de la anatomía, embriología, endocrinología e histofisiología de las estructuras involucradas.

En el caso del aparato genital del macho, estos avances han sido favorecidos principalmente por el uso extensivo de la inseminación artificial, que en un principio se empleó en razas selectas de abasto, pero que posteriormente se ha empezado a utilizar también en animales de compañía. Por otra parte, la necesidad de evaluar de forma efectiva la fertilidad de los reproductores empleados, ha mostrado el imperativo de profundizar en el conocimiento de las características morfofisiológicas del testículo en condiciones fisiológicas, para posteriormente abordar el estudio de la patología, que en muchos casos puede ser causa de sub o infertilidad.

Las gónadas de los mamíferos y concretamente el testículo, son uno de los órganos que experimentan cambios más drásticos en su estructura a lo largo de la vida: tras el nacimiento, el volumen testicular sufre una disminución muy evidente debido principalmente a la regresión de las células de Leydig fetales; después se mantiene en una fase de reposo hasta la pubertad, a partir de la cual se produce un gran desarrollo que coincide con el inicio de la espermatogénesis y la producción de testosterona.

Amann (1981) considera la pubertad en el macho como el momento clave en el que éste produce suficiente número de espermatozoides como para fecundar a la hembra. En la mayoría de los animales el periodo puberal está asociado con un rápido desarrollo testicular, un aumento gradual en la producción de testosterona y el inicio de la espermatogénesis; pero pubertad no es sinónimo de madurez sexual, ésta puede aparecer unos meses o años más tarde.

El interés por el estudio del testículo ya estaba presente entre algunos investigadores de la Antigüedad. Gran parte del conocimiento de la función testicular se ha producido como resultado de la práctica de la castración. Aristóteles ya reconocía las diferentes consecuencias de una castración anterior o posterior a la pubertad. Sin embargo la contribución del testículo en la fertilidad no fue reconocida hasta 1667 cuando Leeuwenhoek observó por primera vez los espermatozoides (citado por Amann y Schanbacher, 1983). En 1850 Franz Leydig describió las células intersticiales del testículo de los mamíferos y en 1865 Sertoli definió las células de sostén.

En los últimos años y gracias al empleo en histología de técnicas morfométricas, histoquímicas, inmunocitoquímicas y ultraestructurales, se ha podido profundizar en las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas del testículo, comprobándose la gran complejidad de éste órgano con la presencia de diversos compartimientos y numerosos tipos celulares.

Entre los animales domésticos, el gato representa una de las especies de elección como animal de compañía. Aunque la domesticación de este animal procede del antiguo Egipto, es en la segunda mitad del siglo XX cuando ha empezado a competir con el perro como animal de compañía. Este hecho ha sido motivado por su adaptabilidad social a pesar de su autosuficiencia, su belleza, su personalidad y la facilidad de mantenimiento si se compara con el perro.

La hembra experimenta varios ciclos de receptividad sexual en una parte del año, normalmente desde finales del invierno al comienzo de primavera y a finales del verano. Los machos pasan por un periodo de celo primaveral que disminuye hasta convertirse en una fase de baja actividad sexual en otoño. Pero su vida sexual puede estimularse o inactivarse por la disponibilidad y estado sexual de las gatas de la vecindad (Wright, 1982), aunque histológicamente se ha comprobado que son fértiles durante todo el año (Burke, 1986). Los testículos desciende tras el nacimiento, experimentando un marcado aumento del tamaño y del peso desde los tres a cinco meses de edad, aunque con técnicas histológicas se ha observado que la espermatogénesis completa no aparece hasta el periodo comprendido entre los siete a

nueve meses (Kirkpatrick, 1985).

Desde 1982 en el Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid, se viene desarrollando una línea de investigación referente al estudio de la histología y patología del aparato genital en perros, équidos y cápridos. Como continuación de la misma, y después de realizar una exhaustiva búsqueda bibliográfica, hemos podido comprobar la escasez de información científica referente al testículo del gato. Estos trabajos se han centrado básicamente en el estudio de la calidad del semen (Wildt y col., 1983) y los niveles de andrógenos y su relación con otros parámetros como la estación del año, peso testicular, etc... (Kirkpatrick, 1985). Desde el punto de vista morfológico destacamos los estudios de Pier (1985) sobre el ciclo del epitelio seminífero, los de Wrobel y Hees (1987) sobre la localización de células de Leydig ectópicas, y los de Viotto y col. (1993) sobre las características ultraestructurales de la red testicular. También hemos comprobado que, hasta la fecha, son escasos los trabajos que emplean técnicas inmunohistoquímicas para determinar la naturaleza de los filamentos presentes en los diversos tipos celulares y compartimientos extracelulares del testículo.

Basándonos en lo anteriormente expuesto, y con el objeto de profundizar y ampliar las investigaciones de nuestro Departamento a otras especies, nos hemos planteado realizar un estudio evolutivo del testículo del gato, desde la etapa perinatal hasta la etapa adulta, con el fin de alcanzar los siguientes **OBJETIVOS**:

- Analizar, tanto estructural como ultraestructuralmente, las modificaciones morfológicas que se producen en el testículo con la edad.
- Realizar un estudio morfológico y comparativo de los diversos componentes celulares del testículo durante las diferentes etapas evolutivas.
- Detectar con técnicas inmunohistoquímicas las células productoras de testosterona y su variación con la edad.

Introducción

- Estudiar la naturaleza y distribución de diversos filamentos intermedios en el testículo a lo largo de las diferentes fases de desarrollo, con técnicas inmunohistoquímicas.
- Realizar un estudio inmunohistoquímico y ultraestructural de las membranas basales en las diferentes estructuras testiculares.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. CONSIDERACIONES GENERALES

El aparato genital del macho comprende las gónadas (los testículos), un sistema de conductos (conductos eferentes, epidídimo, conducto deferente y uretra), glándulas accesorias (glándulas bulbouretrales, vesículas seminales y próstata) y el pene (Fawcett, 1987).

Los testículos son órganos de naturaleza glandular con dos funciones básicas: la secreción de testosterona y otras hormonas a través del proceso de esteroidogénesis, y la producción de gametos masculinos a través de la espermatogénesis (Amann y Schanbacher, 1983).

Los testículos poseen forma ovoide con el eje mayor horizontal en los équidos, vertical en los rumiantes y oblicuo en el verraco (Getty, 1975; Delhom y von Lawzewitsch, 1985). En los carnívoros son de contorno ovoidal aunque comprimidos lateralmente, y de posición oblicua, con el extremo craneal orientado craneoventralmente y el lado libre caudoventral (Nickel y col., 1979).

Los testículos se localizan en la región inguinal, en un revestimiento de la piel denominado "escroto", que en el gato es perineal, móvil y está recubierto por pelo (Dyce, 1987). Cada testículo está suspendido en el escroto por un largo pedículo vascular, denominado "cordón espermático", y que está formado por el conducto deferente, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y el músculo cremaster (Delhom y von Lawzewitsch, 1985).

El testículo está rodeado por una gruesa cápsula de tejido conjuntivo denso, la túnica albugínea. En la mayoría de las especies se puede distinguir una capa o "túnica vascular" donde existen numerosas ramas de la arteria y de la vena testicular, que es superficial en perro y morueco, y profunda en verraco y en caballo (Delmann, 1993; Banks, 1993).

La túnica albugínea se continúa con trabéculas de tejido conjuntivo, "septula testis", que profundizan en el parénquima y lo dividen en lobulillos testiculares. Estas trabéculas son gruesas y completas en perro y verraco, y delgadas e incompletas en rumiantes y gatos. Las trabéculas convergen para formar el mediastino, localizado centralmente en la mayoría de las especies a excepción de los équidos, en los que se localiza en el polo anterior del testículo (Delhom y von Lawzewitsch, 1985).

El parénquima testicular consta de túbulos seminíferos e intersticio. Los túbulos seminíferos constituyen básicamente la porción exocrina del testículo, y su producto de secreción final son los espermatozoides. La pared de los túbulos está tapizada por células germinales y células de Sertoli. Entre los túbulos se dispone el intersticio, integrado principalmente por un tejido conjuntivo laxo rico en vasos y por las células de Leydig o intersticiales, que constituyen el componente endocrino del testículo encargado de producir la testosterona.

Los túbulos seminíferos son tortuosos y experimentan abundantes circunvoluciones en su recorrido dentro de los lobulillos; luego se transforman en túbulos rectos que constituyen el primer segmento de conductos excretores intratesticulares, carentes por tanto de células de la línea germinal. Estos, posteriormente se reúnen a nivel del mediastino y forman la "rete testis" o red testicular, un sistema de espacios plexiformes tapizados por un epitelio simple, que se encuentra muy desarrollado en el carnero y en el caballo. La red testicular se dirige por el mediastino a uno de los polos del testículo, atraviesa la albugínea y se proyecta fuera del mismo para dar origen a los conductillos eferentes, localizados en la cabeza del epidídimo y que constituyen la primera parte de conductos excretores extratesticulares (McEntee, 1990).

2.2. FASES EVOLUTIVAS DEL TESTICULO

Los estudios realizados en testículos de diferentes especies indican que, desde el periodo fetal hasta alcanzar la madurez, estos experimentan una serie de modificaciones que culminan con el establecimiento de la espermatogénesis. La duración de este proceso varía dependiendo de la especie animal, y algunos autores han establecido distintas fases en este desarrollo.

Flores y col. (1989) en el desarrollo postnatal del testículo equino distinguen, una fase prepuberal inicial, que dura aproximadamente hasta el año y se caracteriza por el predominio del intersticio sobre los túbulos sin luz, una fase prepuberal tardía hasta los 16 meses, con la mayoría de túbulos con luz y estratificación de las células germinales, una fase puberal hasta los 18 meses caracterizada por el establecimiento de la espermatogénesis y una fase adulta a partir de los 2 años.

En el hombre, además del testículo fetal, se distinguen un testículo infantil (hasta los 9 años aproximadamente), un testículo puberal caracterizado por la aparición de la estratificación del epitelio seminífero y un testículo adulto a partir de los 12 ó 13 años (Nistal y Paniagua, 1983).

Por todo lo anteriormente expuesto, y dado que gran parte de los trabajos consultados están realizados sobre un periodo determinado del desarrollo testicular, hemos considerado oportuno dividir esta parte de la revisión bibliográfica en cuatro apartados. En primer lugar hablaremos del **desarrollo embriológico**, que aunque es una fase no incluida en nuestro trabajo, consideramos que tiene gran importancia para la interpretación de alguno de los resultados obtenidos. Posteriormente realizaremos la revisión de la **fases perinatal e infantil** y a continuación de las **fases puberal y adulta**. En cada uno de estos tres apartados hablaremos principalmente de los túbulos seminíferos, intersticio y cápsula testicular.

En un apartado diferente realizaremos la revisión bibliográfica de los **túbulos rectos y red testicular**, ya que en estas estructuras las modificaciones que se producen durante el desarrollo testicular no son tan significativas.

2.2.1. DESARROLLO EMBRIOLOGICO

El origen de las distintas poblaciones celulares del testículo ha sido uno de los principales problemas que se plantearon los investigadores de principio de siglo.

Existían dos teorías en cuanto al origen de las células de los túbulos: algunos autores que estudiaron las aves y otros vertebrados poco evolucionados zoológicamente, opinaban que las gonias y las células de Sertoli procedían de los gonocitos y de las células de soporte respectivamente, las cuales estaban presentes en los cordones sexuales del testículo fetal (Swift, 1916); los investigadores que estudiaron testículos de roedores pensaban que los gonocitos degeneraban a los pocos días del nacimiento, mientras que las células de soporte proliferaban y se diferenciaban hacia gonias definitivas y hacia células de Sertoli (Allen, 1918; Bookhout, 1937).

La procedencia de las células de Leydig presentó menos controversia. Varios autores coincidieron en señalar que tanto las fetales como las que aparecían en la pubertad, derivaban de los fibroblastos (Gillman, 1948; Charny y col., 1952).

El sexo del embrión se determina ya en la fecundación, aunque las características específicas de cada sexo aparecen posteriormente. (Langman, 1981). A esta etapa en la que aparecen los esbozos embrionarios de los órganos se la conoce con el nombre de "estadio indiferenciado de la organogénesis", y su duración es variable según la especie animal; así por ejemplo en el caballo se produce entre los días 40-42 de vida fetal, en el perro tiene lugar en la cuarta semana y en la vaca en la sexta semana (Noden y Lahunta, 1990).

La gónada indiferenciada procede de un engrosamiento del epitelio celómico de la zona medioventral del mesonefros, denominado "cresta gonadal". A esta área, llegan células germinales primordiales originadas en la pared dorsal del saco vitelino que emigran por movimientos ameboides a través de la hoja esplácnica del intestino medio hasta llegar a las crestas gonadales (Delhom y von Lawzewitsch, 1985).

El desarrollo gonadal del macho está ligado a la regresión de los túbulos

mesonéfricos. Cordones de células epiteliales procedentes de estos túbulos, invaden la cresta gonadal agrupándose en torno a las células germinales para formar en el mesénquima indiferenciado los cordones sexuales primitivos (Noden y Lahunta, 1990).

La gónada del macho se diferencia antes que la gónada de la hembra (Jost y col. 1974). En el cerdo comienza a ser ultraestructuralmente reconocible como testículo, a los 26 días de desarrollo embriológico (Pelliniemi, 1975a).

La diferenciación de los cordones testiculares se produce a partir del decimotercer día de gestación en la rata (Jost y col. 1974), vigésimo sexto en el cerdo (Pelliniemi, 1975a) y el día cuarenta y cinco en el hombre (Pelliniemi y col. 1980). Su formación está ligada a la presencia del antígeno H-Y (presente en el brazo corto del cromosoma Y) y su unión a los receptores de las células somáticas de las crestas gonadales (Waites y col. 1985).

El desarrollo de los cordones tiene lugar en la región medular de las crestas gonadales. Se disponen formando asas y quedan separados del epitelio celómico por una capa de tejido mesenquimatoso bien definida que es la primitiva túnica albugínea, primer dato histológico que permite la identificación del testículo (Noden y Lahunta, 1990). Estos cordones están integrados por células germinales primordiales asociadas a las células precursoras de Sertoli, que derivan de células epiteliales mesonéfricas (Langman, 1982).

Por mitosis de las células germinales primordiales se originan los gonocitos. En el embrión humano el primer gonocito se observa en la sexta semana y presenta un núcleo redondo con un nucleolo evidente y microvellosidades citoplasmáticas. Estos perduran hasta el nacimiento. El segundo tipo aparece en la décima semana de desarrollo y contiene abundante glucógeno. Desaparece poco después de la décima semana, su vida es efímera. Hacia la semana 12, junto a los gonocitos aparecen las espermatogonias fetales, caracterizadas por tener escasa cantidad de glucógeno. (Paniagua, 1993)

Entre los túbulos se localizan las células intersticiales que proceden de células del mesénquima relacionadas con la cresta gonadal (Noden y Lahunta, 1990). En el cerdo las células de Leydig se pueden distinguir a partir del día 30 de gestación, aunque el testículo produce testosterona algo antes (Stewart y Raeside, 1976).

Los embriones de ambos sexos poseen conductos y túbulos gonadales: los conductos mesonéfricos o de Wolf y los conductos paramesonéfricos o de Müller que discurren paralelos entre sí. En el hombre son visibles en la sexta semana de vida intrauterina. El que uno de éstos conductos alcance un desarrollo completo depende del sexo del embrión. Si es macho, los conductos de Wolff formarán el conducto genital principal, y si es hembra se desarrollarán los conductos de Müller (Langman, 1982).

Las células de Sertoli fetales intervienen activamente en la organización de la gónada del macho bajo la influencia del antígeno H-Y, y a través de la secreción de la hormona antimülleriana, principal responsable de la involución del conducto de Müller, y primera sustancia secretada por el testículo. En bóvidos es detectable entre los días cuarenta y dos y cuarenta y tres de vida fetal, y alcanza una concentración máxima entre los cincuenta y ochenta días (Vigier y col. 1984). En el perro se ha demostrado inmunohistoquímicamente la presencia de esta sustancia desde el día 36 al 46 de gestación y coincide con la regresión completa del conducto de Müller (Meyers-Wallen, 1991).

A medida que avanza la gestación, en el testículo fetal se siguen produciendo modificaciones encaminadas al establecimiento del testículo diferenciado.

En el cerdo, a los 35 días de la fecundación, los cordones sexuales forman una red anastomosada, rodeada por numerosas células de Leydig de gran tamaño. Desde el día 35 al 52 de gestación se produce un aumento en el diámetro de los cordones testiculares, que viene dado por un aumento en el número de células de Sertoli y gonocitos. Las anastomosis de los cordones se van perdiendo y persisten solo en la periferia de la gónada, transformándose los cordones, en túbulos sólidos y rectos. Las células de Sertoli, que descansan sobre la membrana basal, van adquiriendo una forma elongada (van Vorstenbosch y col., 1984).

En la rata, durante el periodo fetal tardío y bajo la influencia de la FSH, se produce entre las células de Sertoli un elevado número de mitosis que origina un crecimiento de los cordones testiculares (Pelliniemi y col. 1980). La proliferación es máxima en los días 20 y 21 de gestación y disminuye progresivamente hasta después

del nacimiento (Orth, 1982).

En el perro, en el día 32 de gestación, la gónada está indiferenciada. Del día 36 al 46, los cordones sexuales se diferencian localizándose en un principio en la zona medular de la gónada. Estos cordones son sólidos y están formados por células de Sertoli de forma columnar y orientadas perpendicularmente a la membrana basal, y un pequeño número de grandes células germinales esféricas, de citoplasma pálido y núcleo grande y redondo (Meyers-Wallen, 1991).

La diferenciación de las células de Leydig fetales se atribuye a la síntesis de gonadotropina coriónica por los cálices endometriales de la placenta. La testosterona es la principal hormona sintetizada por las células de Leydig y potencia el desarrollo de las estructuras que derivan de los túbulos y conductos mesonéfricos o de Wolff como son los conductos eferentes, conducto deferente, epidídimo, ampolla y glándulas vesiculares (Amann y Schanbacher, 1983; McEntee, 1990).

En el testículo fetal humano la testosterona ha sido detectada entre la octava y novena semana aumentando considerablemente su concentración desde la decimotercera a la decimosexta semana. Durante estas semanas el volumen de las células de Leydig supone el 50% del volumen testicular. A partir de la semana 24 el número de células de Leydig disminuye progresivamente (Hooker, 1970).

En el cerdo, la esteroidogénesis comienza entre los días 30 y 35 de gestación. En el intersticio localizado entre los cordones sexuales anastomosados, se distinguen pequeños grupos de células de Leydig. Estas son grandes y poligonales, el núcleo es oval con uno o más nucleolos y el REL está muy desarrollado (van Vorstenbosch y col. 1982). El número de células de Leydig empieza a disminuir hacia el día 60 de gestación, vuelve a aumentar su número hacia el día 80 y alcanza un máximo 20 días después del nacimiento. A partir del día 75 de gestación se distinguen dos tipos de células de Leydig: las peritubulares, de forma alargada, y las intertubulares, de forma ovoidal y núcleo excéntrico. Estas en un principio aparecen solitarias, pero a partir del día 80 tienden a agruparse, aumentan de tamaño, y van adquiriendo una forma más poligonal (van Vorstenbosch y col. 1984).

En équidos, existe un gran número de células intersticiales del tercero al sexto

mes de gestación. Dicho número va disminuyendo progresivamente desde el sexto mes hasta el nacimiento (González-Angulo y col. 1971).

En 1968 Wensing realiza un estudio sobre el mecanismo de migración testicular, observando el papel tan importante que juega el crecimiento y posterior regresión del gubernaculum en dicho proceso.

El gubernaculum es una estructura mesenquimatososa que se extiende desde el polo caudal del testículo hasta una protuberancia existente entre los músculos oblicuo externo y oblicuo interno, lugar donde se localizará el futuro canal inguinal. Su estructura consiste en un tejido conjuntivo con fibroblastos, fibras de colágeno, y sustancia intercelular rica en mucopolisacáridos y agua (McEntee, 1990).

Durante el proceso de descenso testicular, la parte extraabdominal del gubernaculum aumenta de tamaño en la zona que se abre al canal inguinal. Éste aumento produce una tracción sobre la porción intraabdominal del gubernaculum y tira de ésta junto con el testículo y el epidídimo.

El tránsito del testículo a través del canal inguinal tiene lugar en el perro a los 8-10 días del nacimiento (Wensing, 1973), en el ternero a los 100-105 días de gestación, en el cerdo a los 100-110 días y en el caballo durante el último mes de gestación (Gier y Marion, 1969).

Posteriormente tiene lugar una fase de regresión del gubernaculum, al final de la cual el testículo se localiza ya en el escroto (Baumans y col., 1981).

Los gatos, al nacimiento, presentan los testículos totalmente descendidos (Burke, 1986).

2.2.2. FASE PERINATAL E INFANTIL.

En 1872, Hofmeister (citado por Whitehead, 1904) realizó una de las primeras aportaciones sobre las modificaciones del testículo humano con la edad. Su trabajo se centró en la variación en el número de células intersticiales de Leydig desde el último periodo de desarrollo fetal hasta el adulto. En la etapa fetal estas células constituían dos tercios del total de la glándula. Después del nacimiento, su número disminuía progresivamente hasta los 8 años en que representaban una décima parte, y a partir de la pubertad su número volvía a aumentar considerablemente.

Kirkhan, en 1915, centrándose también en la última fase del desarrollo fetal y en la etapa neonatal del testículo de ratón, hace una descripción de las poblaciones celulares en los "cordones sexuales" o túbulos seminíferos.

En los túbulos del testículo fetal describe dos tipos celulares: las células epiteliales, y las células germinales. Las primeras, muy numerosas, son de pequeño tamaño y ocupan la zona basal del túbulo. Las segundas son de mayor tamaño y aparecen en la zona central del túbulo. Señala que estas últimas degeneran en su mayoría, y que al nacimiento los túbulos presentan células epiteliales y algunas gonias derivadas de las células epiteliales.

En 1957, Clermont y Perey en ratas inmaduras, realizan una descripción muy detallada de las células de los túbulos seminíferos y de las principales modificaciones que sufren en el proceso de maduración.

En animales de 4 a 6 días de edad, destacan la presencia de grandes y pequeñas mitosis en los túbulos. Las primeras aparecen a partir del cuarto día, y se dan entre los gonocitos. Las segundas se observan entre las células de soporte, y duran desde el sexto al día 18.

Estos autores describen a los gonocitos como células de gran tamaño con un núcleo grande, esférico y pálido, que tiene finos gránulos de cromatina y dos o más nucleolos globulares. Los gonocitos que proliferan originan gonias tipo A, caracterizadas por tener el nucleolo cubierto por cromatina.

A partir del sexto día, observan entre las gonias, otro tipo de célula que presenta gruesos gránulos de cromatina en la membrana nuclear y el nucleolo. Son las gonias indiferenciadas (I), que derivan de las anteriores. Estas células a su vez, a partir del día 7-8, originan gonias tipo B caracterizadas por tener gruesos gránulos de cromatina a lo largo de la membrana nuclear. Así mismo observan espermatoцитos primarios entre los días 9 y 12.

Finalmente, estos investigadores indican que las células de Sertoli también sufren modificaciones estructurales, las cuales aparecen a partir del día 33, y se caracterizan por un alargamiento del núcleo, la presencia de un nucleolo esférico y central, y la formación de una profunda indentación en la membrana nuclear.

Mancini y col. (1960), realizan un análisis histológico e histoquímico en testículo humano y llegan a la conclusión de que la línea germinal se diferencia en tres ondas sucesivas. La primera y la segunda se suceden durante el periodo fetal y el infantil, y la tercera comienza en la pubertad conduciendo a la espermatogénesis. Las células de Sertoli, sin embargo, están presentes como células precursoras en el periodo fetal, persisten así durante la infancia y empiezan a madurar en la pubertad.

Courot (1962), en testículo de carnero, hace una diferenciación entre gonocitos, preespermatoгония y gonias tipo A, indicando que los primeros se caracterizan por localizarse en la zona central del túbulo, y por tener una gran actividad mitótica, ya que proliferan hasta el nacimiento.

Las preespermatoгонияs se observan desde el nacimiento hasta el segundo mes de vida y se localizan en la periferia del túbulo. Su principal diferencia con las anteriores, es que tienen mayor cantidad de organelas y presentan puentes citoplasmáticos de unión con preespermatoгонияs vecinas.

Las gonias tipo A aparecen a partir del segundo mes y están sometidas también a una fuerte actividad mitótica.

En 1963, Mancini y col., para completar las investigaciones empezadas un año antes, realizan un análisis cuantitativo de las variaciones de los fibroblastos y células

de Leydig con la edad y su interrelación para establecer un orden en su desarrollo.

Para estos autores existen dos ciclos totalmente diferenciados en el desarrollo de las células de Leydig y ambos se originan a partir de los fibroblastos. Las células de Leydig fetales degenerarían después del nacimiento y durante la infancia sólo se encontrarían en el intersticio precursores de células de Leydig; ya en la pubertad aparecerían células de Leydig adultas que se originarían a partir de las células existentes durante la infancia.

En 1967, Ross determina la naturaleza y evolución de las células fusiformes y de carácter contráctil localizadas alrededor de los túbulos seminíferos del testículo de ratas de diferentes edades mediante un estudio ultraestructural.

En animales recién nacidos, observa células alargadas que se disponen en dos o tres capas alrededor de cada túbulo, apareciendo entre ellas algunas figuras mitóticas; estas células presentan una membrana citoplasmática lisa y en su citoplasma destaca la presencia de RER y numerosas mitocondrias. Por sus características las compara con fibroblastos.

En ratas de 7 días, estas células peritubulares se disponen en una sola capa y sus principales características son la presencia de abundantes filamentos de 400 nm de diámetro con una estructura semejante a los miofilamentos de las células musculares lisas, y el presentar una lámina basal alrededor de casi todas las células peritubulares.

En animales de 19 días, estas células se disponen formando una capa continua alrededor de cada túbulo, ocupando los filamentos gran parte del citoplasma, y presentando la lámina basal numerosas vesículas de pinocitosis. Alrededor de las células peritubulares aparece una segunda capa de células fusiformes que se identifican como fibroblastos. Este autor concluye su trabajo, destacando la naturaleza muscular de las células peritubulares y su origen a partir de fibroblastos.

En este mismo año (1967), Flickinger, analiza ultraestructuralmente en el ratón el desarrollo de las células de Sertoli hasta alcanzar la madurez sexual, indicando que los principales cambios se producen entre la segunda y cuarta semana de vida, y destacando entre ellos el aumento del tamaño celular, el desarrollo gradual de los

procesos citoplasmáticos entre las células germinales y la aparición de complejos de unión entre las células de Sertoli. En el núcleo señala la aparición de una profunda indentación en la membrana nuclear y la formación de una estructura nucleolar tripartita.

Observa además un incremento en el REL, y esto lo relaciona con la adquisición de una capacidad para la síntesis de hormonas esteroideas.

Debido a la naturaleza avascular de los túbulos, este autor ya sugiere que los nutrientes y metabolitos pasan a través de las células de Sertoli, y que los complejos de unión limitarían el paso de material hacia el interior del túbulo.

Skinner y col. en 1968, realizan un estudio del desarrollo postnatal del tracto reproductivo del carnero y su relación con los cambios en los niveles séricos de gonadotropina. Indican que desde el nacimiento hasta el día 42, las modificaciones son escasas y la secreción de andrógenos es baja. A partir de este día se produce un cambio brusco caracterizado por un aumento muy marcado en la actividad androgénica y el establecimiento de la espermatogénesis.

Para estos investigadores la pubertad viene dada por la acción de los andrógenos en respuesta a la liberación de gonadotropinas por parte de la glándula pituitaria, y su acción sobre órganos diana, además del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios.

Vilar en 1970, estudia en testículo humano infantil, las células de Sertoli diferenciando dos tipos, las células de Sertoli claras y las oscuras, indicando además que estas células durante el periodo infantil están sometidas a un proceso de proliferación celular.

La ultraestructura de las células germinales y las células de Sertoli en testículo postnatal de conejo, fue estudiada por Gondos y col. en 1973, y así indican que la aparición de la luz tubular coincide con la presencia de espermátidas, destacando además la estrecha relación de las células de Sertoli con elementos germinales durante el periodo postnatal, y la presencia en el interior de las células de Sertoli, de material

fagocitado derivado de la degeneración de células germinales. Estos hallazgos les sugieren un posible mecanismo de apoyo por parte de las células de Sertoli en la maduración de las células germinales.

En 1974 Bustos-Obregón y Courot, analizan ultraestructuralmente los cambios que se producen en la lámina propia de los túbulos seminíferos de óvidos, desde la fase fetal hasta alcanzar la madurez sexual. En fetos de 54 días observan una membrana basal simple o doble, alrededor de la cual se disponen tres o cuatro capas de células fibroblásticas que presentan en su citoplasma filamentos de 80 Å de diámetro. En animales de dos meses de edad encuentran una membrana basal de apariencia multilaminar (8 a 10 láminas), y externamente a ella dos o tres capas de células, de las cuales la más interna son células contráctiles bien diferenciadas.

Hadziselimovic y Seguchi (1974), mediante un estudio histométrico realizado en testículo humano, muestran como disminuye el número de células de Sertoli por corte transversal de túbulo desde aproximadamente 28 células que hay en el nacimiento, hasta aproximadamente 10 células por túbulo en el adulto.

Estos autores realizan además un análisis ultraestructural de las células de Sertoli, confirmando también la existencia de dos tipos de células de Sertoli inmaduras, unas de núcleo redondo y otras de núcleo alargado.

En 1976, Nagano y Suzuki, por medio de la criofractura, estudian el desarrollo de los complejos de unión en las células de Sertoli de ratón tras el nacimiento, observando que en neonatos, entre las células de Sertoli, predominan las uniones tipo GAP, mientras que las uniones tipo ocluyente solo aparecen en una zona muy limitada de la superficie celular. Con el paso del tiempo disminuye gradualmente el número de uniones tipo GAP a la vez que las ocluyentes van aumentando y forman una red de uniones que discurren paralelas unas a otras. El desarrollo de este tipo de unión es anterior a la aparición de luz en los túbulos.

Por último, resaltan la importancia de estas uniones como base de la barrera hematotesticular, la cual queda establecida a partir del día 16 después del nacimiento.

El desarrollo y la involución de las células de Leydig fetales en el testículo humano es estudiado histológicamente por Gondos en 1977, el cual llega a la conclusión de que los precursores son células mesenquimatosas indiferenciadas.

Van Straaten y Wensing en 1978, establecen dos fases en el desarrollo de las células de Leydig del testículo de cerdo hasta la madurez sexual, utilizando métodos histológicos, histomorfométricos e histoquímicos.

La primera fase se desarrolla durante el periodo perinatal, y se caracteriza porque aparecen células de Leydig de gran volumen. Distinguen dos tipos de células de Leydig, las intertubulares localizadas entre los túbulos y las peritubulares, alrededor de los túbulos y menos desarrolladas. A partir de la segunda o tercera semana, ambas sufren un proceso de regresión.

La segunda fase se observa a partir de la semana 13 de vida, y se caracteriza porque hay un predominio de células peritubulares, que aparecen más desarrolladas.

Estos autores además determinan, con técnicas histoquímicas, la actividad de la enzima hidroxisteroidodeshidrogenasa y las concentraciones de andrógenos en suero y en testículo. Demuestran que en la primera fase, la actividad enzimática es alta en las células intertubulares extendiéndose rápidamente al otro tipo celular. Desde la tercera a la decimotercera semana, la actividad enzimática apenas es apreciable y los niveles de andrógenos son bajos. De aquí en adelante, vuelve a ser apreciable la actividad enzimática, siendo más intensa en las células peritubulares; esto coincide con un aumento en los niveles de andrógenos en suero y en testículo.

En 1981, es estudiado el desarrollo de las células contráctiles de la cápsula y el tejido de alrededor de los túbulos seminíferos del testículo de conejo, por Leeson y Forman.

En la túnica albugínea de animales recién nacidos observan, con el microscopio electrónico, miocitos muy inmaduros e indican que en el proceso de maduración de estas células se produce un aumento en el número de miofilamentos intracitoplasmáticos, la aparición de cuerpos densos o placas de unión, la formación de vesículas de pinocitosis, y la adquisición de una lámina basal continua. Este proceso

se completa a los 128 días, y las células musculares lisas se disponen en dos capas bien organizadas: una superficial, donde las células se orientan longitudinalmente, y otra profunda, donde las células se disponen circularmente.

Por otro lado, Leeson y Forman, señalan que el tejido peritubular posee entre dos y cuatro capas de células indiferenciadas en el nacimiento, que ya a partir de la primera semana se condensan en dos. Las células de las capas más internas presentan en su citoplasma pequeños grupos de microfibrillas, y la capa más externa está compuesta por fibroblastos.

El proceso de maduración se completa a los 112 días, y el tejido peritubular queda organizado en cuatro capas: dos celulares y dos acelulares. La capa más interna está integrada por fibras de colágeno, orientadas paralelas al eje longitudinal de los túbulos. La segunda es una capa continua de miocitos. Cada una de estas células aparecen rodeadas por una membrana basal. A continuación se dispone una capa de fibras de colágeno orientadas longitudinalmente, existiendo en la última fibroblastos dispuestos longitudinalmente.

En 1982, Chevalier y Dufaure, en un estudio en testículo de cerdo prepuberal, observan que el citoesqueleto de la célula de Sertoli queda organizado durante esta etapa. Comprueban además que después de realizar una hipofisectomía, este citoesqueleto puede sufrir una regresión como consecuencia de que está regulado directa o indirectamente por hormonas de la hipófisis.

Nistal y col. (1982), comprueban con métodos histométricos la disminución progresiva del número de células de Sertoli desde el nacimiento hasta la pubertad en el testículo humano. Resaltan además la presencia de mitosis de estas células en recién nacidos que cesan a los pocos días, hecho que ya había sido señalado anteriormente por otros autores.

Un año más tarde (1983), otro grupo de investigadores encabezado también por Nistal, completa el estudio iniciado, con un análisis a nivel ultraestructural de las células de Sertoli.

En niños recién nacidos destacan principalmente la distribución pseudoestratificada de las células de Sertoli, y consideran que la descripción que realizan otros autores de dos tipos de células de Sertoli son el resultado de la adaptación de un solo tipo celular a una distribución pseudoestratificada. También destacan la presencia en el citoplasma de estas células de gran cantidad de RER, hecho que relacionan con la secreción de hormona antimülleriana.

Las principales modificaciones que observan en el proceso de maduración son: la formación de complejos de unión entre las células de Sertoli a partir de los cinco años y que termina al llegar a la pubertad; el aumento de REL, fenómeno que está relacionado con la adquisición de capacidad de síntesis de esteroides; a nivel nuclear la formación de una profunda indentación en la envoltura nuclear y la aparición de una estructura nucleolar tripartita; la presencia de cristales de Charcot- Böttcher en el citoplasma, integrados por acúmulos filamentosos que progresivamente se van alargando.

Estos autores señalan también como fenómeno importante, la transformación que sufre el tejido peritubular que pasa de tener una lámina basal simple y una ó dos capas de miofibroblastos en el nacimiento a presentar en la pubertad una lámina basal multilaminar y miofibroblastos dispuestos en varias capas.

Este mismo año (1983) Herrera y col., trabajando con cerdos de diferentes edades, miden mediante la técnica de RIA los niveles de androstenodiona, testosterona y dihidrotestosterona, y lo relacionan con la morfología de las células de Leydig.

Observan como disminuye el tamaño y el número de células de Leydig a partir del día 40 de vida y ésto coincide con una disminución en la producción de esteroides. A partir del día 78 se produce un aumento tanto en el número de células como en la concentración de los niveles de esteroides.

En 1984 Paniagua y Nistal, realizan un estudio morfológico y ultraestructural de las espermatogonias humanas desde el nacimiento hasta el comienzo de la pubertad.

Al nacimiento observan la presencia de espermatogonias fetales que se caracterizan por su gran tamaño y que persisten durante toda la infancia hasta los 6

años de edad junto a las espermatogonias de transición. También encuentra tres variantes de espermatogonias tipo A, muy numerosas desde el nacimiento hasta la pubertad, y por último describen espermatogonias tipo B presentes en número muy bajo a partir de los 6 años de edad, pero cuyo número va aumentando lentamente.

Estos autores consideran que las características ultraestructurales de las espermatogonias tipo A que aparecen durante la infancia, son similares a las que aparecen en el testículo adulto, por lo que la denominación que utilizan ellos para estas células durante la etapa infantil es correcta.

Van Vorstenbosch y col. (1984), realizan una investigación para establecer el efecto que tiene la privación de gonadotropinas sobre el desarrollo de las células de Leydig. Para ello utilizan testículos de cerdo de diferentes edades y testículos de fetos de 75 días decapitados.

Desde el periodo fetal tardío hasta después del nacimiento destacan el desarrollo gradual del REL. En testículos de fetos decapitados, resaltan el escaso desarrollo de las células de Leydig, siendo el REL la organela más afectada. Estos resultados les llevan a afirmar que el desarrollo de la segunda onda de células de Leydig se ve muy afectado por la falta de hormonas gonadotrópicas.

Estos mismos autores y en este mismo año, amplían el estudio iniciado a las células de Sertoli, y comprueban que en los fetos decapitados no existen alteraciones en el desarrollo de las células de Sertoli, hecho que les sugiere que su desarrollo no está controlado por las hormonas gonadotrópicas.

Prince (1984) examina, con microscopio electrónico, el intersticio de testículos prepuberales humanos, para clarificar y cuantificar los tipos celulares presentes durante este periodo.

Determina que las células de Leydig inmaduras suponen un 9%, las células fibroblásticas primitivas intertubulares un 63% y los fibroblastos peritubulares un 28%. Comprueba la estrecha relación entre los fibroblastos peritubulares y las células fibroblásticas primitivas, a las que distingue por su forma y su localización.

Por otro lado, Prince observa que las características morfológicas de las células de Leydig inmaduras, son las típicas de una célula productora de esteroides y esto le lleva a considerarlas como las progenitoras de la población de células de Leydig adultas. Sin embargo, lo que no aclara totalmente mediante sus investigaciones, es si esta población inmadura es un remanente de las células de Leydig fetales o si se diferencia a partir de las células fibroblásticas primitivas.

Son muy interesantes las aportaciones realizadas por van Vorstenbosch y col. (1984), en testículo fetal y neonatal de cerdo. Realizan un estudio inmunocitoquímico de los filamentos intermedios desde el 52 día de fecundación hasta el nacimiento, periodo que coincide con la regresión de las células de Leydig fetales.

Entre sus resultados destacan la positividad de las células de Sertoli frente al filamento intermedio vimentina. En las células de Leydig también encuentran una positividad que va en aumento coincidiendo con el proceso de regresión que sufren estas células. Por otro lado, no encuentra células positivas frente a la desmina, y con respecto a las citoqueratinas solo observan reacción en las células epiteliales de la red testicular.

En 1985 Waite y col., publican un trabajo sobre la maduración funcional de las células de Sertoli y las de Leydig de distintos mamíferos, y señalan a la proteína ligadora de andrógenos (ABP) como un marcador postnatal de la secreción proteica de las células de Sertoli, y que está bajo el control de la FSH. En ratas, su concentración es máxima la tercera semana de vida. Con la formación de la barrera hematotesticular y el comienzo de la secreción de fluidos de las células de Sertoli hacia la luz tubular, la ABP se vierte en parte al epidídimo.

También indican que algunas de las actividades de las células de Sertoli inmaduras, son reguladas por la FSH, y así encuentran que el número de receptores en éstas células aumenta ligeramente en corderos hasta aproximadamente los 80 días de edad.

En las células de Leydig la alta concentración de testosterona declina poco después del nacimiento y permanece baja justo hasta antes de la pubertad. La

concentración de LH también varía de la misma forma: desciende poco después del nacimiento, y vuelve a aumentar durante la pubertad, originando un incremento en el número de células de Leydig activas.

Mediante un cultivo conjunto de células de Leydig y células de Sertoli de cerdo, se muestra que la FSH actúa vía célula de Sertoli estimulando la secreción de testosterona por parte de la célula de Leydig.

Nistal y col. en 1986, utilizan el método de la peroxidasa antiperoxidasa, para detectar células de Leydig productoras de testosterona en el testículo humano.

Observan un descenso muy marcado de estas células a partir de los 3-6 meses de edad. Hasta los seis años solo encuentran un pequeño número de células positivas a testosterona, y de aquí en adelante el número de células aumenta gradualmente.

Con el microscopio electrónico diferencian cuatro tipos de células de Leydig: las células de Leydig fetales, que aparecen desde el nacimiento hasta el año y que tienen un núcleo redondo, abundante REL y mitocondrias con crestas tubulares; las células de Leydig infantiles, presentes desde el nacimiento hasta los 8-9 años, y que muestran un REL poco desarrollado, un núcleo multilobulado, y algunas gotas lipídicas; las células de Leydig prepuberales parcialmente diferenciadas (de seis años en adelante) con un núcleo redondo, abundante REL, algunas gotas lipídicas y gránulos de lipofuscina; por último las células de Leydig adultas desde los 8-10 años en adelante.

Las características ultraestructurales de las células de Leydig infantiles y la ausencia de células fetales cuando aparecen las infantiles, les llevan a plantear la hipótesis de que las células de Leydig fetales originarían las de tipo infantil. También plantean la posibilidad de que en la pubertad los precursores de miofibroblastos se transformarían en células de Leydig parcialmente diferenciadas, que a su vez se transformarían en Leydig adultas.

El desarrollo de las células de Sertoli de bóvidos es estudiado a nivel ultraestructural por Sinowatz y Amselgruber, en 1986. Estos autores señalan que en animales de 24 semanas, los complejos de unión entre las células de Sertoli vecinas han completado su desarrollo y son la base de la barrera hematotesticular, que ya es

funcional a partir de este momento.

La presencia de un RER y un complejo de Golgi bien desarrollado, la relacionan con una alta actividad secretora. Estos autores especulan con el hecho de que esta actividad pudiera jugar un papel importante en la formación de la lámina basal, la cual está muy desarrollada durante la primera etapa de la vida postnatal.

Lunstra y col., en este mismo año, analizan en testículo de cerdo, con métodos morfométricos, los cambios ultraestructurales que sufren las células de Leydig en animales de 40 a 250 días de edad, y los resultados los comparan con la capacidad in vitro para producir esteroides y la sensibilidad del tejido testicular a las gonadotropinas.

Por los datos obtenidos llegan a la conclusión de que la pubertad en el cerdo coincide con un aumento del volumen de la célula de Leydig, un gran desarrollo del REL y una producción máxima de esteroides, fenómeno que sucede en animales de 130-160 días de vida.

En 1988, Wrobel y col., estudian en bóvidos el desarrollo postnatal de la población celular intertubular: células mesenquimatosas, fibrocitos, células de Leydig, células peritubulares y células mononucleares.

En animales de 4 a 8 semanas de vida destacan, como elemento dominante, las células mesenquimatosas, a las que consideran como células pluripotentes que proliferan por mitosis y son precursoras de las células de Leydig, de las células peritubulares contráctiles y de los fibrocitos.

Desde el nacimiento a la pubertad, basándose en la capacidad para producir esteroides, distinguen tres tipos de células de Leydig: fetales, prepuberales y adultas.

Una de las aportaciones más interesantes que hacen estos investigadores al estudio del testículo, es el análisis que realizan de la población de células mononucleares libres, que suponen un 20-30% de las células intertubulares, y que están integradas por linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y "células intercalares claras". Estas últimas derivan de los monocitos y aparecen a partir de la semana 16 asociadas a las células de Leydig. Su función está asociada con la administración de andrógenos testiculares y el mantenimiento del medio interno constante, siendo capaces

de englobar moléculas proteináceas para transformarlas en material osmóticamente inactivo.

También realizan un análisis sobre la modificación de la lámina propia tubular, encontrando que en animales de 4 semanas de vida tiene un grosor de $2\mu\text{m}$ y una apariencia multilaminar, con una sucesión de bandas electrodensas y electrolúcidas; alrededor presenta una ó dos capas de células peritubulares con una ultraestructura similar a las células mesenquimatosas. En animales de 20 semanas, la lámina propia tiene un grosor de $2'5\mu\text{m}$, y está integrada por una sucesión de unas 20 bandas electrolúcidas y electrodensas, disponiéndose alrededor de 3 a 5 capas de células peritubulares.

La evolución del testículo equino es abordada por Flores y col., (1989 a), investigando estructural y ultraestructuralmente los cambios que experimenta el epitelio de los túbulos seminíferos desde el periodo fetal hasta la madurez.

Establecen cinco fases en este desarrollo: fetal, prepuberal inicial, prepuberal tardía, puberal y adulta. La fase fetal, dura hasta el nacimiento, y se caracteriza por un predominio del intersticio sobre los túbulos, y por la presencia de 2 a 4 células germinales por túbulo seminífero en posición central. La fase prepuberal inicial se extiende hasta el año, y en ella aparece un mayor número de gonocitos. La fase prepuberal tardía (12-16 meses), se caracteriza por la presencia de lobulaciones testiculares y el predominio de los túbulos sobre el intersticio, algunos de los cuales presentan luz. En la fase puberal (16-18 meses), los túbulos tienen la estratificación característica, y entre las células de Sertoli existen uniones ocluyentes que forman la base de la barrera hematotesticular. Por último, la fase adulta se da en animales de más de dos años, y en ella se pueden distinguir los 8 estadios del ciclo del epitelio seminífero y una sola capa de células mioides alrededor del túbulo.

Estos mismos autores (1989b), utilizando la técnica de PAP antitestosterona, detectan durante la fase fetal positividad en células que identifican como células de Leydig fetales. Durante las fase prepuberal inicial la positividad es escasa, y en el intersticio distinguen células de Leydig fetales en regresión y células pre-Leydig

caracterizadas por ser más alargadas. En la fase prepuberal tardía existe un predominio de las células pre-Leydig. Durante la fase puberal y la fase adulta, la mayor parte de las células del intersticio son células de Leydig adultas, que se disponen formando nidos y presentan una fuerte positividad al suero antitestosterona.

Kuopio y col., en este mismo año (1989a), estudian los cambios que sufren las células de Leydig fetales de ratas prepuberales y lo relacionan con las variaciones en la concentración de esteroides y LH en el suero.

Señalan que en el desarrollo de las células de Leydig se suceden tres periodos consecutivos: un periodo fetal con células fetales típicas; un periodo juvenil temprano con células fetales en regresión, y caracterizado por la desintegración de los grupos de células de Leydig y el depósito de colágeno entre estas células; y un periodo juvenil adulto, con células de Leydig adultas antes y después de la pubertad.

Observan además, cómo la reducción del tamaño de las células de Leydig coincide con una menor producción de esteroides, a la vez que se produce un aumento del depósito de colágeno en el intersticio y modificaciones en las membranas basales. Para estos autores los resultados observados son una evidencia de que la matriz extracelular está involucrada en la regulación de las células de Leydig.

Para analizar más en profundidad los resultados obtenidos, estos mismos autores (1989b) realizan otra investigación sobre las membranas basales de las células de Leydig fetales y adultas, utilizando el microscopio electrónico y técnicas de inmunocitoquímica. Indican que las células de Leydig fetales se disponen formando grupos irregulares y que la mayor parte de la superficie de estas células está recubierta por una membrana basal positiva a laminina y a colágeno tipo IV.

Las células de Leydig adultas que aparecen en grupos bien definidos y delimitados por una fina capa de células envolventes presentan una membrana basal discontinua y con escasa positividad a laminina y colágeno IV.

Concluyen el trabajo resaltando la importancia de la matriz extracelular en el desarrollo de las células de Leydig, ya que la migración y adhesión requerida para la agrupación celular es mediada por la matriz.

Russell y col. (1989), estudian el desarrollo postnatal de la barrera hematotesticular en ratas, así como el citoesqueleto de las células de Sertoli y células mioideas relacionándolo con la secreción de fluidos tubulares.

Observan una relación temporal entre el desarrollo del citoesqueleto de actina en la célula de Sertoli y la formación de la barrera hematotesticular, y utilizando fijadores hipertónicos, comprueban la incapacidad de estos fijadores para penetrar en la zona central de los túbulos, en animales de 15 días, lo que les indica que a esta edad la barrera hematotesticular ya se ha desarrollado. Señalan además que la formación de la luz en el interior de los túbulos está muy relacionada con la formación de dicha barrera.

La involución de las células de Leydig fetales en la especie humana, es estudiada por Codesal y col. en 1990, a nivel ultraestructural y con métodos inmunohistoquímicos y cuantitativos. Sus resultados coinciden con la teoría ya postulada por otros autores en diversos animales, sobre la existencia de tres estadios consecutivos en el desarrollo de las células de Leydig: fetal, juvenil temprano y juvenil adulto.

En este mismo año, Bortolussi y col., analizan en testículo de rata desde el nacimiento a la pubertad, la variación del número de receptores gonadotropínicos en las células de Leydig y de Sertoli: en la célula de Sertoli encuentran receptores para la hormona FSH, que aumentan durante las dos primeras semanas de vida coincidiendo con una fase de proliferación mitótica de estas células; en las células de Leydig detectan receptores anti HGC, siendo su número bajo durante las primeras semanas de vida, aumentando en la tercera semana a la vez que se produce la segunda fase del desarrollo de las células de Leydig.

2.2.3. FASES PUBERAL Y ADULTA

Aunque la estructura del testículo, al igual que la de otros órganos del animal adulto, ya ha sido objeto de estudio en siglos anteriores, es a partir del siglo pasado cuando se profundiza en su estudio. Una de las contribuciones más relevantes a este estudio es la realizada por Leydig en 1850 (citado por Whitehead, 1904) que describe como elemento constante en los testículos de animales adultos las células intersticiales, las cuales aparecen cargadas de grasa y pigmentos. Este autor las denomina "células del tejido conjuntivo".

En 1896, Reinke (citado por Whitehead, 1904) observa, en el citoplasma de células intersticiales del testículo humano adulto, unas estructuras cristaloides de forma y tamaño variable, las cuales poseían las características de ser isótropas y las propiedades de solubilidad y tintoriales típicas de las proteínas, con poca afinidad por los colorantes histológicos rutinarios. Aparecen a partir de la pubertad y no están presentes en testículos de personas de edad avanzada.

En 1927, Bascom y Osterud, estudian el testículo de cerdo y destacan el gran desarrollo de las células de Leydig en el animal adulto, que llegan a constituir un 37% del volumen testicular.

Mancini y col. (1952) son de los primeros investigadores que realizan estudios histoquímicos del testículo humano adulto, determinando la localización de sustancias como glucógeno, lípidos, mucoproteínas, ácido ascórbico y fosfatasa alcalina. Entre otras utilizan las técnicas de impregnación argéntica con carbonato de plata de del Río Ortega, método de la orceína, reacción de iodo para el glucógeno, Sudán III, rojo escarlata, método de Gomori, etc...

Entre sus resultados destacan la positividad de todas las células del epitelio germinal a la fosfatasa alcalina, y la presencia en espermatogonias y espermatocitos de primer orden de glucógeno y lípidos, hechos que sugieren a los autores que la actividad

de éstas células está dirigida hacia la división y diferenciación.

En las células de Sertoli también encuentran lípidos y glucógeno cuya cantidad aumenta con la edad, a la vez que aparece ácido ascórbico, lo que les lleva a pensar que éstas células intervienen en el mantenimiento del epitelio germinal por medio de alguna secreción hormonal o de sustancias nutritivas.

En la membrana basal de los túbulos observan positividad a las glicoproteínas y fosfatasa alcalina. En las células de Leydig inmaduras encuentran fosfatasa alcalina y lípidos, en las células de Leydig maduras, lípidos y ácido ascórbico, y en fibroblastos, lípidos, algo de fosfatasa alcalina y ácido ascórbico. Estos resultados les llevan a postular que tanto las células de Leydig como los fibroblastos del tejido conjuntivo intertubular y de la pared tubular, derivan de células conjuntivas inmaduras, y que las células de Leydig pueden transformarse en fibroblastos en algún momento de su involución fisiológica.

Leblond y Clermont son unos de los pioneros del estudio del ciclo del epitelio seminífero, y en este mismo año (1952) realizan un análisis muy detallado de la espermiogénesis en distintos roedores, utilizando la técnica del ácido periódico y fucsina ácida sulfurada (PA-FSA) que les permite visualizar en el citoplasma de las espermátidas estructuras derivadas del complejo de Golgi. Dividen la espermiogénesis en cuatro fases: del Golgi, del capuchón cefálico, del acrosoma y de maduración, cada una de las cuales se subdivide a su vez, sumando un total de 19 estadios. Calculando la duración de cada uno de los estadios, determinan que la espermiogénesis en rata requiere unos 26 días para completarse.

Observan, además, que las células del epitelio seminífero se disponen de una manera específica y ordenada, formando unas asociaciones celulares que se repiten de forma cíclica a lo largo del tubo seminífero, a lo que denominan **ciclo del epitelio seminífero**, y que abarca una serie de cambios que se producen en una área determinada entre la aparición de dos asociaciones idénticas, distinguiendo en él 14 de los 19 estadios de la espermiogénesis.

Unos de los primeros investigadores que realizan un estudio ultraestructural del

testículo fueron Fawcett y Burgos en 1956, que describen las células de Sertoli en el testículo adulto humano.

Entre las aportaciones más importantes que realizan estos autores, destacan la de descartar la idea que se tenía hasta entonces de que las células de los túbulos formaban un sincitio, ya que observan que cada célula de Sertoli está rodeada por una membrana basal continua y presenta una superficie apical muy irregular con profundos entrantes donde se localizan las cabezas de las espermátidas.

Así mismo, en el núcleo de la célula de Sertoli, observan una marcada indentación y en el nucleolo describen un cuerpo esférico con uno o dos cuerpos de baja densidad adheridos a él. En la matriz citoplasmática describen la presencia de grupos de finos filamentos, de gotas lipídicas en la zona basal celular, de grandes gránulos homogéneos de glicoproteínas, así como de escasas cisternas de RE y de cristaloides de Spangaro formados por largos filamentos asociados a fascículos fusiformes.

Oakberg, en 1957, aplicando la técnica del ácido periódico de Schiff describe 16 estadios en la espermatogénesis del testículo de ratón. Los 12 primeros se corresponden con un ciclo del epitelio seminífero y son necesarios cuatro ciclos para que una espermatogonia tipo A se transforme en espermatozoide. Determina que el tiempo requerido para que se complete un ciclo del epitelio seminífero es de 207 horas, y el tiempo de duración de la espermatogénesis es de 34 días y medio.

Aunque ya algunos autores habían señalado la existencia de actividad contráctil a nivel de los túbulos, una de las primeras investigaciones sobre el origen de esta actividad fue realizada por Clermont en 1958, que señala la presencia de elementos celulares contráctiles alrededor de los túbulos seminíferos de testículo de rata, con características similares a células musculares lisas. Este autor los clasifica como un "nuevo epitelio contráctil".

Describe cuatro capas alrededor de los túbulos, dos de naturaleza celular y dos de naturaleza acelular: la más interna está compuesta por células peritubulares que presentan alrededor de toda la superficie celular un material amorfo que recuerda a una membrana basal, y la segunda capa celular está integrada por fibroblastos.

Por último, este autor señala la importancia de éstas células en la liberación de espermatozoos desde el epitelio seminífero y su transporte hacia la red testicular.

En 1959, Clermont y Leblond, estudian el ciclo del epitelio seminífero del mono identificando doce estadios en el mismo y realizando además un análisis de la diferenciación y renovación de las células germinales.

Distinguen dos tipos de espermatogonias, las A y las B, con varios subtipos cada una. Así, en las gonias tipo A, diferencian las A_1 , de núcleo pequeño esférico y uniformemente teñidas, que a su vez pueden ser pálidas y oscuras, y las gonias tipo A_2 , de núcleo más grande y ovalado, con gruesos gránulos de cromatina y con un nucleolo en forma de "lágrima".

Entre las gonias B diferencian varios tipos, las B_1 , las B_2 y las B_3 . Las gonias tipo B_1 presentan un núcleo grande y ovoide con gruesos gránulos de cromatina adosados a la membrana nuclear y al nucleolo, las gonias tipo B_2 tienen el núcleo más pequeño y ovoideo y presentan más cromatina y las gonias tipo B_3 se caracterizan por su núcleo pequeño redondo y oscuro.

Perey y col. en 1961, realizan un análisis del epitelio seminífero de rata en cortes seriados de testículo de animal adulto y establecen una serie de conceptos.

Definen como **segmentos** aquellas zonas del túbulo, de longitud variable, ocupadas por una asociación celular. En el ciclo del epitelio seminífero reconocen 14 estadios que se suceden en el tiempo en cualquier área del túbulo, y por tanto contabilizan 14 tipos de segmentos. Denominan **onda del epitelio seminífero** a una sucesión completa de los 14 segmentos junto con pequeñas zonas de modulación, y calculan que en toda la longitud de un túbulo se produce una media de 12 ondas.

Estos mismos autores, observan también la modificación que sufre el epitelio seminífero en la zona de unión con los túbulos rectos, caracterizada por una deplección del elemento germinal maduro, y quedando la pared del túbulo tapizada por células de Sertoli y gonias. Posteriormente, éstas últimas desaparecen, produciéndose a continuación una transición brusca a un epitelio cúbico típico de los túbulos rectos.

Un año más tarde (1962) Vilar y col., estudiando las células de los túbulos seminíferos del testículo de rata, cobaya y hombre con microscopio electrónico, comprueban que la transferencia de elementos entre los vasos del intersticio y las células germinales se realiza a través del citoplasma de la célula de Sertoli, que actuaría como puente. Según estos autores las únicas que toman directamente elementos del intersticio son las espermatogonias que contactan directamente con la membrana basal.

Brökelmann, en este mismo año, analizando ultraestructuralmente la presencia de grasa en las células del túbulo seminífero de ratas adultas, observa grandes gotas de material lipídico en las células de Sertoli después de la fagocitosis de los cuerpos residuales, así como en todas las células germinales, siendo las inclusiones de mayor tamaño en las células más maduras.

Indica además este autor que las estructuras citoplasmáticas de las células de Sertoli son las típicas de una célula productora de esteroides y que sufre variaciones cíclicas. Durante la primera fase de la espermatogénesis se reduce la presencia de material lipídico en las células de Sertoli, ya que se utiliza para la síntesis de hormonas esteroideas. Considera que la primera fase del ciclo estaría regulada por alguna hormona sintetizada por las células de Sertoli bajo la influencia de la FSH

En 1963, Clermont analiza, en cortes seriados de testículo de hombre, el ciclo del epitelio seminífero y describe seis asociaciones celulares o seis estadios. Llega a la conclusión de que, aunque existe un patrón claro en el ciclo del epitelio seminífero, los estadios no aparecen tan perfectamente delimitados como en otras especies.

Christensen y Fawcett en 1966 observan, al microscopio electrónico, las células intersticiales del testículo de ratón, después de la fijación con glutaraldehído, que preserva mejor los retículos, y señalan que los elementos principales de estas células son, por una parte, el REL constituido por una extensa red de túbulos interconectados que ocupan casi todo el citoplasma celular y, por otra, las mitocondrias de crestas tubulares. Describen también la presencia de un sistema de túbulos paralelos de pared

doble y un sistema de membranas concéntricas alrededor de una gota lipídica o de otra inclusión, lo que consideran como modificaciones del REL. Destacan la importancia de esta organela como lugar de síntesis de andrógenos y señalan que las formaciones membranosas concéntricas serían zonas de almacenamiento del colesterol.

Las células intersticiales del testículo de cerdo adulto son estudiadas por Belt y Cavazos, en 1967, con microscopía electrónica, y al igual que otros autores en diferentes especies, resaltan el gran desarrollo del REL y de las mitocondrias, la mayoría esféricas y con crestas tubulares. Describen, además, la presencia de unos cuerpos densos asociados a las mitocondrias, de tamaño y número variable, y que contienen en su interior material denso granular o estructuras de tipo cristaloides.

En este mismo año, Ross, describe ultraestructuralmente las células peritubulares contráctiles de los túbulos seminíferos del ratón, que se disponen formando una capa simple alrededor de cada túbulo, debajo de la cual aparece una capa integrada por fibroblastos.

Las células peritubulares poseen, según este autor, numerosos filamentos de 40 Å de diámetro con una estructura similar a los miofilamentos de las células musculares lisas, que ocupan la mayor parte del citoplasma y discurren paralelos a la membrana citoplasmática. Así mismo, describe pequeñas vesículas en la membrana y la presencia de un material amorfo con apariencia de membrana basal alrededor de éstas células. Por último el autor destaca la naturaleza muscular de estos elementos, y aboga por su posible origen a partir de fibroblastos.

La estructura de los complejos de unión entre las células de Sertoli y las células del epitelio seminífero es estudiada por Flickinger y Fawcett (1967) en ratón, gato y chinchilla. Entre células de Sertoli adyacentes, observan uniones desmosómicas caracterizadas por tener un espacio de separación de 70 a 90 Å de grosor. Debajo de cada membrana citoplasmática aparecen grupos de filamentos que corren paralelos a la superficie celular y que están asociados a cisternas de RE localizadas por debajo de ellos. Las cisternas de RE tienen adosados ribosomas en la cara interna. Estos autores

comparan las uniones entre las células de Sertoli y las espermatidas con hemidesmosomas ya que aparece el mismo tipo de estructura descrito anteriormente pero sólo en la célula de Sertoli. Comprueban además la ausencia de uniones entre las células de Sertoli y el resto de células germinales, fenómeno que permite el movimiento de esta población celular, mientras que la presencia de complejos de unión entre las células de Sertoli interviene en el mantenimiento de la integridad de las células del epitelio seminífero.

Swierstra en 1968 identifica 8 estadios en el ciclo del epitelio seminífero de cerdo. Mediante la utilización de marcadores determina además la duración de un ciclo en 8,6 días y del tránsito del espermatozoo a través del epidídimo en 10,2 días.

En 1969 Fawcett y col., demuestran la existencia de un extenso sistema de sinusoides linfáticos de pared muy delgada, en el intersticio testicular de cobayas y chinchillas. El endotelio de estos sinusoides aparece en estrecha relación con la lámina propia de los túbulos seminíferos por un lado, y con agrupaciones de células intersticiales por otro. Estos autores señalan la importancia de este sistema en la distribución de andrógenos dentro del testículo y en la recaptación de las proteínas séricas que se escapan a través de los capilares sanguíneos del intersticio.

Dym y Fawcett en 1970, señalan la importancia de las células de Sertoli en el mantenimiento de la barrera hematotesticular. Inyectando marcadores electro-opacos observan como éstos llenan los canales linfáticos y el intersticio testicular, y entran en el compartimiento basal de los túbulos seminíferos pero no alcanzan la luz tubular ya que se lo impide la presencia de estrechas uniones entre células de Sertoli adyacentes. Estas dividen al túbulo seminífero en dos compartimientos, el basal, que contiene gonias y los espermatoцитos más primitivos, y el compartimiento adluminal donde se encuentran las células germinales más maduras.

En 1972 Foote y col., utilizan como criterio la forma del núcleo de la espermatida, su localización con respecto a la membrana basal, la presencia de figuras

meióticas y la liberación de espermatozoides a la luz del túbulo, para dividir el ciclo del epitelio seminífero del perro en ocho estadios. Marcan además las células germinales con H-timidina y determinan la duración del ciclo seminífero en 13,6 días.

Un estudio comparativo de los vasos linfáticos del intersticio testicular en diversos mamíferos, es realizado por Fawcett y col. (1973), llegando a la conclusión de que sólo en roedores existen amplios sinusoides linfáticos peritubulares, y que en el resto de las especies estudiadas aparecen discretos vasos linfáticos, estando en algunas zonas el intersticio en contacto directo con la lámina propia de los túbulos seminíferos.

En este mismo año, Connell estudia ultraestructuralmente el intersticio del testículo de perro donde destaca la presencia de varias capas de células mioides caracterizadas por presentar en su citoplasma grupos de microfilamentos, gránulos de glucógeno, escasas cisternas de RER y vesículas de micropinocitosis a nivel de la membrana citoplasmática. Próximas a los capilares sanguíneos encuentra agrupaciones de células de Leydig que contactan entre sí por medio de uniones tipo GAP. Por último, describe un tercer tipo de células con características intermedias entre las células de Leydig y las células mioides, que se localizan entre los túbulos seminíferos y los vasos linfáticos o sanguíneos.

Dym (1973), investiga en el mono, con el microscopio electrónico y utilizando trazadores, la importancia de las uniones entre células de Sertoli adyacentes en el mantenimiento de la barrera hematotesticular y en la división del túbulo seminífero, imprescindible para crear un medio especial donde se producen los procesos de división durante la espermatogénesis.

El ciclo del epitelio seminífero del caballo es estudiado por Swierstra y col. (1974), que lo dividen en ocho estadios y calculan su duración en 12'2 días. Señalan además que durante la estación reproductora la espermatogénesis es mayor, ya que ven que durante esta época el número de espermatozoides primarios es mayor.

Leeson y Cookson (1974), realizan un estudio estructural y ultraestructural de la cápsula testicular de rata, gato, perro y hombre, confirmando la presencia de tres capas, la túnica vaginal, la túnica albugínea propiamente dicha, y la túnica interna vascular. Además, observan la presencia de fibras musculares lisas en la túnica albugínea de las cuatro especies, siendo más numerosas en el polo posterior del testículo, y la existencia de algunas fibras musculares estriadas en la cápsula testicular de perro y rata. La presencia de estos elementos musculares la relacionan con el movimiento de los espermatozoides desde el testículo hasta el epidídimo.

En 1975, Leeson estudia el desarrollo postnatal de los elementos musculares lisos de la cápsula testicular de rata, desde el nacimiento hasta los 60 días de edad, comprobando que estos elementos se pueden distinguir ya al nacimiento por medio del microscopio electrónico, mientras que histológicamente se pueden diferenciar a los 30 días.

Clark (1976), es uno de los primeros investigadores que utiliza el microscopio electrónico de barrido para el estudio del testículo, encontrando tres tipos de espacios linfáticos comunicados entre sí, en el tejido intersticial de rata. Al primer tipo le denomina "sinusoide linfático peritubular" y se caracteriza por estar localizado entre dos túbulos seminíferos adyacentes y por estar delimitado por un endotelio continuo; el segundo tipo aparece en espacios intersticiales abiertos y su pared está delimitada por un endotelio discontinuo; el tercer tipo es un sinusoide linfático localizado entre la túnica albugínea y el intersticio.

En este mismo año, Connell observa también por medio del microscopio electrónico de barrido en el intersticio testicular del perro, canales linfáticos peritubulares delimitados por un endotelio continuo o discontinuo que, generalmente, están en estrecha relación con grupos de células de Leydig. La presencia de gotas lipídicas en el interior de algunas células endoteliales le lleva a plantearse la posibilidad de que estas células participen activamente en la esteroidogénesis.

Fritz y col. (1976), miden en cultivos celulares de células de Sertoli la capacidad de éstas para unir andrógenos, comprobando que la secreción de proteína ligadora de andrógenos (ABP) aumenta después de un tratamiento con FSH y AMPc. Estos autores llegan a la conclusión de que la ABP es producida por las células de Sertoli.

En este mismo año, Russel (1977a), en un estudio estructural y ultraestructural, observa cómo la célula de Sertoli establece uniones tipo desmosómicas con todas las células de la línea germinal excepto con las espermátidas alargadas. Estas uniones se caracterizan por presentar un material denso debajo de cada membrana plasmática. La distancia que queda entre ambas células varía entre 3-5nm en algunas zonas y 14-18nm en otras, y en algunas regiones del espacio intercelular aparece una línea densa intermedia frecuentemente discontinua.

Este autor utiliza la denominación "uniones tipo desmosómica", indicando que aunque existe mucha similitud con los desmosomas, no coinciden totalmente con la descripción clásica de estas estructuras, y así mismo está en desacuerdo con teorías postuladas anteriormente que consideran que la mayoría de las células germinales están libres de uniones y esto les permite desplazarse hacia la luz tubular.

Continuando en ésta misma línea de investigación, Russel (1977b) utiliza fijadores hipertónicos para analizar el movimiento del espermatozoides primario desde el compartimiento basal al adluminal, observando que los espermatozoides en fase de preleptotene son las primeras células de la línea germinal que pierden el contacto con la membrana basal y que las uniones que establecen con las células de Sertoli desaparecen en algunas zonas para volverse a formar en otras. La ausencia de fijadores alrededor de los espermatozoides en leptotene y la presencia de complejos de unión entre los procesos laterales de las células de Sertoli que envuelven por arriba y por abajo a estas células, puede considerarse indicativa de que los espermatozoides en leptotene se localizan en un compartimiento intermedio el cual actuaría como una cámara de transición entre el compartimiento basal y adluminal del epitelio seminífero.

Este autor concluye destacando la importancia que tienen las células de Sertoli

en la transferencia de las células germinales desde el compartimiento basal al luminal, y la existencia del compartimiento intermedio en el mantenimiento de la barrera hematotesticular

En este mismo año, Toyama y col., trabajan con muestras de testículo de cerdos normales y criptóquidos, haciéndolas reaccionar con meromiosina pesada después de un tratamiento con saponina, para determinar la composición de los filamentos finos de las células de Sertoli.

En la zona basal de estas células, y en zonas próximas a los espermatocitos de todos los animales, observan microfilamentos cortos de naturaleza parecida a la actina que integran la capa filamentosa que existe en los complejos de unión entre las células de Sertoli y las espermátidas. Además, evidencian en las células de Sertoli de animales criptóquidos, una estructura cristaloides integrada también por elementos filamentosos de naturaleza semejante a la actina, y consideran que se trata de grupos de filamentos que al no poder formar las especializaciones por no existir espermátidas, se acumulan y forman estas estructuras.

Por último señalan que la naturaleza de estos microfilamentos es diferente a los que integran los cristales de Charcott-Botcher de las células de Sertoli del testículo humano.

En el conocimiento del testículo ha supuesto un gran avance científico el estudio de los filamentos intermedios de cada tipo celular ya que ha permitido así dilucidar su origen. Los pioneros en este tipo de investigaciones son Franke y col., que en 1979, mediante una técnica de inmunofluorescencia indirecta demuestran la presencia de vimentina formando una extensa red a través del citoplasma de la célula de Sertoli así como la ausencia de queratina en estas células y en las células germinales.

Por los resultados obtenidos, estos autores llegan a la conclusión de que las células de los túbulos seminíferos son de origen mesenquimatoso aunque con una diferenciación epitelioides. La presencia de vimentina en las células de Sertoli la relacionan con el mantenimiento de la forma celular.

En 1980, Clermont y col. analizan en testículo de ratón, los cambios que sufre el RE localizado en los procesos apicales de las células de Sertoli durante el periodo anterior a la liberación de las espermátidas. Describen dos tipos de cisternas de RE, unas aplanadas y lisas y otras tubulares comunicadas entre sí, estando las primeras muy desarrolladas y formando unas laminillas concéntricas, y, las segundas, menos desarrolladas y formando una red continua, al principio del estadio VII. Poco después, las cisternas lisas empiezan a involucionar mientras que las otras se desarrollan a través de los procesos apicales, de forma que en el momento de la liberación del espermatozoide sólo quedan cisternas dispersas.

Este mismo año, Mori y Christensen realizan un estudio cuantitativo de las células de Leydig y sus organelas en ratas.

Para calcular el volumen de estas células utilizan un microscopio con objetivo de 40 aumentos y adaptan una gradilla punteada al ocular. La densidad de volumen la obtienen dividiendo el número de núcleos de células de Leydig que coinciden con puntos por el número total de puntos de la gradilla y, el número de células de Leydig por unidad de volumen testicular lo hallan utilizando la ecuación de Floderus: $N_v = \frac{N_A}{T + D - 2h}$, donde N_A es el número de núcleos por unidad de área, D es la media del diámetro nuclear, T es la media del grosor de la sección y h es la altura del núcleo más pequeño. El volumen medio de las células de Leydig lo obtienen al dividir la densidad de volumen entre la densidad numérica.

Para estimar la densidad volumétrica de las organelas y la densidad de superficie de las membranas, utilizan electronografías de células de Leydig a un aumento de 10.800, mientras que emplean un aumento de 72.000 para medir la densidad de superficie de las organelas.

Entre otros datos obtienen que las células de Leydig ocupan un 2,7% del volumen total testicular, y que el REL representa un 60% del total del área de la membrana celular.

Leeson y Forman (1980), que estudian las células contráctiles del testículo de conejo, señalan que la cápsula testicular de los animales adultos está integrada por una

capa externa de células musculares lisas orientadas circularmente alrededor del testículo, y capas internas de células orientadas oblicuamente al eje del testículo, todas ellas caracterizadas por presentar cuerpos densos en la membrana celular, vesículas de micropinocitosis y miofilamentos que ocupan casi todo el citoplasma celular.

Estos mismos autores indican también que las células peritubulares contráctiles maduras aparecen en animales de unos 112 días y se caracterizan porque se disponen en dos capas separadas por una zona acelular. Externamente a la membrana basal del túbulo existe un espacio con fibras de colágeno; luego aparece una capa de células peritubulares cuyo citoplasma tiene numerosas microfibrillas asociadas a cuerpos densos, vesículas de micropinocitosis y alrededor de la superficie celular una membrana basal; a continuación, existe una capa acelular y más externamente hay fibroblastos orientados longitudinalmente alrededor del túbulo.

La presencia de transferrina en el testículo es demostrada por Skinner y Griswold (1980), los cuales, mediante una serie de pruebas bioquímicas aislan una proteína, en cultivos de células de Sertoli, con idénticas características que la transferrina sérica. Esta proteína supone entre el uno y el cinco por ciento de las proteínas secretadas por las células de Sertoli y actúa aportando hierro a las células germinales en desarrollo.

Estos mismos autores aislan otra proteína secretada por las células de Sertoli y la identifican como ceruloplasmina, una proteína transportadora de Cu.

En 1981, Wrobel y col. realizan unas aportaciones muy interesantes con respecto al intersticio del testículo bovino, ya que encuentran entre células de Leydig adyacentes, además de uniones tipo GAP, canalículos intercelulares, los cuales son interpretados como un camino alternativo para la liberación de hormonas esteroideas por parte de las células que están a mayor distancia de los vasos sanguíneos y linfáticos.

Consideran, además, que las uniones tipo GAP modularían la producción de andrógenos testiculares, ya que este tipo de unión permite el intercambio de iones y pequeñas moléculas, de tal forma que las células próximas a los vasos, al recibir

señales gonadotrópicas, producirían pequeñas moléculas mensajeras capaces de pasar a través de las uniones a células más distantes de los vasos.

Estos autores describen, también en el intersticio, una población de células electrolúcidas, a las que denominan "células intercalares claras", cuya función sería la intervención en el proceso de almacenamiento y distribución de andrógenos, ya que emiten procesos citoplasmáticos que se localizan entre las células de Leydig y los vasos sanguíneos y linfáticos.

Hutson y Stocco (1981), mediante estudios en cultivos celulares de células de Sertoli y células peritubulares en conjunto y por separado, demuestran que las células de Sertoli producen mayor cantidad de proteína ligadora de andrógenos (ABP) en asociación con las células peritubulares. Esto les sugiere que las células peritubulares no actúan sólo como elemento de soporte, sino que podrían además estar involucradas en la regulación de las células de Sertoli.

Paniagua y col. (1984), señalan la existencia de laminillas anulares en las células de Sertoli humanas y, por su relación con cisternas de RER consideran que podrían derivar de éstas. También observan que la aparición de estas estructuras coincide con una disminución de RER y REL, por lo que especulan con la posibilidad de que estas estructuras representen un reservorio de membranas.

Elcock y Schoning (1984), unos de los pocos investigadores que trabajan en testículo de gato, describen algunos cambios que se producen en el testículo felino con la edad, y entre otros citan el engrosamiento de la túnica albugínea, el aumento en el depósito de lipofuscina en el interior de las células intersticiales, el engrosamiento de las membranas basales de los túbulos y la vacuolización que sufre el citoplasma de algunas células de Sertoli.

En 1985, Morales y col., investigan, mediante la utilización de trazadores, la actividad endocítica de los procesos apicales de la célula de Sertoli, demostrando que la eliminación de los cuerpos residuales por parte de la célula de Sertoli se lleva a cabo

mediante dos procesos distintos, uno de fagocitosis del cuerpo residual y otro de endocitosis de fluidos que origina la formación de lisosomas, los cuales posteriormente se fusionan con el material fagocitado.

Paniagua y col. (1985), describen algunas alteraciones que aparecen en las células de Sertoli de personas con edad avanzada, destacando entre otras, el acúmulo gradual de lípidos y la presencia en el interior del citoplasma de estas células de vacuolas con un contenido similar al encontrado en la luz tubular, que son interpretadas como dilataciones del espacio extracelular originadas por una exfoliación prematura de las células germinales. Por último, destacan la presencia de células multinucleadas procedentes de la fusión de células degeneradas.

Los autores piensan que estos cambios se producen como consecuencia de algunas alteraciones que aparecen con la edad, como son, la disminución en los niveles de testosterona y la aparición de alteraciones vasculares como la arteriosclerosis, que podría actuar disminuyendo la actividad metabólica de las células que participan en la espermatogénesis.

Pöllänen y col. (1985), realizan un estudio inmunohistoquímico del testículo humano utilizando como antisuero primario la laminina y el colágeno tipo IV.

Encuentran positividad en la membrana basal de los túbulos seminíferos y en la capa de células peritubulares frente a ambos anticuerpos, y además observan reacción en las células de Sertoli frente a laminina. Los resultados obtenidos les hace pensar que estas sustancias pueden estar secretadas por las células mioideas y por las células de Sertoli.

Pier (1985), es uno de los pocos investigadores que realiza un estudio histológico más en profundidad del testículo del gato, describiendo ocho estadios en el ciclo del epitelio seminífero, y calculando además el diámetro medio de los túbulos seminíferos en 239 μm .

Kirkpatrick (1985), mide en gato, la concentración de testosterona plasmática

y el peso del testículo durante un año entero, comprobando que el peso testicular sigue unos patrones estacionales obteniendo valores máximos en la época reproductora. Sin embargo, también encuentra que los túbulos seminíferos producen espermatozoides durante todo el año y que la fluctuación en la concentración de testosterona es mínima. Estos datos les sugieren que el celo del gato no es estacional aunque existe cierta influencia positiva del fotoperiodo sobre el peso testicular.

Skinner y col. (1985), investigan la síntesis y el depósito de componentes de la matriz extracelular en cultivos celulares de células de Sertoli y células peritubulares procedentes de testículo de rata. Utilizando técnicas inmunohistoquímicas comprueban que las células de Sertoli reaccionan específicamente frente a colágeno tipo IV y laminina, mientras que las células peritubulares lo hacen frente a fibronectina, colágeno tipo I y colágeno tipo IV. Observan, además, que en los cultivos de ambos tipos de células se produce un aumento en el depósito de matriz extracelular, demostrando así que existe una cooperación entre ellas para la formación y depósito de los componentes de la matriz.

Miettinen y col. (1985), con la técnica inmunocitoquímica de la peroxidasa-anti-peroxidasa, corroboran la presencia de vimentina en las células de Sertoli, comprobando además que este filamento también se encuentra en las células de Leydig. Por otra parte, estos mismos autores observan células positivas a citoqueratinas en el epitelio de la red testicular.

Un año más tarde (1986), y siguiendo en esta misma línea de investigación, Virtanen y col. analizan la composición del citoesqueleto de las células mioides peritubulares del testículo humano y de rata mediante inmunofluorescencia, demostrando que estas células presentan una fuerte reacción frente a la desmina y una débil reacción frente a la vimentina.

Por los resultados obtenidos llegan a la conclusión de que las células mioides son células musculares lisas especializadas y que presentan desmina como principal filamento intermedio de su citoesqueleto.

En 1986 Nistal y col. calculan el número de células de Leydig mononucleadas y multinucleadas que hay en testículo humano adulto, utilizando la técnica de peroxidasa-anti-peroxidasa para la detección de testosterona. Los datos que obtienen les indican que con la edad se produce un aumento en el número de células multinucleadas, a la vez que la población total de células de Leydig disminuye.

Otro grupo de investigadores encabezado también por Nistal (1986), siguiendo en la línea de investigación de las modificaciones del testículo con la edad, encuentran que el aumento en el número de espermátidas multinucleadas en la luz del túbulo seminífero es otra manifestación de los procesos involutivos que afectan a los testículos de personas de edad avanzada.

En éste mismo año Sinowatz y Amselgruber, en un análisis del desarrollo postnatal del testículo bovino, describen células de Sertoli maduras en animales con 10 meses de edad, destacando en su estudio el gran desarrollo del REL y la presencia de numerosos microtúbulos paralelos al eje longitudinal de la célula, los cuales configuran el citoesqueleto celular. Además, coinciden con otros autores en la función moduladora que ejercen las células de Sertoli sobre el desarrollo de las células germinales a través de la secreción de sustancias como la proteína ligadora de andrógenos, el plasminógeno activador, la transferrina y la ceruloplasmina.

Wrobel y Hees (1987), encuentran células de Leydig en la túnica albugínea y en el estroma del mediastino del testículo de gato. Estos autores consideran que se trata de células de Leydig ectópicas y que podrían tener importancia en el abastecimiento de la cabeza del epidídimo con andrógenos.

En un trabajo publicado también en 1987, Takano y Abe describen histológicamente los cambios regresivos que se producen en testículo de ratón con la edad, destacando entre otros, la aparición de vacuolas en el túbulo seminífero, la presencia en la luz tubular de espermátidas, espermatoцитos y células multinucleadas, la existencia también en la luz tubular de nódulos ovoides PAS positivos integrados por

macrófagos, el aumento del grosor de las membranas basales tubulares y la aparición de atrofas tubulares.

Estos autores citan como principales causas de estos cambios regresivos, la disminución que se produce en el aporte sanguíneo, el agotamiento de las células de Sertoli que altera la barrera hematotesticular y facilita la creación de anticuerpos frente a las propias células germinales, el engrosamiento de las membranas basales por el depósito de complejos Ag-Ac y la baja producción de testosterona por el envejecimiento de las células de Leydig.

Paniagua y col. (1987), determinan las variaciones en el número de espermatogonias Ad (núcleo oscuro), Ap (núcleo pálido), Al (núcleo alargado) y Ac (núcleo con zonas claras y oscuras), a través de los seis estadios del ciclo del epitelio seminífero humano y cuantifican su contenido en DNA mediante la técnica de tinción de Feulgen. Los datos obtenidos les llevan a formular la siguiente hipótesis: las espermatogonias Ad son el origen de todas las demás, y por replicación del ADN de algunas de éstas aparecen las Al; otras sufren una división originando más espermatogonias Ad, que mantienen la fuente de células germinales, y también espermatogonias Ap. Estas últimas sufren una replicación de su ADN convirtiéndose en espermatogonias Ac que por mitosis originan espermatogonias B.

La presencia de inhibina es analizada por Cuevas y col. (1987), que utilizan la técnica de inmunoperoxidasa avidina-biotina para ponerla en evidencia en las células del testículo. Solo observan su presencia en el interior de las células de Sertoli, por lo que llegan a la conclusión de que estas células producen inhibina en respuesta a una estimulación de la FSH.

Amlani y Vogl (1988), analizan los cambios que se producen en la distribución de los microtúbulos y de los filamentos intermedios de las células de Sertoli, durante la espermatogénesis.

Los microtúbulos son muy evidentes en los procesos laterales que envuelven a las espermátidas. Cuando éstas ocupan las zonas más apicales, los microtúbulos se

orientan paralelos al eje longitudinal de la célula de Sertoli y se van concentrando progresivamente en la región adyacente al acrosoma, formando una estructura en forma de "C" que desaparece durante la espermiación; los filamentos intermedios se localizan alrededor del núcleo y desde allí se extienden hacia las zonas que presentan complejos de unión con las células germinales más inmaduras, así como hacia las regiones apicales, donde se asocian de manera transitoria con los filamentos de actina de las especializaciones ectoplásmicas que están en contacto con las espermatidas alargadas. Los filamentos desaparecen cuando las espermatidas adquieren las posiciones más apicales.

Gardec y col. (1988), confirman mediante técnicas inmunohistoquímicas la presencia de inhibina en las células de Sertoli, evidenciándola también en alguna de las células germinales, las cuales, según estos autores, podrían actuar modulando la producción de inhibina por parte de la célula de Sertoli.

Sin embargo, una de las aportaciones más interesantes que realizan es la observación de una reacción positiva por parte de las células de Leydig frente a la inhibina, lo que consideran que podría deberse a la existencia en estas células de receptores específicos.

La activina, proteína compuesta por dímeros de las subunidades de inhibina beta y con un efecto opuesto a la inhibina, es investigada por Lee y col. en 1989, que la aíslan en cultivos de células de Leydig, llegando a la conclusión de que esta sustancia es producida por dichas células.

Anthony y Skinner (1989) evidencian la presencia de desmina y fosfatasa alcalina en cultivos de células mioides peritubulares, comprobando además que los andrógenos estimulan la actividad de la fosfatasa alcalina de dichas células. Estos resultados les llevan a pensar que la acción que ejercen los andrógenos sobre el testículo podría estar mediada por las células mioides.

En 1990 Santamaría y col., realizan un estudio inmunocitoquímico con

laminina, colágeno tipo IV y fibronectina en testículo humano desde los 2 a los 40 años de edad. Estos autores observan laminina en la parte interna de la lámina propia de los túbulos seminíferos, a partir de la infancia. La fibronectina la detectan en todo el grosor de la lámina propia y en el tejido conjuntivo intersticial. Con respecto al colágeno tipo IV, observan también positividad en toda la lámina propia, aunque la inmunotinción es menor durante la infancia.

Grove y col. (1990), mediante técnicas de inmunofluorescencia detectan la vinculina, proteína de 130 Kd que contribuye a la adhesión de los filamentos de actina a la membrana plasmática. Estos autores observan su presencia en las especializaciones ectoplasmáticas de las regiones de las células de Sertoli próximas a las espermátidas, y basalmente próximas a los complejos de unión.

Una de las últimas publicaciones aparecida sobre el testículo y que revoluciona el concepto que se ha tenido hasta ahora de las células germinales como elemento pasivo, es realizada por Nitta y col., en 1993, en la que demuestran la presencia de la aromatasa P450 en las células germinales del testículo de ratón. Estos autores plantean la hipótesis de que las células germinales puedan actuar también, como unidades endocrinas celulares, regulando la producción de andrógenos a través de un mecanismo de retroalimentación negativa sobre las células de Leydig.

2.2.4. TUBULOS RECTOS Y RED TESTICULAR

Uno de los primeros autores que abordó el estudio histológico de la red testicular en diferentes especies, fue Benoit en 1926, el cual realiza un estudio comparativo en diversos mamíferos. Este autor describe dos tipos de red testicular, una superficial localizada inmediatamente por debajo de la túnica albugínea y que es característica de rata, ratón y hamster, y otra axial que discurre por el eje longitudinal del testículo y es típica del perro, gato, cerdo, toro, oveja y conejo.

Dym, en 1974, indica que el mono presenta una red testicular de tipo axial integrada por una red de canales intercomunicados entre sí, e inmersa en un tejido conjuntivo laxo altamente vascularizado.

Este autor, además, realiza un análisis ultraestructural de la zona de transición entre los túbulos seminíferos y túbulos rectos, la cual aparece integrada únicamente por células de Sertoli que se caracterizan por no tener desarrollada la barrera hematotesticular.

Este mismo autor en 1976, corrobora las descripciones realizadas por Benoit en diferentes mamíferos, y describe además la zona de unión de los túbulos rectos y los túbulos seminíferos, donde observa una pérdida gradual de las células germinales. Esta parte se continúa con un segmento en el cual solo existen células de Sertoli, que directamente se une con el epitelio cúbico simple o cilíndrico de los túbulos rectos.

En el estudio ultraestructural de estas células destaca la presencia de un gran núcleo heterocromático de contorno irregular y con una profunda escotadura en la membrana nuclear, y en el citoplasma la presencia de pequeñas mitocondrias esféricas, complejo de Golgi, abundantes ribosomas libres y algunas cisternas de RER.

Por último, este autor incluye en su estudio, la red testicular de animales prepuberales, en la cual destaca la ausencia de luz.

En 1977, Amann y col. observan que la red testicular de équidos, está integrada

por una red de túbulos anastomosados localizada en el polo dorsocraneal del testículo alrededor de la vena central. La zona de transición con los túbulos seminíferos es corta y está delimitada por células de Sertoli en un principio y por un epitelio cúbico con microvellosidades, característico de los túbulos rectos. La red testicular perfora la túnica albugínea y se continúa con una red extratesticular. La unión con los conductos eferentes se evidencia por un cambio brusco desde epitelio cúbico a epitelio columnar con algunas células ciliadas.

Mediante un estudio ultraestructural, Sinowatz y col. (1979), evidencian fenómenos de fagocitosis de restos de espermatozoides, en el epitelio que recubre la porción distal de los túbulos rectos y parte de la red testicular del testículo de bóvidos. A este nivel también observan macrófagos localizados en la zona basal del epitelio, los cuales participarían en la eliminación de restos de material espermático.

Nykänen (1980), describe el tejido conjuntivo de la red testicular como una matriz con escasas fibras de colágena, fibroblastos, algunos linfocitos, macrófagos y mastocitos, así como con células de Leydig de gran tamaño con grandes gotas lipídicas en su citoplasma. El autor indica que este tejido tiene gran importancia en el intercambio de metabolitos, y que la presencia de grandes gotas lipídicas en las células de Leydig refleja la baja actividad de estos elementos en la síntesis de esteroides, en comparación con las células de Leydig del resto del intersticio testicular.

Wrobel y col. (1982) diferencian tres regiones en la zona de unión de los túbulos seminíferos con los túbulos rectos en testículo de bóvidos: la región de transición, zona intermedia y el tapón terminal.

En la primera región observan una pérdida gradual de las células germinales, la región intermedia aparece integrada por células de Sertoli modificada, y la última región también por células de Sertoli dispuestas en varias capas y que se introducen en la parte inicial de los túbulos rectos. La luz tubular es más estrecha en estas regiones y desaparece en el último tramo, de tal manera que los espermatozoides tienen que pasar a través de un sistema de hendiduras que quedaría entre las superficies apicales

de las células de soporte, y que actuaría de válvula para prevenir el reflujo de espermatozoides.

Orsi y col. (1984) estudian la morfología de la red testicular de cápridos, donde describen una red septal o interlobulillar y una mediastínica, y cuya organización es similar a la de otros mamíferos domésticos.

Son muy interesantes las aportaciones hechas por Achtstätter y col. (1985), mediante el estudio con inmunofluorescencia que realizan en las células epiteliales de la red testicular. Estos autores observan que el epitelio simple de esta estructura es positivo a las citoqueratinas número 7, 8, 18, y 19 y es negativo al filamento intermedio vimentina.

Las modificaciones que sufren las zonas de unión entre los túbulos seminíferos y túbulos rectos durante el desarrollo postnatal, son analizadas por Wrobel y col. (1986) en testículo bovino.

Según estos autores, en este proceso de maduración, se distinguen tres fases: la primera fase aparece en animales de 4 a 8 semanas de edad, y se caracteriza por que la transición es brusca, túbulos seminíferos que presentan un diámetro tubular menor se continúan con túbulos de estrecha luz cuyo epitelio es estratificado y rico en canalículos intercelulares. La segunda fase se da en animales de 20 a 25 semanas de edad y, en ella aparece el segmento terminal, el cual se introduce en la parte inicial de los túbulos rectos que ya presentan un epitelio simple. En animales de 40 semanas de edad ya se puede observar la estructura tripartita típica de los adultos: región de transición, segmento intermedio y tapón terminal.

En 1988, Hermo y Dworkin realizan un extenso y profundo estudio sobre la ultraestructura y actividad endocítica de las células existentes en la zona de transición entre los túbulos seminíferos y la red testicular del testículo de rata. Aunque coinciden con otros autores en que estas células tienen características comunes con las células de Sertoli, consideran que es más correcto denominarlas "células de transición".

En su estudio destacan en estas células la presencia de abundantes microtúbulos en la región apical, los cuales juegan un papel esencial en el mantenimiento de la forma y su orientación hacia la red testicular. Según estos autores, los fenómenos de endocitosis y pinocitosis que se producen a este nivel, podrían estar relacionados con la modificación de la composición del fluido luminal. Por último, señalan que el gran desarrollo que presenta la membrana basal en esta región es necesario, ya que sus células tienen que soportar una gran presión debido a la disminución que hay de la luz tubular.

En 1991 Dinges y col., realizan un estudio inmunocitoquímico de la coexpresión de las células de los túbulos rectos y red testicular de testículo humano frente a la vimentina y citoqueratinas, desde la fase fetal a la fase adulta.

Ambos filamentos se expresan ya durante la fase fetal tardía con una distribución homogénea en las células epiteliales. Durante la fase infantil los resultados son similares y en la fase adulta la distribución de los filamentos varía algo, ya que la vimentina se localiza principalmente en la base celular mientras que las citoqueratinas se sitúan en la región apical.

Estos resultados están en desacuerdo con los obtenidos por otros autores que solo detectaron citoqueratinas en estas células. Para estos autores, la coexpresión de ambos filamentos es debido a que estas estructuras son remanentes de los túbulos mesonéfricos.

Las características estructurales y ultraestructurales de la red testicular del gato son estudiadas por Viotto y col. (1991), que observan tres partes diferentes, una parte septal o lobular, una parte mediastínica y una parte albugínea.

La red consiste en un conjunto de canales delimitados por un epitelio cilíndrico o cúbico simple, a excepción de en la primera parte donde a veces se observa un epitelio pseudoestratificado.

3. MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. ANIMALES ESTUDIADOS

Para este estudio, hemos empleado testículos de 51 gatos obtenidos mediante castración o a partir de animales eutanasiados que no presentaban alteraciones testiculares, de los cuales, 38 eran de gatos pertenecientes a la raza común europea, 10 eran de gatos siameses y 3 de gatos persas.

La edad de los animales comprendía desde fetos a término hasta gatos de un año de edad (tabla 3.1).

3.2. TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras se efectuó en el laboratorio de Anatomía Patológica del Departamento de Patología Animal II (Facultad de Veterinaria de Madrid), inmediatamente después del sacrificio o de la castración, con el fin de conseguir una fijación correcta.

Para el estudio estructural se tomaron muestras de testículo en forma de cuña desde la superficie al centro, de tal manera que quedaba incluido cápsula, parénquima y mediastino testicular, con un espesor de 1 cm aproximadamente.

Para el estudio ultraestructural se tomaron muestras de tres localizaciones diferentes: cápsula, parénquima y mediastino testicular. Las piezas se tallaron en cubos de unos 2 mm de grosor.

3.3. PROCESADO DE LAS MUESTRAS

3.3.1. FIJACION

Las muestras destinadas al estudio con técnicas convencionales se fijaron en formol al 10% durante 24 horas a temperatura ambiente.

Las muestras empleadas para la realización de técnicas inmunohistoquímicas se

fijaron en líquido de Bouin (75% de ácido pícrico a saturación, 25% de formalina comercial, 1 gota de ácido acético por cada 10 cc de la mezcla anterior), por un periodo variable entre 2 y 4 horas. Posteriormente se realizaron cambios sucesivos en alcohol de 40 grados para lavar bien las muestras.

Para el estudio ultraestructural las piezas fueron fijadas en buffer-milloning-glutaraldehído al 3%, durante 2 horas; seguidamente se retallaron las piezas en pequeños cubos de 1mm de arista y se procedió a realizar una postfijación durante 30 a 60 minutos en tetróxido de osmio.

3.3.2. INCLUSION

Para microscopía óptica las muestras se lavaron en agua corriente durante 1 ó 2 horas. Posteriormente se realizó la inclusión en parafina sintética "Histosec pastillas", con punto de solidificación entre 56 y 58 grados centígrados, mediante un procesador automático de tejidos "Shandon-Elliot, Bench SCE 0400", con un programa de cambios en alcoholes etílicos de graduación creciente y bencenos.

Una vez concluido este proceso se realizaron los bloques en la unidad formadora de bloques: "Consola Tissue-Tek (dispensadora de parafina, consola térmica y crioconsola), Miles Scientific".

Para microscopía electrónica, las piezas se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente (desde 40 grados a alcohol absoluto); seguidamente se dieron dos lavados en óxido de propileno, uno en óxido de propileno-Epon en proporción 1/1 y finalmente fueron incluidas en Epon-Araldita mediante el empleo de cápsulas convencionales.

3.3.3. OBTENCION DE CORTES

Para el estudio estructural, se realizaron cortes seriados de 4-5 μm de grosor, en un microtomo "Minot Leitz 1516" con un motor incorporado. Los cortes se recogieron y se llevaron a un baño de María a 37 grados centígrados. A continuación se colocaron sobre portaobjetos previamente desengrasados y tratados con diversos adhesivos según la técnica posteriormente empleada. Así, para la aplicación de técnicas histológicas convencionales, los portaobjetos se trataron con albúmina

glicerizada, y para las técnicas inmunohistoquímicas se empleó poli-L-lisina Agarosa (MN:4,000-15,000; Sigma Chemical Company). Por último, los cortes se dejaron secar en una estufa a 37 grados centígrados durante 16-18 horas.

Para **microscopía electrónica**, se realizaron primero cortes semifinos de 1-2 micrómetros de grosor en un ultramicrotomo modelo LKB III, los cuales fueron observados al microscopio óptico y sirvieron como control; así mismo se realizaron cortes ultrafinos de un grosor entre 40 y 60 nm que fueron montados en rejilla de cobre.

3.3.4. TINCIONES

3.3.4.1. Microscopía óptica.

Como **métodos generales de tinción** se emplearon las técnicas de :

- Hematoxilina-eosina
- tricrómico de Masson.

Los **métodos histoquímicos** utilizados fueron:

- método del P.A.S.
- método de plata-metenamina de Jones.

Tanto los colorantes como los tiempos utilizados en cada uno de ellos, son los habituales que se emplean en nuestro laboratorio de histopatología.

Para el **estudio inmunohistoquímico** del testículo se utilizó el método de la **peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP)** (tabla 3.2), empleando diversos antisueros específicos y siguiendo el protocolo de tinción descrito por Sternberger (1979), que a continuación pasamos a describir:

1. Desparafinación e hidratación de las muestras.
2. **Inhibición de la peroxidasa endógena** mediante un tratamiento con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 minutos.

3. Lavado en PBS, 5 minutos, tres veces.

4. **Digestión enzimática** durante 7 minutos a 37° C. Este proceso intensifica la presencia de los diferentes antígenos. La digestión enzimática empleada fue la siguiente:

- . **Digestión en una solución de tripsina** (Sigma Chemical Co.) al 0,1%, en Cl₂Ca al 0,1%. Esta se realizó cuando se utilizaron como anticuerpos primarios los sueros anti-citoqueratina de amplio espectro y anti-desmina.
- . **Digestión en una solución de pepsina** (Sigma Chemical Co.) al 0,4% en HCl al 0,1N. Esta se realizó cuando se utilizaron como anticuerpos primarios los sueros anti-laminina y anti-colágeno tipo IV.
- . No fue necesaria digestión cuando se utilizaron como anticuerpos primarios los sueros anti-vimentina y anti-testosterona.

5. Lavado en PBS, 5 minutos, tres veces.

6. Incubación en **suero normal** durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Sueros empleados:

- . **Suero normal de cerdo** (Dako-Patts 901). Dilución de trabajo: 1/30.

Este suero se utilizó para reducir la tinción inespecífica cuando se emplearon como anticuerpos específicos los sueros anti-queratinas, anti-laminina y anticología tipo IV.

- . **Suero normal de conejo** (Dako-Patts 902). Dilución de trabajo: 1/30.

Este suero se utilizó para reducir la tinción inespecífica cuando se emplearon como anticuerpo específico los sueros monoclonales anti-desmina y anti-testosterona

- . Este paso se omitió cuando se trabajó con el suero monoclonal anti-vimentina.

7. Aplicación del **anticuerpo primario** e incubación a 4 C durante 18 horas. La dilución óptima se determinó probando distintas diluciones sobre las muestras testiculares, y varió dependiendo del suero utilizado.

Antisueros primarios utilizados:

- **Anti-testosterona** monoclonal obtenida en ratón (Chemicon, MAB, 1236). Dilución de trabajo, 1:200.
- **Anti-vimentina** monoclonal de cristalino de cerdo obtenido en ratón (V 9). (Dakopatts, M 725). Dilución de trabajo, 1:10.
- **Anti-desmina** monoclonal obtenida en ratón (Sigma Immuno Chemicals). Dilución de trabajo, 1:200.
- **Anti-citoqueratinas** epidérmicas de hocico bovino, de amplio espectro obtenido en conejo (Dako Corporation Z622). Marca las subunidades 58, 56 y 52 KD y en menor cantidad las subunidades 60,51 y 48 KD. Dilución de trabajo, 1:100.
- **Anti-Laminina** aislado de placenta humana, obtenido en conejo (Chemicon International, INC AB949). Dilución de trabajo: 1/25.
- **Anti-Colágeno tipo VI** aislada de placenta humana, obtenido en conejo (Chemical Credential ICN Biomedicals, Inc. 68-124). Dilución de trabajo: 1/100.

8. Lavado en PBS, 5 minutos, tres veces.

9. Incubación con el **anticuerpo secundario** durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las características de estos anticuerpos se detallan a continuación:

. **Anti-IgG de cerdo en conejo** (Dako-Patts Z196). Dilución de trabajo: 1/100.

Este anticuerpo se utilizó cuando se emplearon como anticuerpos específicos los sueros policlonales anti-citoqueratinas, anti-laminina y anti-colágeno tipo IV.

. **Anti-IgG de ratón en conejo** (Dako-Patts B650). Dilución de trabajo 1/30.

Este anticuerpo se utilizó cuando se emplearon como anticuerpos específicos los sueros monoclonales anti-desmina, anti-vimentina y anti-testosterona.

10. Lavado en PBS, 5 minutos, tres veces.

11. Incubación con el **complejo PAP** a temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Características del complejo PAP:

. **PAP de conejo** (Dako-Patts Z113). Dilución de trabajo: 1/64.

Se empleó cuando se utilizaron como anticuerpos específicos sueros policlonales.

. **PAP de ratón** (Dako-Patts B650). Dilución de trabajo: 1/310.

Se empleó cuando se utilizaron como anticuerpos específicos sueros monoclonales.

12. Lavado en PBS, 5 minutos, tres veces.

13. **Revelado con DAB** (3,3'-diamino-bencidine tetrachloride, SIGMA Immuno Chemicals D5905) a temperatura ambiente y en tiempos variables.

14. Lavado en agua corriente durante 10 minutos.

15. Tinción de contraste con hematoxilina, lavado, deshidratación y montaje.

Fueron así mismo empleados tanto controles positivos, como controles negativos:

- controles positivos:

. Testosterona..... testículo adulto equino.

. Vimentina..... endotelio vascular felino.

. Desmina..... músculo estriado felino.

. Citoqueratinas..... epidermis felina.

. Laminina..... membrana basal de estructura vascular felina.

. Colágeno tipo IV.... membrana basal de estructura vascular felina.

- controles negativos: omisión de la primera capa.

3.3.4.2. Microscopía electrónica

Los cortes semifinos utilizados como controles para el microscopio electrónico fueron coloreados mediante el método de azul de metileno.

Los cortes ultrafinos fueron contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo.

3.4. OBSERVACION DE LAS PREPARACIONES

El estudio estructural se efectuó en un microscopio "Olympus Vanox AHSB3", con sistema de autofocus y dos cámaras incorporadas.

Para el examen ultraestructural, el microscopio electrónico empleado fue un modelo "JEOL JEM 100 B", del servicio de Microscopía electrónica de la Facultad de Veterinaria de Madrid.

3.5. ESTUDIO MORFOMETRICO

Se realizó directamente sobre los cortes seriados, eligiendo al azar 10 secciones de cada testículo, con un ocular Olympus WHK 10x/20L previamente calibrado para cada objetivo (4x, 10x y 40x) mediante un micrómetro Leitz de 2mm con intervalos de 0,001 mm. En cada una de las secciones fueron medidas:

- el diámetro tubular
- el número de células de Sertoli por sección transversa de túbulo seminífero, contabilizando sólo aquellos núcleos que quedaron perfectamente enfocados con un micrómetro ocular adaptado al objetivo de 40x.

3.6. ICONOGRAFIA

Para las microfotografías empleamos película Kodak Ektachrome 64 de tungsteno, utilizando las cámaras incorporadas en el microscopio Olympus AH-3 (Vanox AHB53).

Las electronografías fueron obtenidas mediante un sistema incorporado en el microscopio electrónico, sobre película rígida especial en placas de 6,5x9 cm.

TABLA 3.2: resumen de la técnica del PAP.

Ac específico	Tipo de Ac específico	Suero Normal	Digestión enzimática	Dilución trabajo	Ac puente	Tipo PAP
Testosterona	monoclonal	SNR	no	1/200	MAR	ratón
Vimentina	monoclonal	no	no	1/10	MAR	ratón
Desmina	monoclonal	SNR	tripsina	1/200	MAR	conejo
Queratina	policlonal	SNC	tripsina	1/100	SAR	conejo
Laminina	policlonal	SNC	pepsina	1/25	SAR	conejo
Colágeno IV	policlonal	SNC	pepsina	1/100	SAR	conejo

SNC: suero normal de ratón.

SNC: suero normal de cerdo.

MAR: anti IgG de ratón en conejo.

SAR: anti IgG de cerdo en conejo.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos poseen una serie de características diferenciales, que nos permiten dividir el desarrollo del testículo del gato en cuatro fases histológicas bien definidas: perinatal, infantil, puberal y adulta.

Dentro de cada una de estas fases y para facilitar la exposición de los resultados de una forma ordenada y completa, hemos creído oportuno abordar las distintas partes del testículo siguiendo el siguiente esquema:

1. **Sistema tubular**: en este apartado abordaremos en primer lugar los túbulos seminíferos con sus distintos componentes: células de Sertoli, células germinales y lámina propia, describiendo, así mismo, las características de los túbulos rectos y de la red testicular.

2. **Intersticio**: donde estudiaremos principalmente las células de Leydig, otras poblaciones celulares, como los fibroblastos, y las características del tejido conjuntivo intersticial.

3. **Cápsula testicular**: en este apartado describiremos principalmente las características del tejido conjuntivo integrante de esta estructura.

En cada uno de estos apartados expondremos las características histológicas, inmunohistoquímicas y ultraestructurales más destacadas.

4.1. FASE PERINATAL

Esta fase está integrada por testículos de feto a término y de animales hasta de un mes de edad aproximadamente, y se caracteriza por la presencia de pequeños túbulos seminíferos separados entre sí por un abundante intersticio, observándose el tejido testicular sin compartimentar en lobulillos (fig. 1).

4.1.1. CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS

4.1.1.1. SISTEMA TUBULAR

Durante este periodo los **túbulos seminíferos**, que carecen de luz (fig. 2), presentan un diámetro aproximado de 89 μm y están rodeados por dos o tres capas de células fusiformes. Su pared está tapizada principalmente por células de Sertoli inmaduras, en un número aproximado de 25 células por sección transversal, y entre ellas se observan escasas células germinales.

Las **células de Sertoli inmaduras** (fig. 2 y 3) se caracterizan por poseer un núcleo picnótico de forma ovoidea y contorno regular, que presenta un nucleolo pequeño generalmente cubierto por finos gránulos de heterocromatina más concentrados en la cara interna de la membrana nuclear. El núcleo suele localizarse a diferentes alturas, lo que le confiere al túbulo un aspecto estratificado. Los límites citoplasmáticos de estas células son poco evidentes.

Las **células germinales**, como ya hemos dicho, son mucho más escasas y pueden verse cuatro o cinco por corte transversal tubular. La principal característica de estos elementos es que son de mayor tamaño y de forma redondeada o poligonal con lo que se diferencian fácilmente de las células de Sertoli.

Dentro de las células germinales hemos podido diferenciar tres tipos:

A. Las más numerosas son unas espermatogonias redondas, que generalmente se localizan en posición basal, y cuyo núcleo puede aparecer bajo dos formas diferentes: redondo y claro, con un nucleolo central y visible y con escasos grumos de cromatina gruesa más concentrados en la periferia nuclear, o redondo, con finos

gránulos de cromatina distribuidos por todo el nucleoplasma; el nucleolo es pequeño y no es visible en todas las células. Consideramos que estas células son dos tipos diferentes de **espermatozonias tipo A** (fig. 2 y 3), y pueden aparecer en número de dos o tres por túbulo seminífero.

B. El segundo tipo se caracteriza por ser una célula de gran tamaño, con un núcleo grande (de unos 25 μm aproximadamente de diámetro), redondo y pálido, y con un nucleolo eosinófilo muy evidente. A estas células las hemos identificado como **espermatozonias fetales** (fig. 2), son muy escasas y sólo aparece una en algunos túbulos ocupando generalmente posiciones centrales.

C. El tercer tipo celular también aparece en número muy escaso. Son células de reducido tamaño, con un núcleo pequeño, redondo y picnótico y un citoplasma muy eosinófilo. Consideramos que se trata de **células germinales en vías de degeneración** (fig. 3) y también suelen ocupar la parte central del túbulo.

Durante esta fase es frecuente encontrar algunas mitosis entre las células que tapizan los túbulos.

Rodeando a cada uno de los túbulos seminíferos aparece una membrana basal positiva a la técnica de PAS y a la de plata-metenamina; debajo de esta membrana se observan dos o tres capas de células fibroblásticas de núcleo fusiforme y citoplasma escaso (fig. 2 y 3). A estas células las identificamos como **células peritubulares**.

En las zonas próximas al mediastino testicular, encontramos la parte terminal de los túbulos seminíferos, que se caracteriza porque sufren un estrechamiento y se continúan con los **túbulos rectos** (fig. 4), de diámetro más pequeño y con luz, tapizados por un epitelio cilíndrico bajo o cúbico. Sus células contienen un núcleo basal, pálido y de forma ovoidal que aparece ocupado por finos gránulos de cromatina distribuidos uniformemente por el nucleoplasma y una superficie apical que presenta microvellosidades cortas y escasas, PAS positivas.

Los túbulos rectos en el mediastino se continúan con la **red testicular mediastínica** (fig. 4), que está compuesta por pequeños espacios de forma irregular, delimitados por un epitelio cúbico. Sus células presentan un núcleo redondo y

picnótico, en el que hemos podido observar de uno a tres nucleolos pequeños, a veces enmascarados por finos gránulos de cromatina. Estas células también presentan en la superficie apical cortas microvellosidades, PAS positivas. Por el mediastino la red testicular se dirige hacia el polo craneal del testículo, originando una red testicular situada inmediatamente debajo de la cápsula, la cual aparece inmersa en un tejido conjuntivo denso que emite la cápsula hacia el interior del parénquima. Esta estructura presenta las mismas características histológicas que la red testicular mediastínica y la hemos identificado como una **red testicular albugínea**.

Debajo del epitelio, tanto de los túbulos rectos como de la red testicular, aparece una membrana basal muy evidente con la técnica de PAS y de plata-metamina, así como dos o tres capas de células fibroblásticas.

4.1.1.2. INTERSTICIO

Durante este periodo el intersticio es muy abundante. Está compuesto principalmente por células de Leydig de forma poligonal (fig. 5 y 6), que tienen un núcleo redondo en posición central o un poco desplazado hacia un extremo del citoplasma, con un nucleolo muy evidente localizado centralmente. El citoplasma de estas células es muy eosinófilo y está repleto de pequeñas vacuolas lipídicas.

Estas células las identificamos como **células de Leydig fetales** y suelen aparecer reunidas en grupos de forma variable e integrados por un número diferente de elementos dependiendo de su localización. Así los grupos que aparecen entre los túbulos tienen forma triangular o esférica y están integrados por 4 a 8 células, los que aparecen debajo de la túnica albugínea (fig. 5 y 6) son de forma alargada y están integrados por 8 a 10 elementos, y los grupos mayores son los que aparecen próximos al mediastino testicular (fig. 4) que son de forma más irregular y presentan hasta 14 ó 16 células, siendo frecuente encontrar algunas mitosis.

Rodeando a estos grupos de células se evidencia una membrana basal, de carácter discontinuo, con la técnica de PAS y de plata-metamina, que delimita parcialmente a estas células del intersticio que las rodea.

Estas agrupaciones celulares además están en estrecha relación con los capilares y pequeños vasos sanguíneos que son muy numerosos en todo el intersticio.

En las zonas del intersticio comprendidas entre los túbulos seminíferos y los grupos de células de Leydig aparece un tejido conjuntivo con abundantes fibras de colágeno y fibroblastos fusiformes de núcleos alargados y pálidos, con finos gránulos de cromatina.

A nivel del mediastino testicular el intersticio está integrado por un tejido conjuntivo más denso con numerosos fibroblastos y muy vascularizado (fig. 4).

4.1.1.3. CAPSULA TESTICULAR.

Está formada por tejido conjuntivo denso y rodeada por una capa de células mesoteliales, que en algunas áreas son cúbicas (fig. 5).

En la zona más externa de la cápsula el tejido conjuntivo es más laxo, y los fibroblastos que aquí se encuentran son de forma estrellada u ovoidea; a este nivel se observan algunos vasos linfáticos. En la zona más interna de la cápsula el tejido conjuntivo es más denso, los fibroblastos son fusiformes, y aparecen numerosos vasos sanguíneos de mediano y pequeño calibre, que constituyen la **túnica vascular** (fig. 6).

Con la técnica de plata-metenamina hemos podido comprobar la gran riqueza de la cápsula en colágeno tipo III.

4.1.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO

4.1.2.1. SISTEMA TUBULAR

Durante esta fase perinatal, la positividad de las células de los **túbulos seminíferos** es muy escasa frente a la mayoría de los sueros empleados para detectar filamentos intermedios. Así, hemos encontrado una reacción nula por parte de las células de los túbulos seminíferos frente a las citoqueratinas de amplio espectro y a la desmina y una débil reacción de las células de Sertoli inmaduras frente a la vimentina, que en su mayoría pueden considerarse negativas (fig. 11).

Para el estudio de las membranas basales hemos empleado los sueros anti-laminina (fig. 7) y anti-colágeno tipo IV, observando una positividad media alrededor de los túbulos seminíferos, que es mayor en los túbulos rectos y red testicular (fig. 8).

En la parte apical de las células epiteliales que tapizan la pared de los **túbulos rectos y red testicular** se observa una inmunorreacción media frente al suero anti-citoqueratinas de amplio espectro (fig. 9). Esta positividad nos permite visualizar perfectamente el punto exacto del inicio de los túbulos rectos, ya que la zona anterior integrada sólo por células de Sertoli aparece negativa. Con respecto a los resultados de estas células frente a la vimentina hemos encontrado una positividad media localizada principalmente en la región apical tanto en los túbulos rectos como en la red testicular.

4.1.2.2. INTERSTICIO

Hemos observado que las **células de Leydig**, tanto las que se localizan entre los túbulos seminíferos, como las situadas inmediatamente debajo de la túnica albugínea y en el mediastino testicular, presentan una evidente inmunorreacción frente al suero anti-testosterona (fig. 10), poniéndose así de manifiesto la capacidad secretora de estas células durante esta primera fase.

Con respecto a la vimentina, se observa una reacción fuerte en las células de Leydig (fig. 11), localizada principalmente en la región perinuclear. Frente a este

mismo filamento hemos detectado una positividad media de los fibroblastos intersticiales y de las células endoteliales de los vasos.

La inmunorreacción detectada frente a la desmina queda reducida a las células musculares lisas de los vasos, y en cuanto al colágeno tipo IV y laminina, se observa una positividad clara pero discontinua en la membrana basal de alrededor de los grupos de células de Leydig.

4.1.2.3. CAPSULA TESTICULAR

A este nivel se observa inmunorreacción positiva en los fibroblastos y en las células endoteliales de los vasos, frente a la vimentina. Con respecto a la expresión de desmina hemos encontrado que es evidente, sólo en las células musculares lisas existentes en la pared de los vasos. En el resto de los elementos celulares que integran la cápsula testicular, no hemos encontrado reacción frente a este filamento intermedio, lo que demuestra la ausencia de células de naturaleza muscular durante este periodo.

4.1.3. CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES

4.1.3.1. SISTEMA TUBULAR

Durante la fase perinatal, las **células de Sertoli inmaduras** (fig. 12) se caracterizan ultraestructuralmente por tener un núcleo redondo u ovoideo, de contorno ligeramente irregular, que a veces puede presentar una pequeña escotadura. Aparece localizado a distintas altura, tiene grumos de heterocromatina más concentrados en la periferia nuclear; así mismo posee un pequeño nucleolo. El citoplasma tiene un contorno muy irregular, extendiéndose desde la base hasta el centro del túbulo, rodeando con sus prolongaciones a las escasas células germinales presentes en esta fase. En él destacamos la presencia de cisternas de RER que pueden adquirir una disposición paralela o formar láminas concéntricas. Las mitocondrias generalmente son de forma esférica y con crestas transversales, apareciendo además abundantes ribosomas, algunos gránulos electrodensos y lisosomas. Entre las células de Sertoli vecinas hemos observado interdigitaciones de las membranas laterales.

Dentro de las **espermatogonias tipo A**, unas se caracterizan por tener un núcleo redondo o ligeramente ovoide con una fina banda de heterocromatina adosada a la membrana nuclear y un nucleolo muy evidente y central (fig. 12). En el citoplasma de estas células que es electrolúcido se observa algunas cisternas de RER, mitocondrias esféricas, complejo de Golgi, ribosomas y algunas figuras de mielina. El otro tipo de espermatogonia tipo A (fig. 13), tiene un tamaño parecido y presenta un núcleo más redondo y eucromático, ocupado por finos gránulos de cromatina y un nucleolo menos desarrollado que suele encontrarse desplazado hacia la periferia. En el citoplasma observamos los mismos tipos de organelas descritas para la célula anterior.

Las **espermatogonias fetales** son las células de mayor tamaño del túbulo y poseen un núcleo grande, redondo y eucromático, con escasos grumos de heterocromatina distribuidos irregularmente y un nucleolo bien desarrollado. El citoplasma es muy electrolúcido y tiene escasas organelas: algunas mitocondrias redondas, cisternas de RER y ribosomas libres.

Las **células germinales en vías de degeneración** se caracterizan por presentar un núcleo redondo y heterocromático, con cromatina muy condensada. En el citoplasma de estas células encontramos los signos típicos de degeneración celular como son la presencia de mitocondrias muy electrodensas y cisternas de RE muy dilatadas.

Las **células peritubulares fibroblásticas** (fig. 12) que rodean los túbulos seminíferos presentan un núcleo fusiforme, con una banda de heterocromatina adosada a la membrana nuclear y un pequeño nucleolo. En el citoplasma que es escaso observamos abundantes cisternas de RER, algunas mitocondrias y ribosomas libres. Entre las células peritubulares y los túbulos seminíferos, encontramos una membrana basal simple (fig. 12) y numerosas fibras de colágeno orientadas longitudinalmente alrededor del túbulo.

Los **túbulos rectos** se caracterizan por tener un epitelio cilíndrico bajo, cuyas células poseen un núcleo eucromático, de forma ovoidea aunque de contorno ligeramente irregular y cubierto por finos gránulos de cromatina distribuidos uniformemente por el nucleoplasma.

El citoplasma posee escasas mitocondrias, la mayoría esféricas con crestas tubulares y localizadas principalmente en la región supranuclear. También se observa escaso RER, vesículas de REL, y ribosomas libres. Estas células presentan en las superficies apicales celulares, microvellosidades cortas y en número escaso, y en las superficie laterales uniones de tipo desmosómico entre las membranas citoplasmáticas de células vecinas.

Las células del epitelio de la **red testicular** (fig. 14) tienen morfología cuboidal, con el núcleo esférico de contorno algo irregular y heterocromático que puede presentar de uno a tres pequeños nucleolos. La superficie apical de estas células también presenta microvellosidades cortas y escasas, y entre las membranas citoplasmáticas de células vecinas se observan numerosos desmosomas. En el citoplasma destacamos la presencia de mitocondrias, RER, REL y ribosomas, y en la parte apical aparecen algunos gránulos electrodensos de pequeño tamaño.

Alrededor tanto de los túbulos rectos como de la red testicular, hemos observado una membrana basal muy evidente.

4.1.3.2. INTERSTICIO

Las **células de Leydig fetales** (fig. 15) se caracterizan por su forma poligonal y por presentar un núcleo redondo generalmente excéntrico. Es eucromático y con escasos grumos de cromatina adosados a la membrana nuclear y asociados al nucleolo que es muy evidente. En el citoplasma observamos numerosas mitocondrias, la mayoría esféricas con crestas tubulares, el REL está muy desarrollado y también aparecen cisternas de RER generalmente concentradas alrededor de figuras de mielina, algunas gotas de electrodensidad media de lípidos y un complejo de Golgi. Las membranas citoplasmáticas de las células de Leydig vecinas quedan separadas por un estrecho espacio y entre ellas hemos encontrados algunos complejos de unión.

Alrededor de los grupos de células de Leydig encontramos una membrana basal muy evidente, pero discontinua. Más externamente se observan **células fusiformes** (fig. 15) con un núcleo que presenta una banda muy evidente de heterocromatina a lo largo de la cara interna de la membrana nuclear, y un citoplasma muy escaso donde destaca el desarrollo del RER y la presencia de ribosomas y escasas mitocondrias. Entre estas células y los grupos de células de Leydig aparecen abundantes fibras de colágeno.

4.1.3.3. CAPSULA TESTICULAR

Como ya hemos descrito histológicamente, la cápsula aparece rodeada por una capa de células mesoteliales que ultraestructuralmente se caracterizan por presentar un núcleo grande, en posición central, redondo u ovoideo y eucromático, que tiene de uno a tres nucleolos, alguno de los cuales puede aparecer próximo a la membrana nuclear. Adosada a la cara interna de ésta se aprecia una fina banda de heterocromatina. En el citoplasma de estas células destacamos la presencia de RER, algunas mitocondrias y ribosomas.

Debajo de estas células, aparecen haces de fibras de colágeno la mayoría orientados perpendicularmente con respecto a las células, y algo separados entre sí. A este nivel también se observan fibroblastos de forma entre ovoidea y estrellada, que

Resultados

tienen un núcleo grande, eucromático, cubierto por finos gránulos de cromatina y con un nucleolo central muy evidente. En el citoplasma de estas células apreciamos un RER muy desarrollado, abundante REL, algunas mitocondrias esféricas, lisosomas y un pequeño complejo de Golgi en posición yuxtannuclear.

En la zona más interna de la cápsula, el colágeno es más abundante, y los haces aparecen orientados longitudinalmente alrededor de la cápsula. Los fibroblastos que encontramos a este nivel, son más alargados, y tienen un núcleo más heterocromático, con abundantes grumos de cromatina adosados a la cara interna de la membrana nuclear. En su citoplasma observamos abundantes cisternas de RER, ribosomas, y algunas mitocondrias esféricas.

4.2. PERIODO INFANTIL

En esta fase quedan incluidos testículos de gatos con edades comprendidas entre 1 mes y 4-5 meses. Las principales diferencias con respecto al periodo anterior son por una parte la reducción del intersticio, y por otra, la organización del parénquima testicular en lobulillos testiculares (fig. 16), mediante el desarrollo de tabiques incompletos de tejido conjuntivo que penetran desde la cápsula testicular hacia el interior del órgano.

4.2.1. CARACTERISTICAS HISTOLOGICA

4.2.1.1. SISTEMA TUBULAR

Al igual que en la fase anterior, los **túbulos seminíferos** carecen de luz, y están rodeados por una o dos capas de células peritubulares (fig. 17) de núcleo alargado, aplanado y picnótico, que poseen escaso citoplasma.

El diámetro tubular ha disminuido a 86 μm , y el elemento principal de la pared tubular sigue siendo la **célula de Sertoli** (fig. 17), que aparece en un número aproximado de 17 a 18 células por sección transversa de túbulo. Se trata de células de un tamaño algo menor, con un núcleo picnótico y de contorno algo irregular en donde se pueden reconocer de uno a tres nucleolos. El eje longitudinal del núcleo está orientado perpendicularmente con respecto a la membrana basal del túbulo, y la mayoría de estas células tienen el núcleo en posición basal.

El número de **células germinales** sigue siendo muy escaso, apareciendo cuatro o cinco por túbulo, generalmente en posición basal. Las más numerosas son las **espermatogonias tipo A** (fig. 17); las **espermatogonias fetales** (fig. 17) son más escasas incluso que en la fase anterior, y las **células en vías de degeneración** prácticamente son inexistentes. Durante este periodo, se continúan observando algunas mitosis entre las células de los túbulos.

Las características morfológicas de los **túbulos rectos y la red testicular** (fig. 18), son similares a las de la fase anterior, y de las pocas diferencias que hemos encontrado es que al existir tabiques interlobulillares, la primera parte de los los túbulos rectos se localiza en el tejido conjuntivo de los tabiques próximo al mediastino testicular.

4.2.1.2. INTERSTICIO

Durante el periodo infantil, como ya hemos comentado, el intersticio está menos desarrollado, y su principal elemento sigue siendo las **células de Leydig** que presentan algunas variaciones con respecto a la fase anterior. Hemos podido distinguir, atendiendo a su morfología, dos tipos de células de Leydig, unas de forma poligonal y otras fusiformes.

Las primeras son muy parecidas a las células de Leydig que hemos descrito en la fase anterior, y se diferencian de éstas, en que tienen un núcleo más picnótico, y el citoplasma aparece repleto de vacuolas lipídicas. Este tipo de célula también suele aparecer en grupos de 4 a 6 elementos entre los túbulos, y en grupos de 8-12 células localizadas justo debajo de la túnica albugínea o en la periferia de los lobulillos testiculares; cada una de estas agrupaciones queda rodeada por una membrana basal discontinua pero marcadamente PAS positiva y que también se tiñe con la técnica de plata-metenamina, apareciendo siempre próximas a pequeños vasos sanguíneos; consideramos que estas son **células de Leydig fetales en vías de degeneración** (fi. 19).

El otro tipo de célula intersticial se corresponde con elementos alargados con un núcleo fusiforme. Son más numerosas en los espacios que quedan entre los túbulos seminíferos y los grupos de células de Leydig descritos; a estas células las identificamos como **células de Leydig infantiles** (fig. 19).

Al igual que en la fase anterior, a nivel del intersticio, hemos observado algunas mitosis. Entre los grupos de células de Leydig se observan fibras de colágeno que son más abundante en el mediastino testicular, donde también se aprecia la presencia de numerosos vasos de pequeño calibre.

4.2.1.3. CAPSULA TESTICULAR

En este periodo infantil, la cápsula presenta escasas diferencias histológicas con respecto a la fase anterior. Rodeando externamente la cápsula aparece una capa de células mesoteliales, la mayoría de núcleo aplanado. Debajo seguimos observando un tejido conjuntivo más laxo, con fibroblastos de forma entre ovoidea y estrellada, y una zona interna integrada por un tejido conjuntivo más denso donde existen numerosos vasos de mediano y pequeño calibre.

En esta fase se puede apreciar cómo la cápsula emite **tabiques** incompletos de tejido conjuntivo denso hacia el interior del parénquima testicular, quedando así dividido éste en **lobulillos testiculares** (fig. 16). Por estos tabiques discurren vasos de pequeño calibre; esta compartimentación testicular en lobulillos es una característica estructural típica del periodo infantil, tal y como se indica en el inicio de este apartado.

El tejido conjuntivo de los tabiques confluye en el mediastino testicular.

4.2.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO

4.2.2.1. SISTEMA TUBULAR

En esta fase infantil, la positividad varía algo con respecto a la fase anterior, y así hemos encontrado una inversión de los resultados con respecto a la vimentina que presenta una positividad media en las células de Sertoli, localizada principalmente en posición perinuclear, y en zonas periféricas del citoplasma.

Frente a las citoqueratinas de amplio espectro, seguimos encontrando una inmunorreactividad evidente, pero mayor que en la fase anterior, en el polo apical de las células epiteliales de los túbulos rectos y red testicular, y los resultados hallados frente a la vimentina son similares a los obtenidos en la fase perinatal, es decir hemos detectado una positividad media a este nivel.

También hemos observado que aparece una reacción positiva, aunque mayor que en el periodo anterior, frente al colágeno tipo IV (fig. 20) y laminina (fig. 21) en la membrana basal de los túbulos seminíferos, y algo más intensa en la de los túbulos rectos y la red testicular.

4.2.2.2. INTERSTICIO

Entre las células de Leydig, la positividad frente a la testosterona también varía algo con respecto a la fase anterior, y así encontramos que el número de células positivas a la testosterona ha descendido notablemente entre las células de Leydig, centrándose sólo en algunas de forma poligonal, con lo que se pone en evidencia la baja actividad secretora de estas células durante esta etapa.

Con respecto a la vimentina la reacción de las células de Leydig es muy débil, casi nula, existiendo una positividad muy clara en los fibroblastos del intersticio y en la pared de los vasos en localización subendotelial.

La membrana basal ya descrita a nivel histológico alrededor de las células de Leydig, presenta una reacción discontinua frente al colágeno tipo IV y a laminina (fig. 22).

4.2.2.3. CAPSULA TESTICULAR

No encontramos ninguna variación digna de ser reseñada, en cuanto al estudio inmunohistoquímico de los diversos elementos que integran la cápsula, con respecto al periodo anterior.

4.2.3. CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES

4.2.3.1. SISTEMA TUBULAR

Durante esta fase infantil, las **células de Sertoli** (fig. 23) se caracterizan por tener un núcleo de forma más alargada, de contorno algo irregular que presenta una pequeña escotadura. En su interior hemos observado de uno a tres pequeños nucleolos y finos gránulos de heterocromatina dispersos por el nucleoplasma y más concentrados en la periferia, donde aparecen formando una estrecha banda adosada a la cara interna de la membrana nuclear.

En el citoplasma encontramos abundantes cisternas de RER, mitocondrias de forma alargada con cresta transversales y matriz densa, numerosos ribosomas libres o agrupados, y un centriolo en posición supranuclear. Entre las células de Sertoli vecinas a nivel de la membrana de la superficie lateral, hemos observado interdigitaciones.

Las **espermatogonias tipo A** no presentan diferencias ultraestructurales con respecto a la fase anterior, los núcleos tienen las mismas características y en el citoplasma se sigue observando escasas organelas; las **espermatogonias fetales** (fig. 24) se aprecian en número muy escaso, y sus características ultraestructurales son similares a las descritas en la fase perinatal.

Las **células peritubulares** que aparecen alrededor de los túbulos seminíferos en una o dos capas, presentan el núcleo más alargado y heterocromático debido a la presencia de numerosos gránulos de cromatina dispersos por el nucleoplasma, y tienen un citoplasma muy escaso y pobre en organelas. Entre estas células y los túbulos seminíferos se observa una membrana basal de estructura simple.

Las **células epiteliales** que conforman los **túbulos rectos y la red testicular** presentan las mismas características ultraestructurales a las descrita en el periodo anterior.

4.2.3.2. INTERSTICIO

Las **células de Leydig fetales en vías de degeneración** (fig. 25) poseen un núcleo redondo de contorno más irregular, que presentan abundantes grumos de heterocromatina distribuidos por el nucleoplasma, aunque aparecen más concentrados en la cara interna de la membrana nuclear y a veces asociados al nucleolo que es esférico y central. El citoplasma presenta mitocondrias pleomórficas con crestas tubulares y una matriz electrodensa, abundantes vesículas de REL muchas de las cuales aparecen totalmente dilatadas, numerosas gotas lipídicas, figuras de mielina, ribosomas y abundantes lisosomas. Alrededor de estos grupos de células se sigue observando una membrana basal muy evidente pero discontinua (fig. 25).

Las **células de Leydig infantiles** poseen un núcleo ovoidal y de contorno más irregular, que presenta escasa cantidad de heterocromatina. En su citoplasma encontramos vesículas de REL, mitocondrias de crestas tubulares, escasas cisternas de RER, algunas vacuolas de grasa y lisosomas.

Entre ambos tipos de células de Leydig hemos encontrado haces de fibras de colágeno orientados al azar.

4.2.3.3. CAPSULA TESTICULAR

Las únicas diferencias ultraestructurales que encontramos con respecto al periodo perinatal, es que se observa cómo la cápsula emite tabiques de tejido conjuntivo integrado por haces de fibras de colágeno densamente empaquetados, y la mayoría orientados perpendicularmente con respecto a la cápsula.

A este nivel, encontramos algunos fibroblastos pequeños y alargados que ultraestructuralmente se caracterizan por tener un núcleo muy heterocromático con una gruesa banda de cromatina adosada a la membrana nuclear, y escaso citoplasma ocupado principalmente por RER.

4.3. FASE PUBERAL

En este periodo incluimos testículos de gato con edades comprendidas entre 4-4,5 y 6-7 meses.

El parénquima testicular, al igual que en la fase anterior, aparece dividido en lobulillos testiculares incompletos y la principal característica de este periodo es que el desarrollo testicular no es uniforme (fig. 26).

4.3.1. CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS

4.3.1.1. SISTEMA TUBULAR

Como ya hemos señalado, el desarrollo de los **túbulos seminíferos** no es uniforme (fig. 26), y así encontramos zonas del parénquima donde los túbulos aún carecen de luz (estas zonas predominan en los animales más jóvenes del grupo) junto a zonas donde los túbulos tienen luz y presentan cierta estratificación del epitelio germinal (éstas predominan en los animales de mayor edad).

Los túbulos que carecen de luz tienen una estructura muy similar a los de la fase anterior: aparecen numerosas células de Sertoli inmaduras y cuatro o cinco espermatogonias en posición basal.

Los túbulos que presentan luz (fig. 27) tienen un diámetro tubular mayor, con un valor aproximado de 105 μm , y el número de **células de Sertoli** ha descendido a 10-13 células por túbulo, caracterizándose por tener mayor tamaño y poseer un núcleo alargado o piriforme en posición basal, de contorno irregular con un nucleolo central y esférico.

En estos túbulos encontramos diversos tipos de células pertenecientes a la línea germinal que se disponen de manera estratificada, ocupando las espermatogonias posiciones más basales, y los espermatocitos primarios y secundarios y las espermatidas posiciones más centrales en el túbulo (fig. 29).

Entre las espermatogonias seguimos diferenciando varios tipos: las **espermatogonias fetales** que aparecen cada vez de manera más esporádica en algunos

túbulos; los dos tipos de **espermatogonias tipo A** (fig. 27), con el núcleo localizado cerca de la membrana basal, esférico u ovoide; un tercer tipo de espermatogonia que aparece por primera vez son las **espermatogonias tipo B** (fig. 27), las cuales son de tamaño parecido a las anteriores y su principal diferencia estriba en el núcleo que es redondo, con un nucleolo esférico y central muy evidente y contiene gruesos grumos de cromatina distribuidos por todo el nucleoplasma. Estas células suelen localizarse en posiciones algo más alejadas de la membrana basal de los túbulos seminíferos.

Los espermatocitos primarios (fig. 27) son muy numerosos, y aunque la mayoría suelen ocupar zonas más centrales del túbulo, hemos observado algunos muy próximos a la membrana basal. En general se trata de células grandes y redondas con un núcleo amplio y esférico, cuya cromatina se encuentra organizada dependiendo de la fase de división meiótica en la que se encuentre, y así podemos encontrar espermatocitos en estadio leptoténico, zigoténico, paquiténico y diploténico.

Los espermatocitos secundarios son muy difíciles de observar ya que aparecen en escaso número. Son células más pequeñas, y tienen un núcleo pequeño, esférico y picnótico.

Las espermátidas redondas aparecen en un número escaso y sólo en algunos túbulos de los testículos pertenecientes a los animales de más edad de este periodo. Son células de menor tamaño, de forma redondeada, con un núcleo esférico que contiene finos gránulos de cromatina. Suelen verse varias células iguales asociadas ocupando las zonas más centrales del túbulo.

En ocasiones, en el centro de los túbulos hemos apreciado grupos de espermátidas desprendidas con marcados signos de degeneración.

Alrededor de los túbulos seminíferos, la membrana basal es muy evidente con la técnica del PAS (fig. 27) y a la de plata-metenamina, e inmediatamente por debajo de ésta se observa una fina capa de células peritubulares (fig. 27), de núcleo pequeño, alargado y picnótico.

En el tejido conjuntivo de los tabiques interlobulillares próximos al mediastino testicular, encontramos la **parte terminal de los túbulos seminíferos** (fig. 28) y primera parte de los túbulos rectos. A este nivel los túbulos seminíferos sufren un

estrechamiento y están integrados sólo por células de Sertoli. Se continúan con un segmento que no presenta luz y donde existen varias capas de células de Sertoli, que hace protusión hacia el interior de la parte inicial de los túbulos rectos. La pared de los **túbulos rectos** (fig. 28) está tapizada por un epitelio cilíndrico bajo o cúbico simple.

La **red testicular mediastínica** (fig. 28) presenta algunas diferencias con respecto al periodo anterior: está integrada por canales más amplios intercomunicados entre sí, en cuyas luces se pueden observar algunas células germinales degeneradas. El epitelio de la red testicular aparece integrado por células cúbicas casi planas que presentan un núcleo esférico u ovoideo, picnótico, en el que a veces se puede distinguir más de un nucleolo; el citoplasma es escaso y en la superficie apical aparecen cortas y escasas microvellosidades.

La red testicular mediastínica se continua con la **red testicular albugínea** integrada también por canales de amplias luces revestidas por un epitelio cúbico bajo.

4.3.1.2. INTERSTICIO

Durante este periodo el intersticio sigue siendo escaso, apareciendo dos tipos de células de Leydig. Al igual que en el periodo anterior las más numerosas son las células de Leydig de forma poligonal, que a diferencia de las descritas en el periodo infantil, presentan un núcleo eucromático, y consideramos que se trata ya de **células de Leydig adultas** (fig. 29); su organización sigue siendo en grupos con características muy similares y su principal diferencia es que la membrana basal descrita en fases anteriores es poco evidente

El número de **células de Leydig infantiles** se ha reducido drásticamente, y se localizan en los espacios que quedan entre los túbulos seminíferos y los grupos de células de Leydig adultas.

4.3.1.3. CAPSULA TESTICULAR

La estructura histológica de la cápsula testicular es similar a la descrita en el periodo anterior, aunque no existe una diferencia tan marcada entre la zona externa y la interna. En ambas predomina un tejido conjuntivo denso con fibroblastos más

Resultados

pequeños, de núcleos picnóticos, y siguen apareciendo numerosos vasos sanguíneos localizados principalmente más en la zona interna. Rodeando toda la cápsula encontramos una capa de células mesoteliales de núcleos aplanados (fig. 29).

Los **tabiques** que emite la cápsula hacia el interior del parénquima son más finos que los observados en fases anteriores y utilizando técnicas de plata podemos evidenciarlos como estrechas bandas de tejido conjuntivo denso rodeando a los lobulillos testiculares.

4.3.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO

4.3.2.1. SISTEMA TUBULAR

Durante la fase puberal en el estudio inmunohistoquímico realizado para detectar filamentos intermedios, tenemos que destacar, al igual que en la fase anterior, la positividad que presentan las células de Sertoli frente al suero anti-vimentina (fig. 30), localizándose principalmente en la parte basal de la célula y alrededor del núcleo.

Por primera vez a lo largo de nuestro estudio hemos detectado discreta reacción en las células peritubulares mioides, frente a la desmina y a la vimentina (fig. 30).

Con el suero anti-citoqueratinas se observa inmunotinción en la parte apical de las células epiteliales de los túbulos rectos (fig. 31) y de la red testicular, que a diferencia de fases anteriores es más intensa, y cuando se ha empleado como antisuero primario la vimentina hemos detectado una inmunotinción fuerte que se distribuye de manera homogénea en el citoplasma de las células de ambas estructuras.

Frente al colágeno tipo IV y frente a laminina hemos detectado una inmunotinción media en la membrana basal de los túbulos seminíferos, túbulos rectos y red testicular.

4.3.2.2. INTERSTICIO

Tenemos que destacar el aumento que se produce en el número de células positivas frente al suero anti-testosterona en comparación con la fase anterior, y esta positividad aparece localizada en la mayoría de las células de Leydig poligonales.

También observamos inmunorreacción escasa frente al suero anti-vimentina, alrededor del núcleo de las células de Leydig (fig. 32), y en cuanto a la reacción frente al colágeno tipo IV y a laminina detectada en la membrana basal de alrededor de los grupos celulares, es muy débil y discontinua.

4.3.2.3. CAPSULA TESTICULAR

A este nivel sólo cabe destacar la reacción que han presentado los fibroblastos y las células endoteliales de los vasos frente a la vimentina (fig. 32). En este periodo se ha observado por primera vez positividad en las células musculares lisas frente a la desmina, comprobándose que aparecen en un número muy escaso en la cápsula.

4.3.3. CARACTERISTICAS ULTRAESTRUCTURALES

4.3.3.1 SISTEMA TUBULAR

En esta fase puberal las **células de Sertoli** (fig. 33), localizadas en aquellos túbulos seminíferos que presentan luz, muestran ya las características típicas de la célula adulta. El núcleo, que aparece próximo a la membrana basal, es de forma triangular siendo su eje longitudinal perpendicular a dicha estructura, tiene un contorno muy irregular y una escotadura muy marcada; presenta además un nucleolo muy evidente y finos gránulos de cromatina distribuidos por el nucleoplasma.

El citoplasma, que se extiende desde la base hasta la luz tubular, es de contorno muy irregular quedando englobadas entre sus prolongaciones la mayoría de las células de la línea germinal. En él observamos mitocondrias pequeñas y esféricas con crestas transversales y matriz electrodensa, RE tanto liso como rugoso, aparato de Golgi en posición yuxtannuclear, ribosomas, polirribosomas y pequeñas gotas lipídicas. A nivel de la superficie lateral y en localización basal, observamos estrechos complejos de unión entre células de Sertoli vecinas, apreciándose también acúmulos de REL a ambos lados de estos complejos: estas estructuras son componentes esenciales de la **barrera hematotesticular**, que por lo tanto, queda establecida en la fase puberal.

Como ya hemos descrito histológicamente durante esta fase aparecen nuevos tipos de células germinales: espermatogonias tipo B, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios y espermátidas redondas.

Las espermatogonias tipo B, que quedan situadas por debajo de la barrera hematotesticular, se caracterizan por tener un núcleo esférico y heterocromático, con un nucleolo muy evidente y gruesos grumos de heterocromatina dispersos por todo el nucleoplasma. En su citoplasma hemos observado algunas mitocondrias pleomórficas, cisternas de RER, un pequeño aparato de Golgi y numerosos ribosomas. Estas células suelen encontrarse algo alejadas de la base del túbulo seminífero.

De los **espermátocitos primarios** quedan localizados por debajo de los complejos de unión que integran la barrera hematotesticular, sólo aquellos que están

en fase de preleptotene, situándose el resto (fig. 33) por encima de la barrera hematotesticular, en el compartimiento adluminal del túbulo.

Presentan un núcleo grande y esférico, con la cromatina organizada dependiendo del estado de la profase meiótica en el que se encuentren. En el citoplasma de estas células aparece un aparato de Golgi desarrollado, pequeñas mitocondrias esféricas, RE liso y rugoso y ribosomas.

Los espermátocitos secundarios son muy difíciles de observar y se localizan también en el compartimiento adluminal. Su citoplasma se caracteriza por la abundancia de RER. El núcleo es más pequeño y heterocromático y aparece cubierto por gruesos grumos de cromatina interconectados por filamentos.

Durante esta fase hemos encontrado en algunos túbulos **espermátidas redondas** que ocupan las zonas más próximas a la luz tubular, y que ultraestructuralmente se caracterizan por tener un núcleo esférico y en posición central. La cromatina puede aparecer en finos gránulos o formando grumos más densos que enmascaran el nucleolo. En el citoplasma de estas células observamos abundantes cisternas de REL, escaso RER, ribosomas, escasas mitocondrias pequeñas y esféricas y un pequeño aparato de Golgi en posición yuxtannuclear. Entre las espermátidas observamos como se establecen puentes intracitoplasmáticos.

Como ya hemos descrito histológicamente, el epitelio de los **túbulos rectos** (fig. 34) es cilíndrico bajo o cúbico, y ultraestructuralmente se caracteriza por poseer un núcleo con una banda de heterocromatina adosada en la cara interna de la membrana nuclear, y un nucleolo muy evidente. En su citoplasma destacamos la presencia de mitocondrias, RER, complejo de Golgi y abundantes ribosomas. En la superficie apical de la célula encontramos algunas microvellosidades.

Las células que tapizan la pared de la **red testicular** presentan un núcleo redondo a veces casi plano y heterocromático, y en su citoplasma observamos mitocondrias, RER y algo de REL.

4.3.3.2. INTERSTICIO

Las **células de Leydig adultas** (fig. 35), que son los elementos principales del intersticio durante esta fase, se caracterizan por tener el núcleo localizado excéntricamente, esférico y eucromático, con un nucleolo central y una fina capa de heterocromatina adosada a la membrana nuclear. En el citoplasma de estas células encontramos numerosas mitocondrias esféricas de crestas tubulares, un REL muy desarrollado y distribuido por todo el citoplasma, numerosas gotas de grasa, lisosomas, figuras de mielina, escasas cisternas de RER y ribosomas. Dentro de los grupos de células de Leydig y entre células vecinas, observamos que existe muy poca separación entre las membranas citoplasmáticas y en algunos puntos existen complejos de unión. La membrana basal tan visible en fases anteriores, es poco evidente en este periodo puberal.

Como ya hemos descrito histológicamente, las células de **Leydig infantiles** son muy escasas durante esta fase y ultraestructuralmente presentan las mismas características enumeradas en el periodo anterior.

4.3.3.4. CAPSULA TESTICULAR

Durante este periodo a nivel de la cápsula no existe diferencia entre la zona interna y la zona externa, predominando en general un tejido conjuntivo denso integrado por numerosos haces de fibras de colágena, la mayoría orientados longitudinalmente alrededor del testículo y fibroblastos fusiformes, que se caracterizan por presentar un núcleo alargado y con abundante heterocromatina más concentrada en la cara interna de la membrana nuclear. El citoplasma, que presenta prolongaciones largas, posee abundante RER, pequeñas mitocondrias y numerosos ribosomas libres.

4.4. FASE ADULTA

4.4.1. CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS

4.1.1.1. SISTEMA TUBULAR

La principal característica morfológica de esta fase es que todos los **túbulos seminíferos** presentan amplias luces y la espermatogénesis está totalmente establecida (fig. 36).

El número de células de Sertoli por sección transversa de túbulo ha descendido a 8-10 células, mientras que el diámetro tubular ha sufrido un notable aumento hasta un valor aproximado de 220 μm , como consecuencia del incremento que se produce en el número de células germinales.

Las **células de Sertoli** se caracterizan por su núcleo de forma triangular, y contorno algo irregular, que se localiza muy próximo a la membrana basal y presenta un pequeño nucleolo; sus prolongaciones citoplasmáticas se extienden entre las células de la línea germinal y llegan hasta la luz del túbulo seminífero.

Entre las células del túbulo seminífero, podemos diferenciar todos los **elementos pertenecientes a la línea germinal**: espermatogonias tipo A, espermatogonias tipo B, espermatocitos primarios en distintas fases de división meiótica, espermatocitos secundarios, espermátidas redondas, espermátidas alargadas y espermatozoides desprendidos en la luz tubular.

Observando túbulos seminíferos en distintos cortes histológicos, podemos comprobar como éstos varían de aspecto a causa de las diferentes asociaciones celulares que contienen. Para el estudio de las **asociaciones celulares**, hemos empleado los criterios utilizados por Clermont (1963) y Swierstra (1968), basados en la morfología de las células germinales y la localización de éstas dentro del túbulo, y así hemos dividido el ciclo del epitelio seminífero del testículo de gato en ocho estadios o asociaciones que a continuación pasamos a describir:

. **Estadio I:** los túbulos que presentan dicha asociación se caracterizan porque tienen células de Sertoli, espermatogonias tipo A y espermatocitos primarios en leptotene en la zona más basal del túbulo; en las capas más centrales aparecen espermatocitos en paquitene y espermátidas redondas (fig. 36).

. **Estadio II:** se caracteriza porque en la capa más basal del túbulo aparecen células de Sertoli y espermatogonias tipo A; en estratos superiores encontramos espermatocitos en zigotene y/o paquitene y espermátidas más pequeñas que las de la asociación anterior que comienzan a alargarse (fig. 37).

. **Estadio III:** encontramos células de Sertoli y espermatogonias tipo A en contacto con la membrana basal del túbulo; en las zonas más cercanas a la luz tubular espermatocitos en zigotene y en diplotene y espermátidas alargadas (fig. 38).

. **Estadio IV:** esta asociación se caracteriza porque presenta basalmente células de Sertoli y espermatogonias tipo A; en las capas superiores del túbulo aparecen espermatocitos en zigotene, células en división y espermátidas alargadas (fig. 39).

. **Estadio V:** en él observamos células de Sertoli y espermatogonias tipo A basalmente; en las capas centrales del túbulo encontramos espermatocitos en zigotene, espermátidas alargadas y espermátidas redondas (fig. 40).

. **Estadio VI:** en contacto con la luz tubular encontramos dos generaciones de espermátidas, redondas y alargadas. Asociadas a estas células encontramos espermatocitos en paquitene y en contacto con la membrana basal del túbulo aparecen células de Sertoli, espermatogonias tipo A y espermatocitos en leptotene (fig. 41).

. **Estadio VII:** se caracteriza por la presencia de espermatogonias tipo B junto con espermatogonias tipo A y células de Sertoli basalmente; en estratos superiores se observan espermatocitos en paquitene, espermátidas redondas y alargadas (fig. 42).

. **Estadio VIII:** presenta en contacto con la membrana basal células de Sertoli, espermatogonias tipo A y espermatogonias tipo B; en capas superiores existen espermatocitos en diaquinesis y espermatidas redondas y alargadas (fig. 43).

Hemos observado que algunas asociaciones celulares ocupan pequeños segmentos del túbulo, con lo que en la mayoría de las secciones transversas de los túbulos seminíferos pueden aparecer más de una asociación.

En este periodo, en los **segmentos terminales de los túbulos seminíferos**, observamos tres zonas bien definidas: una primera región de transición, donde existe una pérdida gradual de los elementos germinales; a continuación aparece una región intermedia que presenta luz, e integrada por células de Sertoli dispuestas en una sola capa, y por último un tercer segmento (fig. 48 y 49) integrado por varias capas de células de Sertoli, que no presenta luz, y que se introduce en el interior de la parte inicial de los túbulos rectos.

Los **túbulos rectos** (fig. 48 y 49) presentan un epitelio cúbico, y se continúan con la **red testicular albugínea y mediastínica** (fig. 49) que al igual que en el periodo anterior está muy desarrollada, apareciendo como grandes canales recubiertos por un epitelio cúbico simple casi plano en algunas zonas; en la luz de éstos, aparecen espermatozoides.

4.4.1.2. INTERSTICIO

El intersticio está algo más desarrollado con respecto al periodo anterior, y está integrado principalmente por **células de Leydig** poligonales con núcleos esféricos y excéntricos, y cuya organización es muy similar a la que aparece en fases anteriores: grupos pequeños de forma triangular, integrados por 4 a 10 células localizados en los espacios intertubulares (fig. 50), grupos alargados de 8 a 10 células situados debajo de la túnica albugínea y grupos de forma más irregular integrados hasta por 12 células localizados en las cercanías del mediastino testicular.

Todas estas agrupaciones aparecen en estrecha relación con numerosos capilares y pequeños vasos sanguíneos, y la membrana basal que aparece en otras fases, ya no es tan evidente.

4.4.1.3. CAPSULA TESTICULAR

Presenta las mismas características histológicas que la fase anterior: está integrada por un tejido conjuntivo denso con numerosos vasos sanguíneos en la zona interna de la cápsula.

Los tabiques que emite la cápsula hacia el interior del parénquima, como ya hemos descrito para el periodo puberal, están integrados por finos septos de tejido conjuntivo denso, que confluyen a nivel del mediastino testicular.

4.4.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO

4.4.2.1. SISTEMA TUBULAR

En esta fase adulta el estudio inmunohistoquímico utilizando como antisuero primario la vimentina muestra unos resultados análogos a los descritos en el periodo puberal presentando una fuerte inmunorreacción en las células de Sertoli (fig. 44) y una reacción débil en las células mioides peritubulares (fig. 44). En cuanto a la desmina se expresa, pero de manera muy discreta, en las células mioides peritubulares (fig. 45).

Con respecto a laminina (fig. 46) y al colágeno tipo IV (fig. 47), como ya hemos visto en la fase anterior, existe una reacción media en la membrana basal de los túbulos seminíferos, túbulos rectos y red testicular.

Por último, el estudio inmunohistoquímico de los túbulos rectos y red testicular con citoqueratinas de amplio espectro (fig. 48), revela una positividad muy intensa en las células epiteliales de estas estructuras y frente a la vimentina muestra también una reacción fuerte en el citoplasma de dichas células (fig. 49).

4.4.2.2. INTERSTICIO

Durante este periodo la mayoría de las células de Leydig presentan una fuerte inmunorreacción frente al suero primario anti-testosterona (fig. 50) y una positividad media frente al suero anti-vimentina (fig. 49).

Por otra parte hemos encontrado que tanto la laminina y el colágeno tipo IV se expresan de manera muy débil alrededor de los grupos de células de Leydig.

4.4.2.3. CAPSULA TESTICULAR

Los resultados inmunohistoquímicos son similares a los descritos en el periodo anterior. Lo único destacable es la presencia de un escaso número de células de naturaleza muscular positivas al suero anti-desmina y distribuidas de manera dispersa por la cápsula. Como ya hemos comentado, estos elementos sólo los hemos observado en la fase puberal y en la adulta.

4.4.3. CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES

4.4.3.1. SISTEMA TUBULAR

Como ya hemos observado histológicamente, la principal característica de este periodo es la presencia en los túbulos seminíferos de todos los elementos de la línea germinal: espermatogonias tipo A, espermatogonias tipo B, espermatocitos primarios y secundarios, espermátidas redondas y alargadas y espermatozoides desprendidos en la luz tubular.

Las **células de Sertoli** (fig. 51) presentan desde el periodo anterior las características propias de una célula adulta: son células alargadas y de forma irregular que se extienden desde la membrana basal hasta la luz tubular, cuyas extensiones citoplasmáticas envuelven a los diferentes elementos de desarrollo de las células germinales. Su núcleo es triangular, de contorno irregular con una profunda escotadura en la membrana nuclear, escasos grumos de heterocromatina más concentrado en la cara interna de la carioteca y un nucleolo muy evidente.

En su citoplasma aparecen numerosas mitocondrias esféricas de pequeño tamaño, un aparato de Golgi localizado en posición yuxtannuclear, REL y RER, ribosomas, lisosomas y pequeñas vacuolas lipídicas. Alrededor del núcleo hemos observado finos filamentos orientados al azar. En esta fase, al igual que en la puberal, aparecen muy desarrollados los complejos de unión entre las células de Sertoli vecinas localizándose principalmente en la zona basal; como ya hemos visto en la fase anterior, éstos son componentes esenciales de la barrera hematotesticular. En las zonas citoplasmáticas adyacentes a las zonas de contacto con las espermátidas también aparecen acúmulos de REL.

Dentro de las células pertenecientes a la línea germinal, la mayoría las hemos descrito ya en la fase puberal por lo que ahora pasamos a describir las características ultraestructurales de las **espermátidas alargadas** (fig. 52) sólo presentes en los túbulos seminíferos de los animales adultos.

En el núcleo de estas células observamos gránulos de cromatina de mayor tamaño y densidad en comparación con las espermatidas de núcleo redondo. En uno de los polos nucleares encontramos la vesícula acrosómica, que está en estrecha relación con el aparato de Golgi. En las espermatidas más maduras se aprecia como la membrana limitante de esta vesícula, se extiende por la cara externa de la membrana nuclear para formar el capuchón cefálico. En el polo opuesto nuclear se observa los centriolos, uno de los cuales originará un pequeño flagelo; el citoplasma, que queda muy reducido de tamaño, aparece rodeando la parte proximal del flagelo y está ocupado principalmente por mitocondrias.

El resto de las estructuras integrantes del sistema tubular no presenta ninguna diferencia con respecto a la fase puberal.

4.4.3.2. INTERSTICIO

Los elementos principales que integran el intersticio son las **células de Leydig adultas** (fig. 53) que presentan las mismas características ultraestructurales a las descritas en la fase anterior.

4.4.3.3. CAPSULA TESTICULAR

Las características ultraestructurales son similares a las de la fase puberal. Está integrada por un tejido conjuntivo denso, con numerosos haces de fibras de colágena la mayoría orientados longitudinalmente alrededor de la cápsula. Los fibroblastos son fusiformes y tiene un núcleo alargado y muy heterocromático. En su citoplasma destaca la presencia de abundante RER y ribosomas, y algunas mitocondrias de pequeño tamaño.

4.5. TABLAS

TABLA 4.5.1: modificación del diámetro tubular y n^o de células de Sertoli por sección transversa de tubulo seminífero en las diversas fases del desarrollo testicular.

	Fase perinatal	Fase infantil	Fase puberal	Fase adulta
Diámetro tubular(μm)	89	86	105	220
N ^o C.Sertoli sección tub.	25	17-18	13	9

TABLA 4.5.2: resultados inmunohistoquímicos frente al filamento intermedio **vimentina** en las diversas fases evolutivas del testículo.

	Fase perinatal	Fase infantil	Fase puberal	Fase adulta
C.Sertoli	-	++	++	+++
C.Germinal	-	-	-	-
C.Leydig	+++	+	+	++
C. mioide	-	-	+	+
T. Rectos	++	++	+++	+++
R. Testicular	++	++	+++	+++
Cápsula	(+)	(+)	++	++

- : reacción negativa

(+): células positivas aisladas

+ : reacción positiva débil

++ : reacción positiva media

+++ : reacción positiva fuerte

TABLA 4.5.3: resultados inmunohistoquímicos frente al filamento intermedio desmina en las diversas fases evolutivas del testículo.

	Fase perinatal	Fase infantil	Fase puberal	Fase adulta
C.Sertoli	-	-	-	-
C.Germinal	-	-	-	-
C.Leydig	-	-	-	-
C. mioide	-	-	+	+
T. Rectos	-	-	-	-
R. Testicular	-	-	-	-
Cápsula	-	-	(+)	(+)

- : reacción negativa

(+): células positivas aisladas

+ : reacción positiva débil

++ : reacción positiva media

+++ : reacción positiva fuerte

TABLA 4.5.4: resultados inmunohistoquímicos frente al filamento intermedio citoqueratinas de amplio espectro en las diversas fases evolutivas del testículo.

	Fase perinatal	Fase infantil	Fase puberal	Fase adulta
C.Sertoli	-	-	-	-
C.Germinal	-	-	-	-
C.Leydig	-	-	-	-
C.mioide	-	-	-	-
T. Rectos	++	++	+++	+++
R. Testicular	++	+++	+++	+++
Cápsula	-	-	-	-

- : reacción negativa

(+): células positivas aisladas

+ : reacción positiva débil

++ : reacción positiva media

+++ : reacción positiva fuerte

TABLA 4.5.5: resultados inmunohistoquímicos frente a **laminina** en las diversas fases evolutivas del testículo.

	Fase perinatal	Fase infantil	Fase puberal	Fase adulta
M.basal T.seminífero	++	+++	++	++
M.basal C.Leydig	++	++	(+)	(+)
M.basal T.Rectos	+++	+++	++	++
M.basal Red T.	+++	+++	++	++

TABLA 4.5.6: resultados inmunohistoquímicos frente al **colágeno IV** en las diversas fases evolutivas del testículo.

	Fase perinatal	Fase infantil	Fase puberal	Fase adulta
M.basal T.seminífero	++	+++	++	++
M.basal C.Leydig	++	++	(+)	(+)
M.basal T.Rectos	++	+++	++	++
M.basal Red T.	++	+++	++	++

- : reacción negativa

(+) : reacción positiva débil y no continúa

++ : reacción positiva media

+++ : reacción positiva fuerte

TABLA 4.5.7: resultados inmunohistoquímicos frente a la testosterona en las diversas fases evolutivas del testículo.

	Fase perinatal	Fase infantil	Fase puberal	Fase adulta
C.Sertoli	-	-	-	-
C.Germinal	-	-	-	-
C.Leydig	++	-	++	+++
T.Rectos	-	-	-	-
Red T.	-	-	-	-

- : reacción negativa

+ : reacción positiva débil

++ : reacción positiva media

+++ : reacción positiva evidente

5. *ICONOGRAFIA*

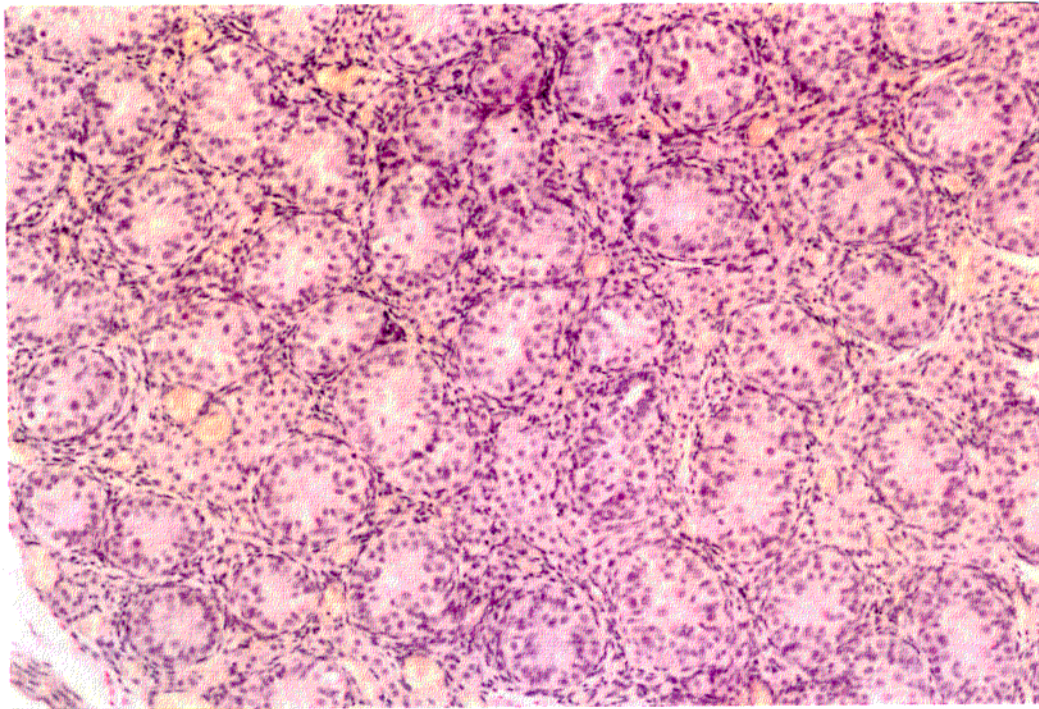


Fig. 1. Fase perinatal. Túbulos seminíferos sin luces, separados por abundante intersticio. H&E x 40.

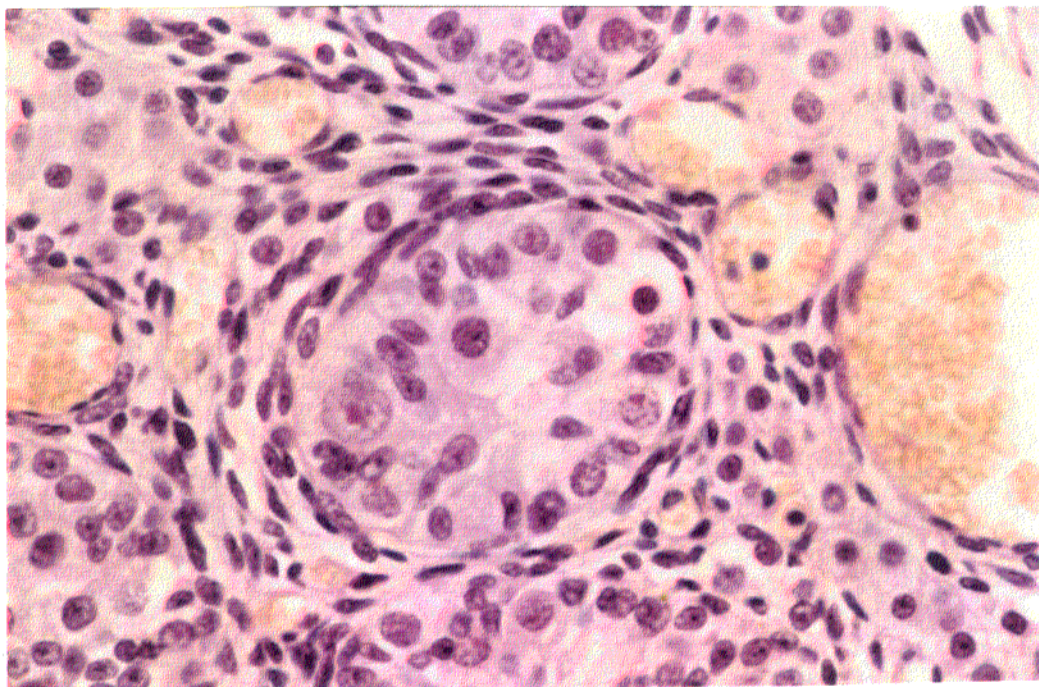


Fig. 2. Túbulo seminífero con células de Sertoli inmaduras, espermatogonias tipo A, espermatogonias fetales y alrededor células peritubulares. H&E x 160.

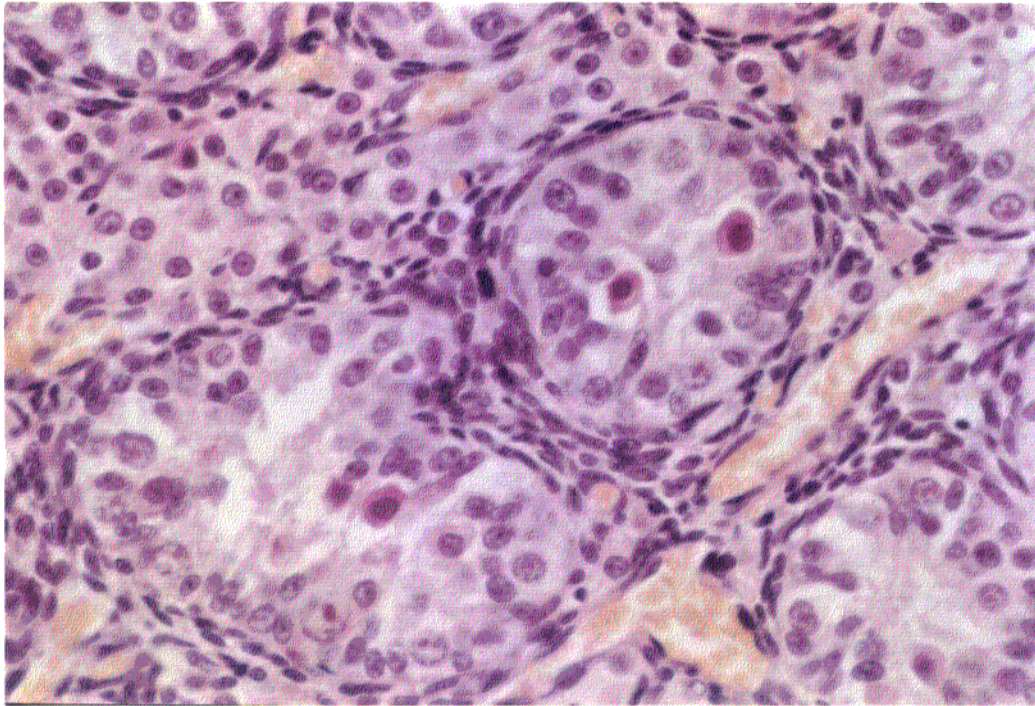


Fig. 3. Túbulo seminífero con células germinales eosinófilas en vías de degeneración, y 2 ó 3 capas concéntricas de células peritubulares. H&E x 132.

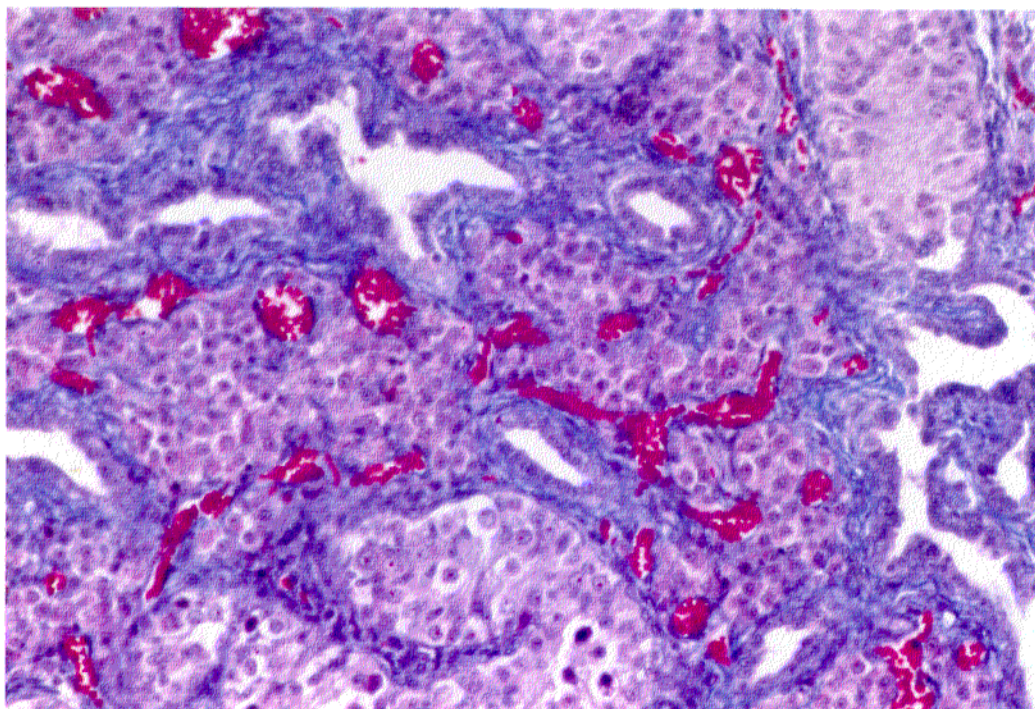


Fig. 4. Túbulos rectos y red testicular mediastínica. Grupos de células de Leydig en el mediastino testicular. Tricrómico de Masson x 66.

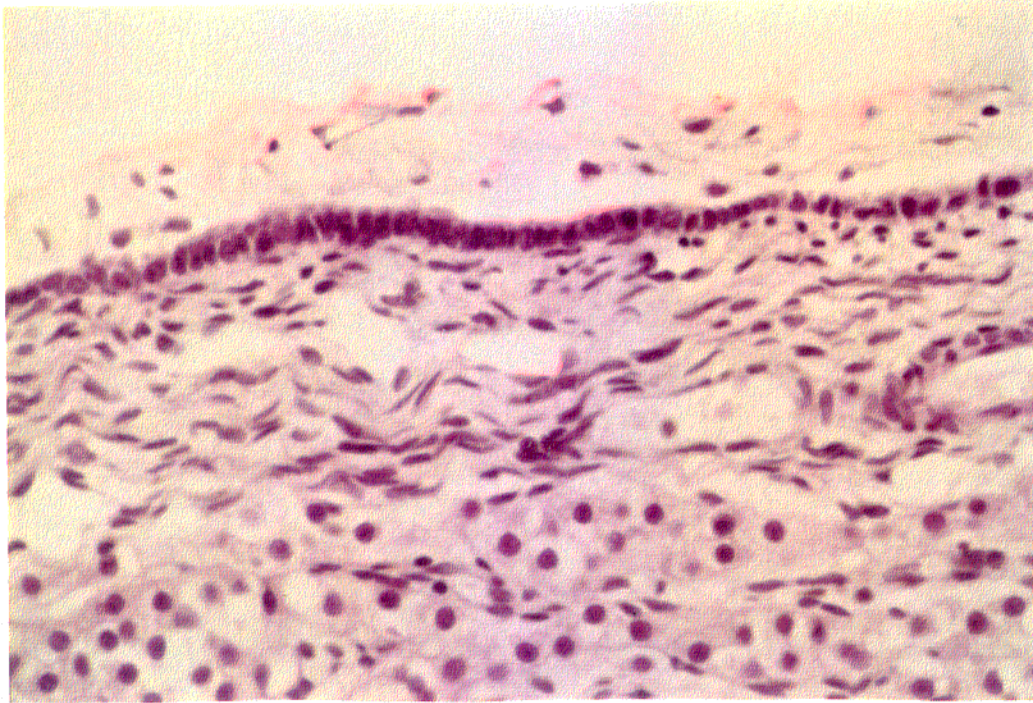


Fig. 5. Cápsula albugínea recubierta por mesotelio cúbico. Debajo grupos de células de Leydig. H&E x 132

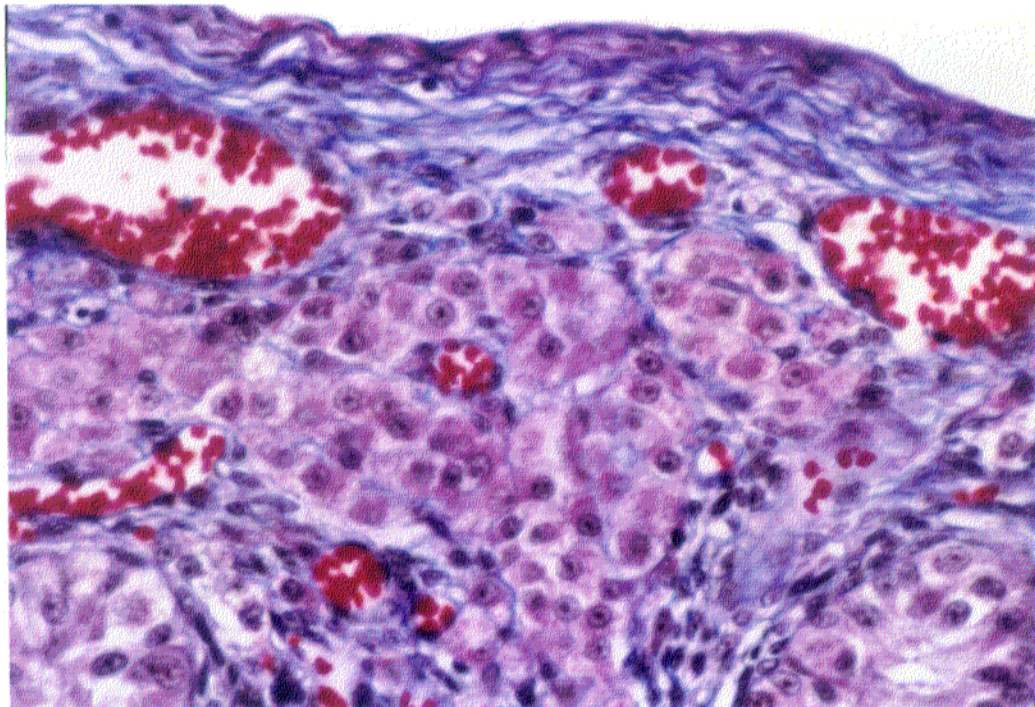


Fig. 6. Túnica vascular en cápsula albugínea y abundantes células de Leydig. Tricrómico de Masson x 132.

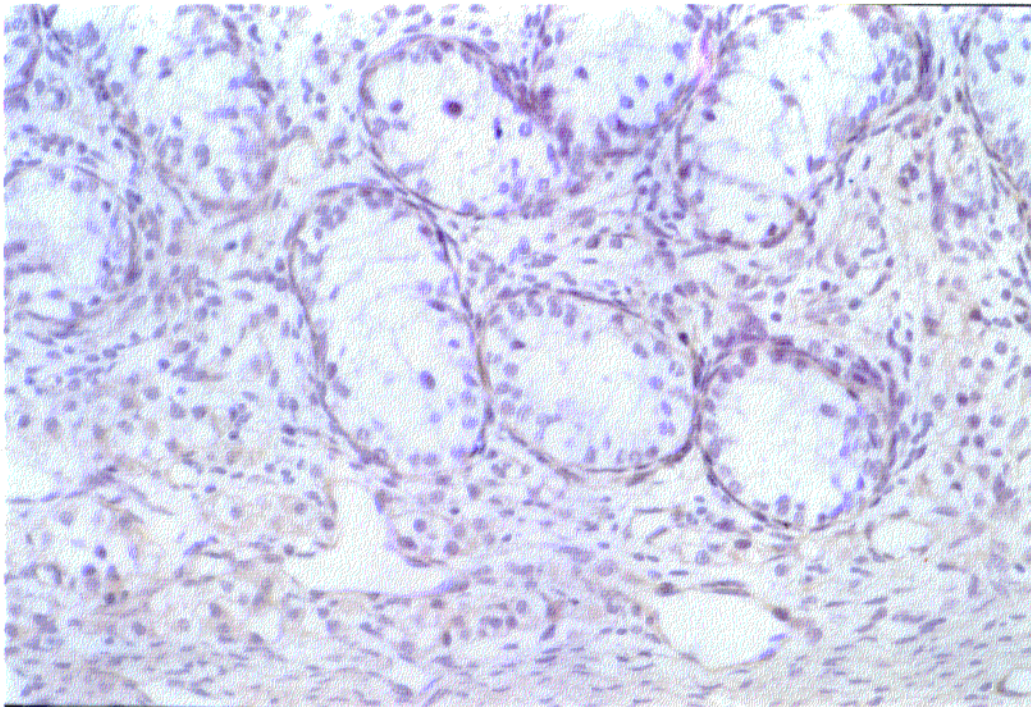


Fig. 7. PAP anti-laminina. Positividad en membranas basales de túbulos seminíferos y de grupos de células de Leydig. x 80.

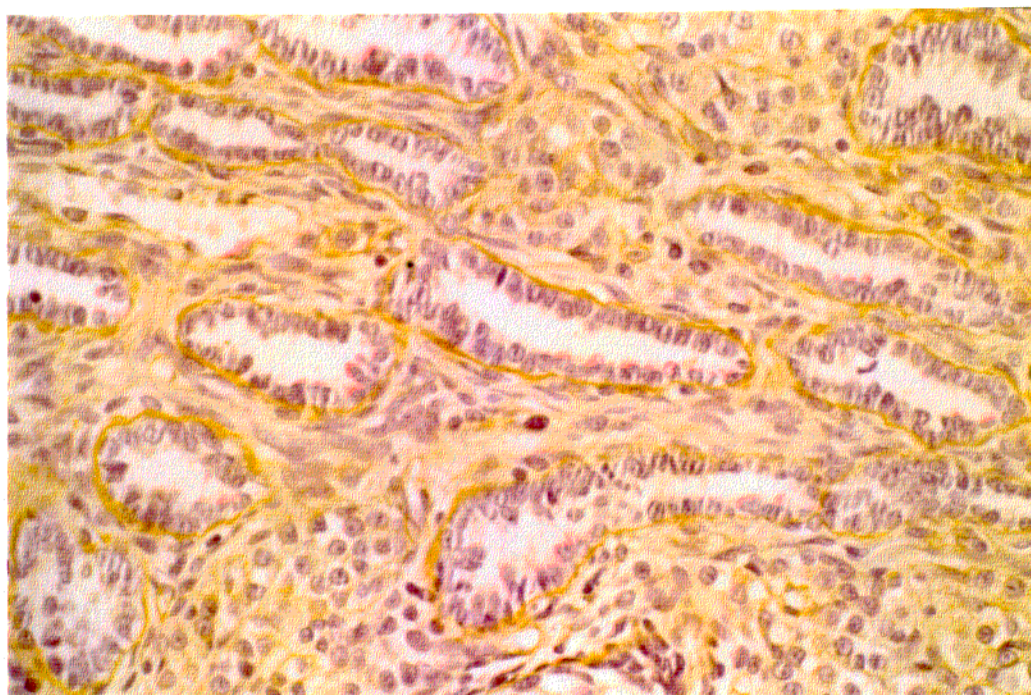


Fig. 8. PAP anti-laminina. Inmunotinción en membranas basales de túbulos rectos y red testicular. x 100.

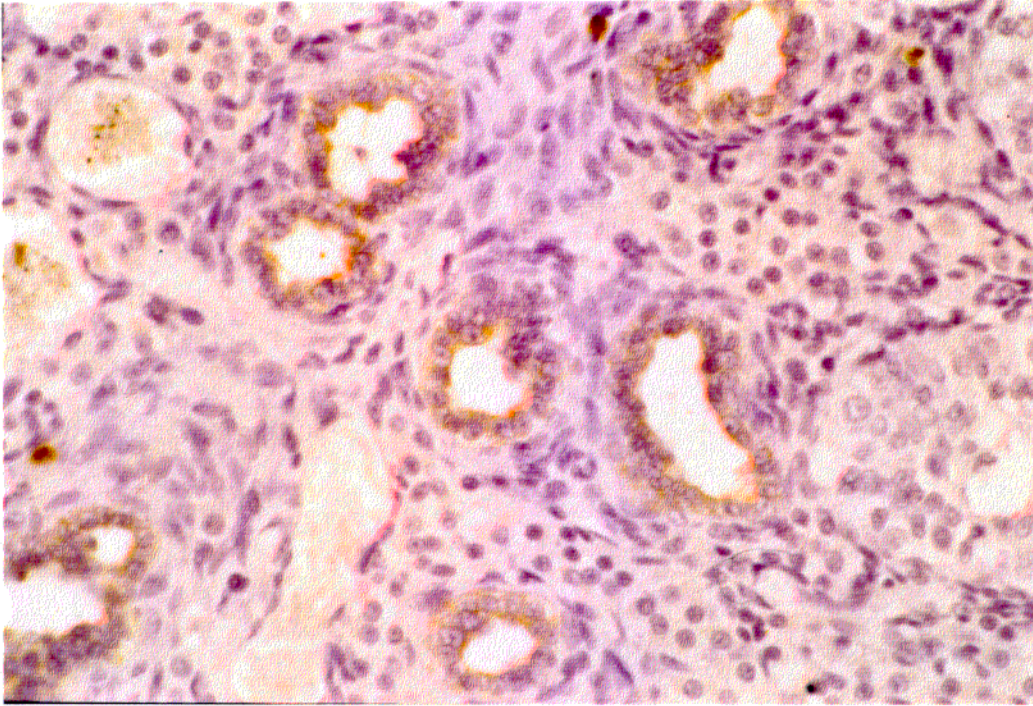


Fig. 9. PAP anti-citoqueratinas. Positividad en células epiteliales de los túbulos rectos. x 100.

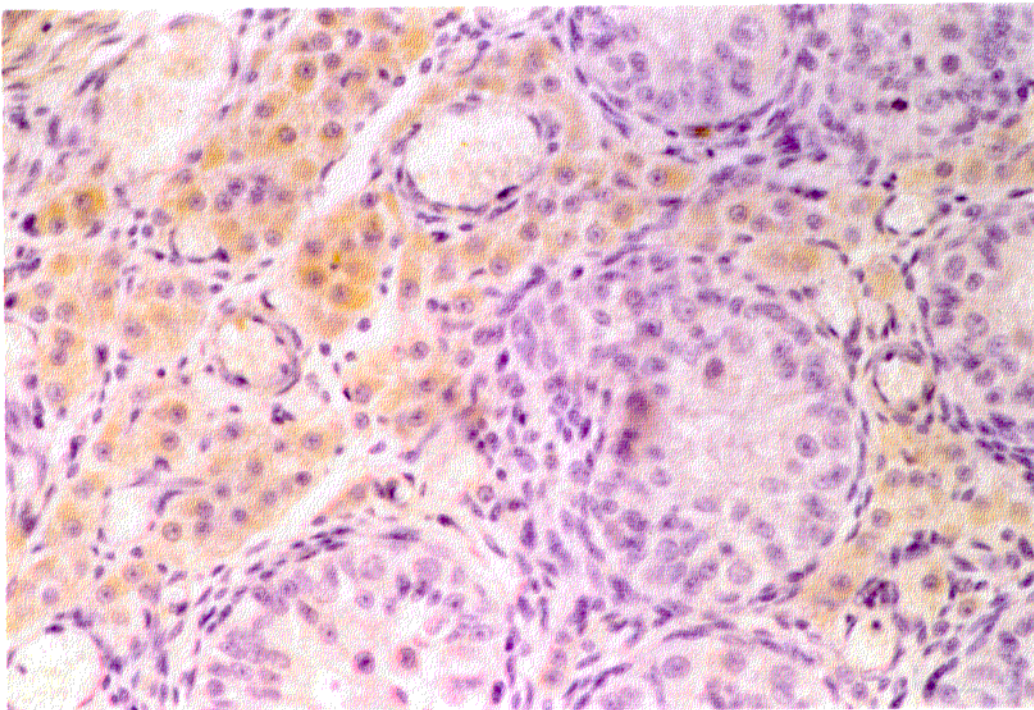


Fig. 10. PAP anti-testosterona. Inmunotinción en células de Leydig fetales. x 100.

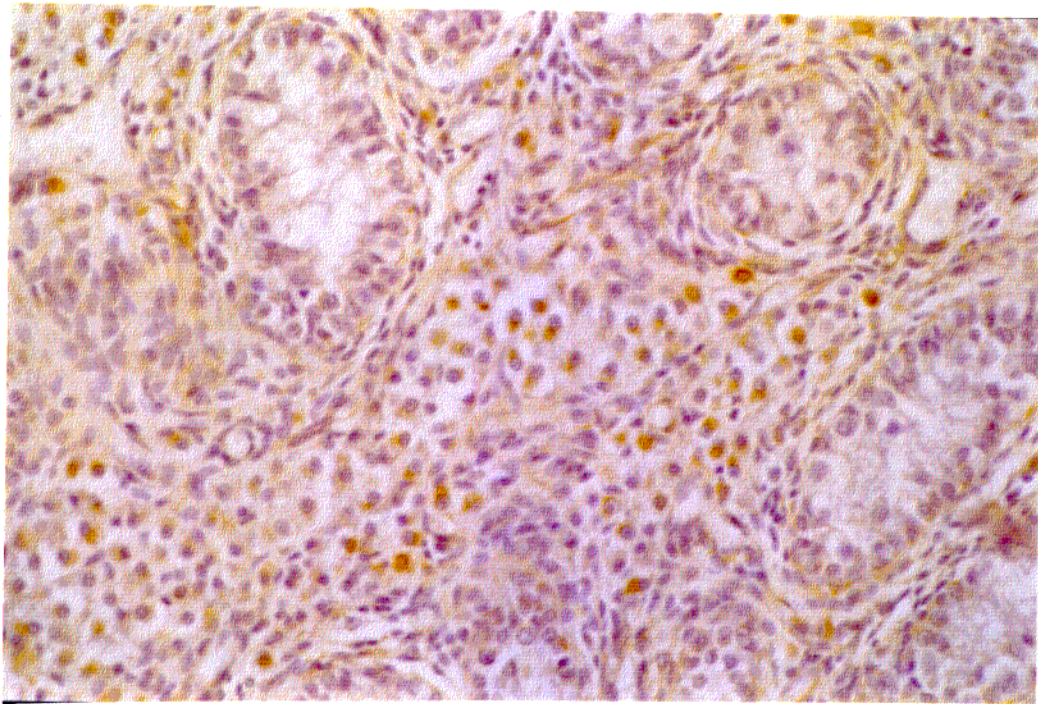


Fig. 11. PAP anti-vimentina. Positividad perinuclear de células de Leydig. x 80.

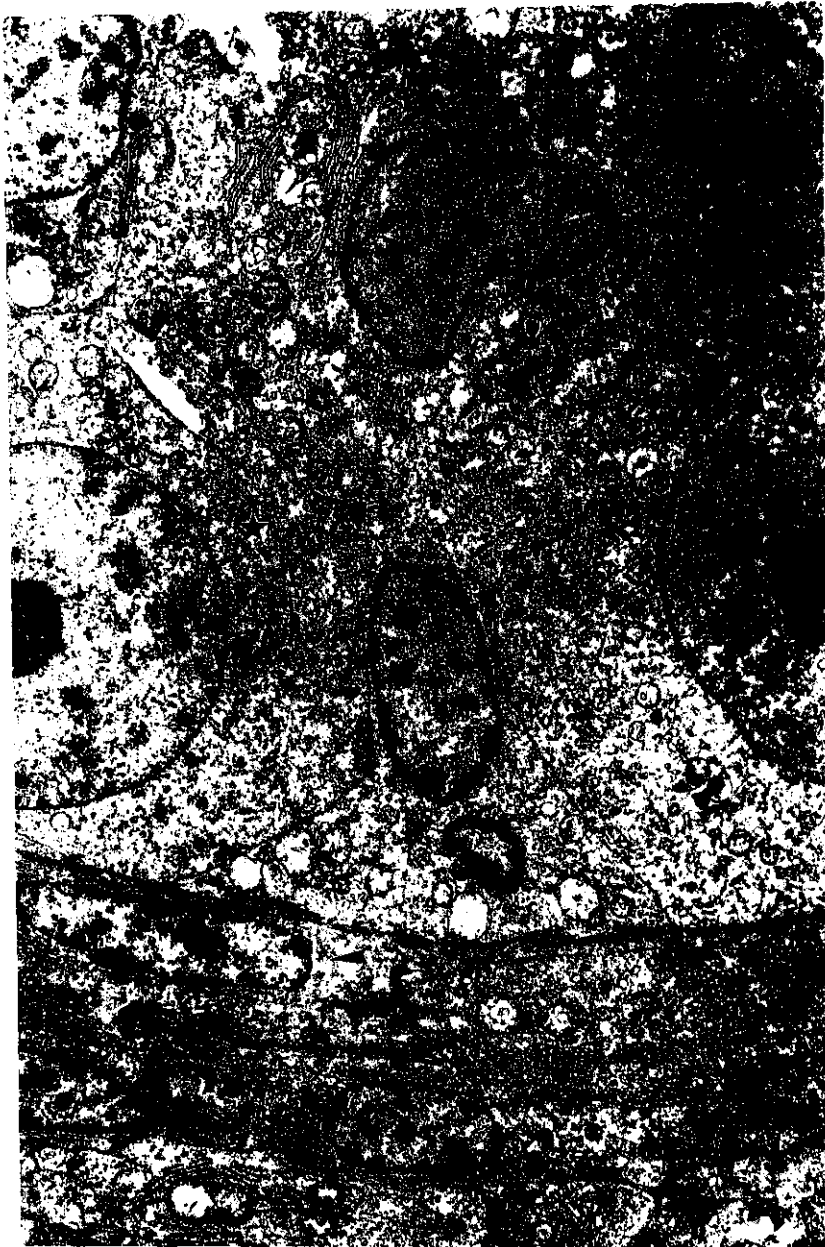


Fig. 12. Fase perinatal. Túbulo seminífero con espermatogonias tipo A (★), célula de Sertoli (*) y células peritubulares (▲). x 2.200.

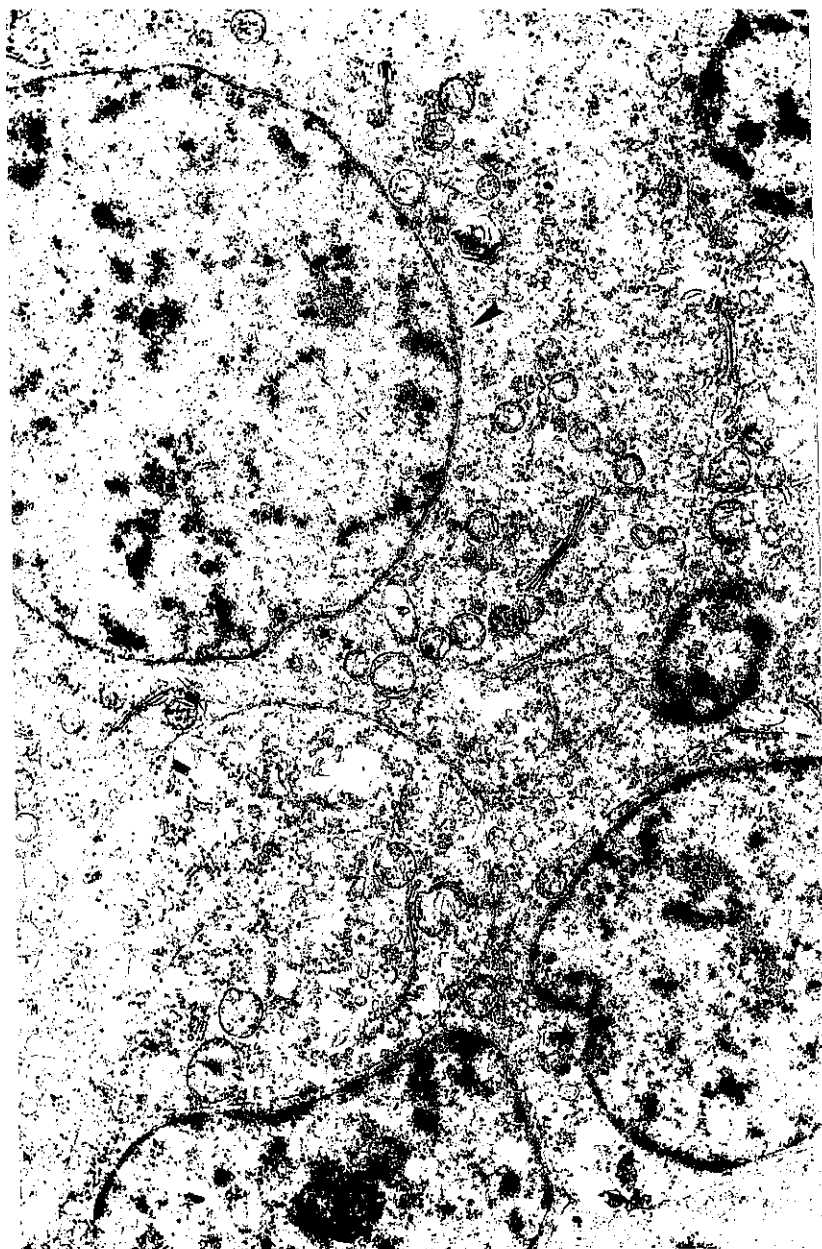


Fig. 13. Espermatogonia tipo A (▲) con núcleo redondo y eucromático y núcleo de célula de Sertoli (★). x 2.900



Fig. 14. Células epiteliales de la red testicular. Presencia de microvellosidades apicales. x 4000.



Fig. 15. Célula de Leydig fetal. Se aprecian mitocondrias de crestas tubulares, REL y RER. x 4000.

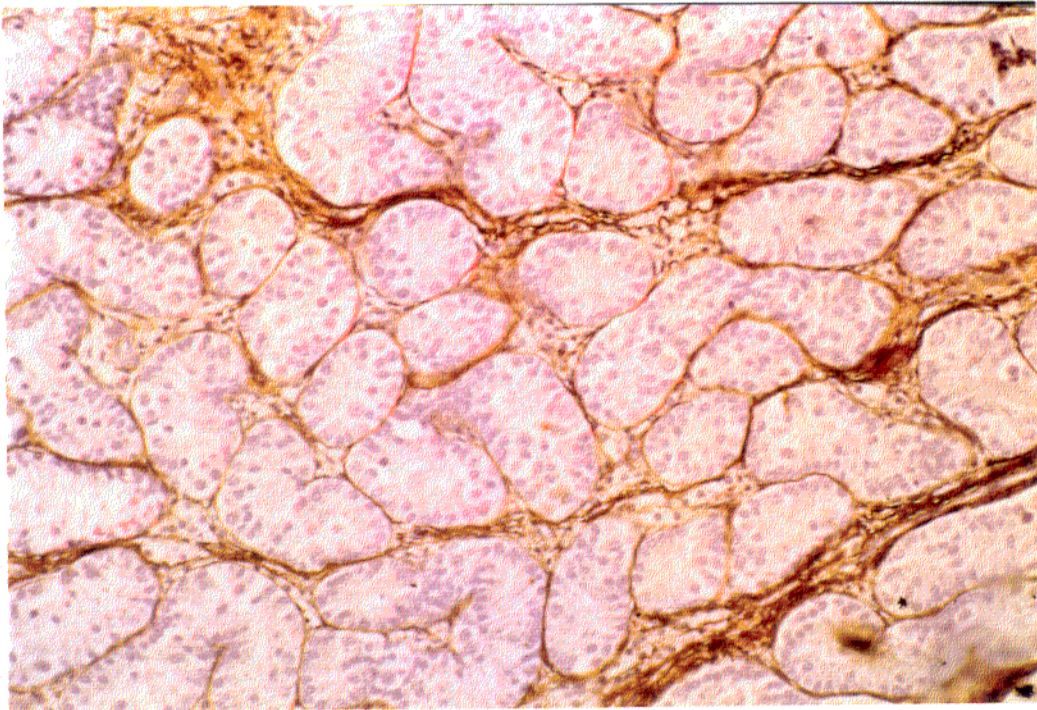


Fig. 16. Fase infantil. Compartimentación del parénquima testicular en lobulillos testiculares. Plata metenammina de Jones x 50.

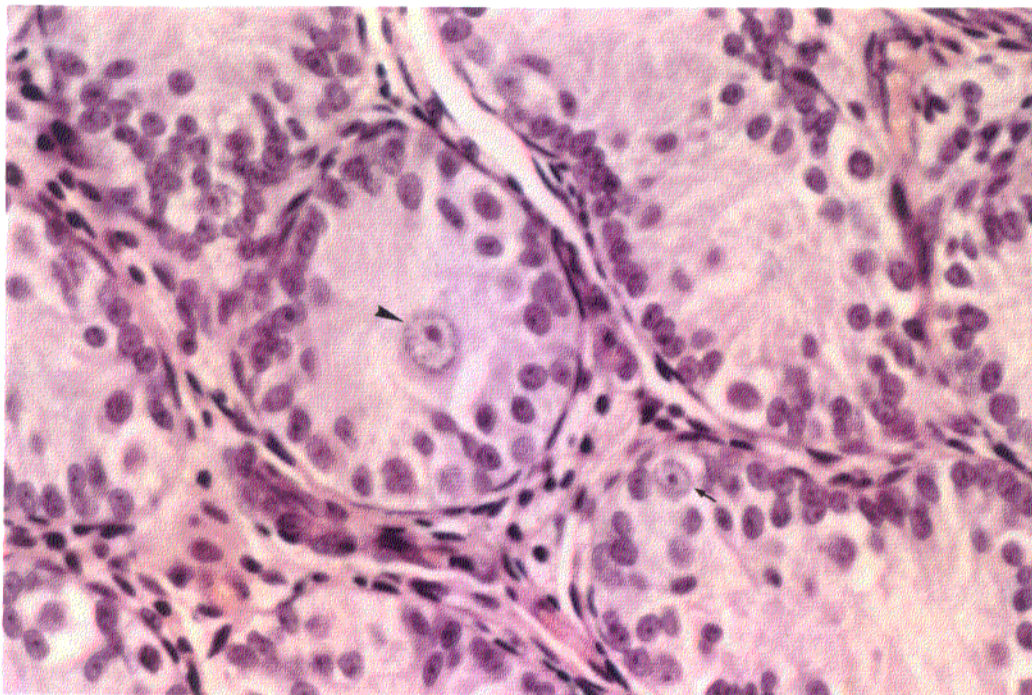


Fig. 17. Túbulos seminíferos carentes de luces. Espermatogonia fetal (▲), espermatogonias tipo A (†) y células de Sertoli. 1-2 capas de células peritubulares. H&E x 132.

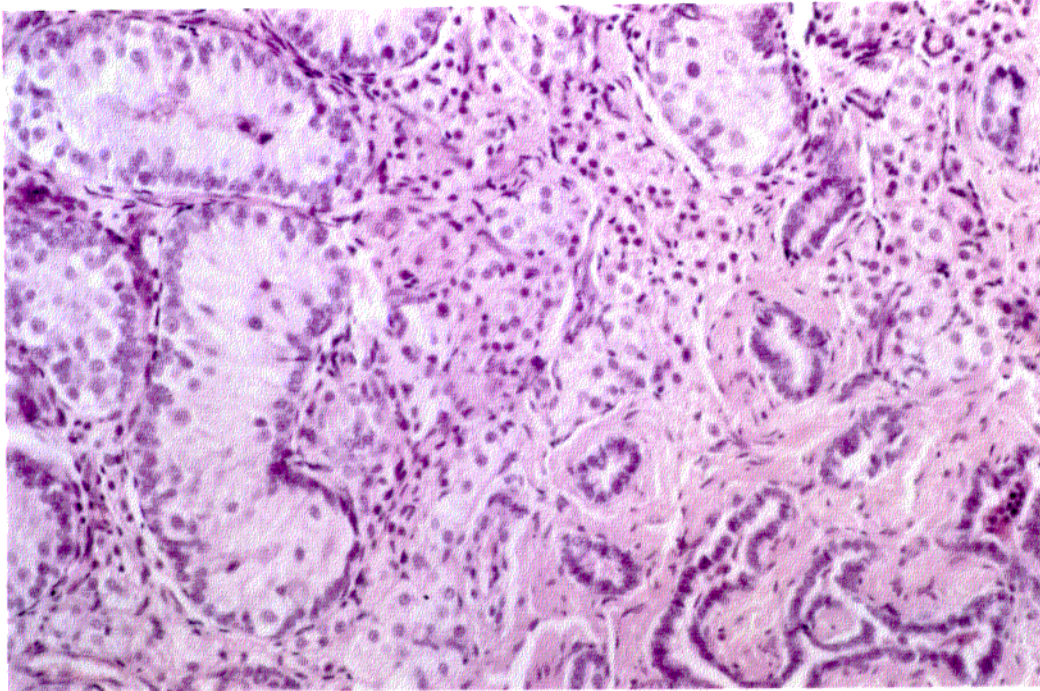


Fig. 18. Túbulos seminíferos, túbulos rectos y red testicular mediastínica. Grupos de células de Leydig en mediastino. H&E x 66.

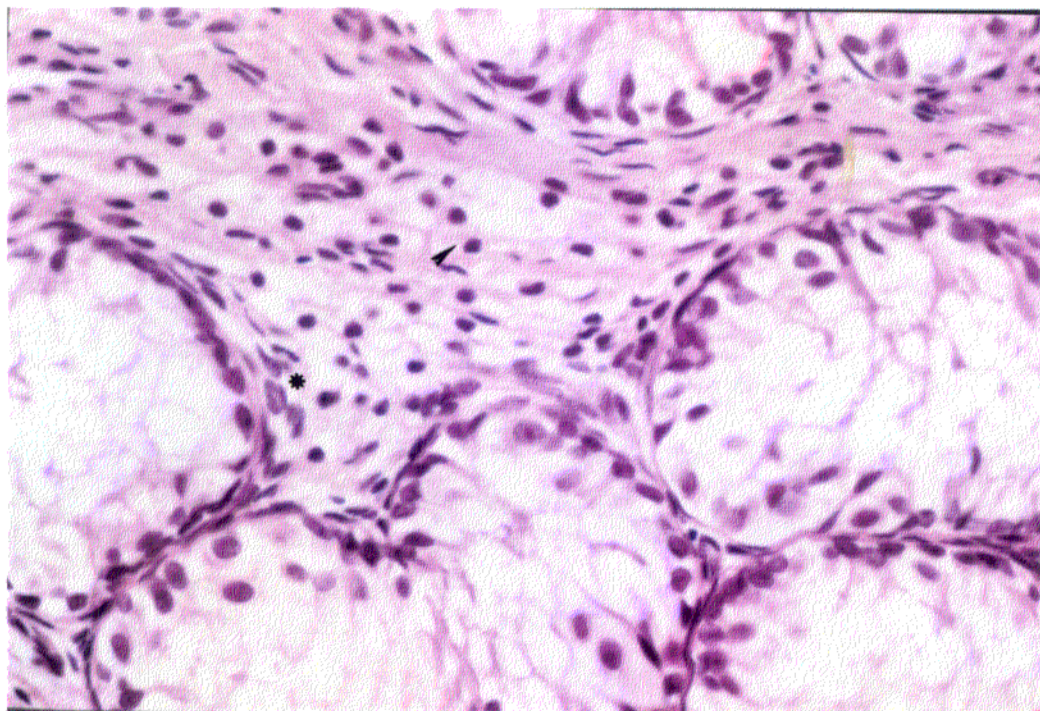


Fig. 19. Túbulos seminíferos y células de Leydig en degeneración (▲) e infantiles (*). H&E x 132.

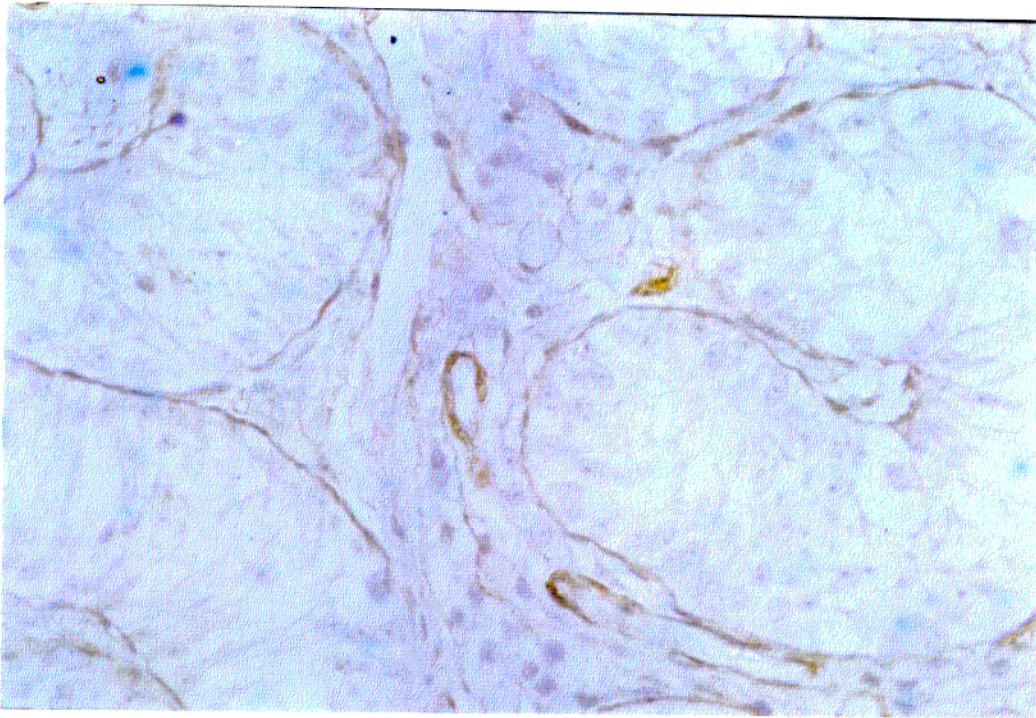


Fig. 20. PAP anti-colágeno tipo IV. Positividad en membranas basales de túbulos seminíferos y de grupos de células de Leydig. x 132.

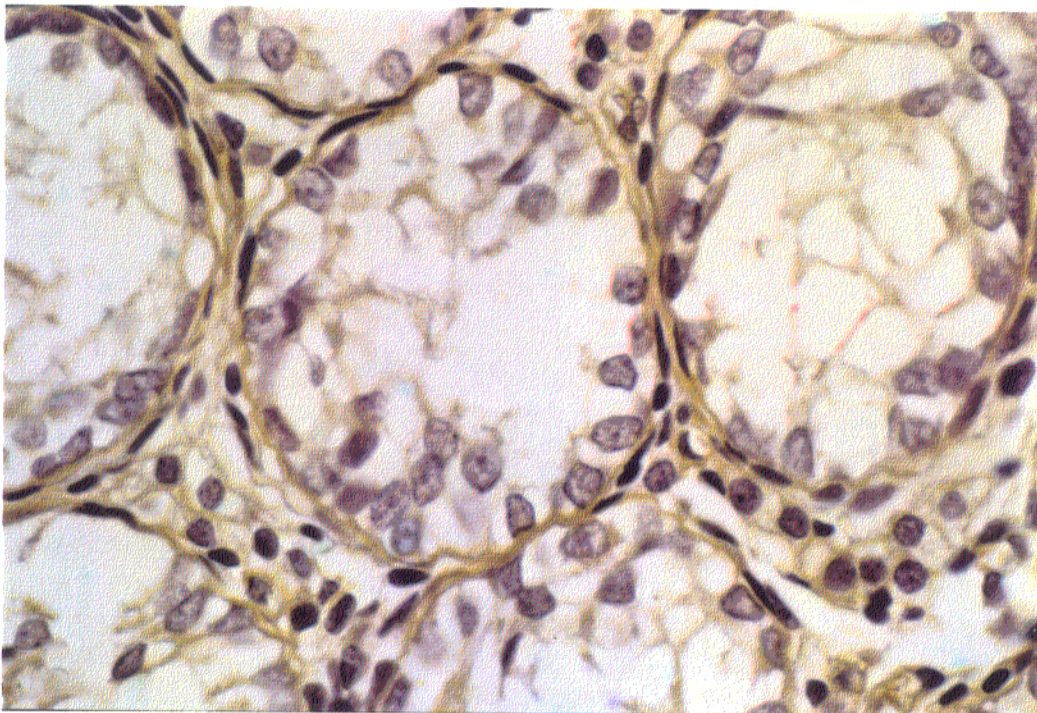


Fig. 21. PAP anti-laminina. Positividad en membranas basales de los túbulos seminíferos. x 160.

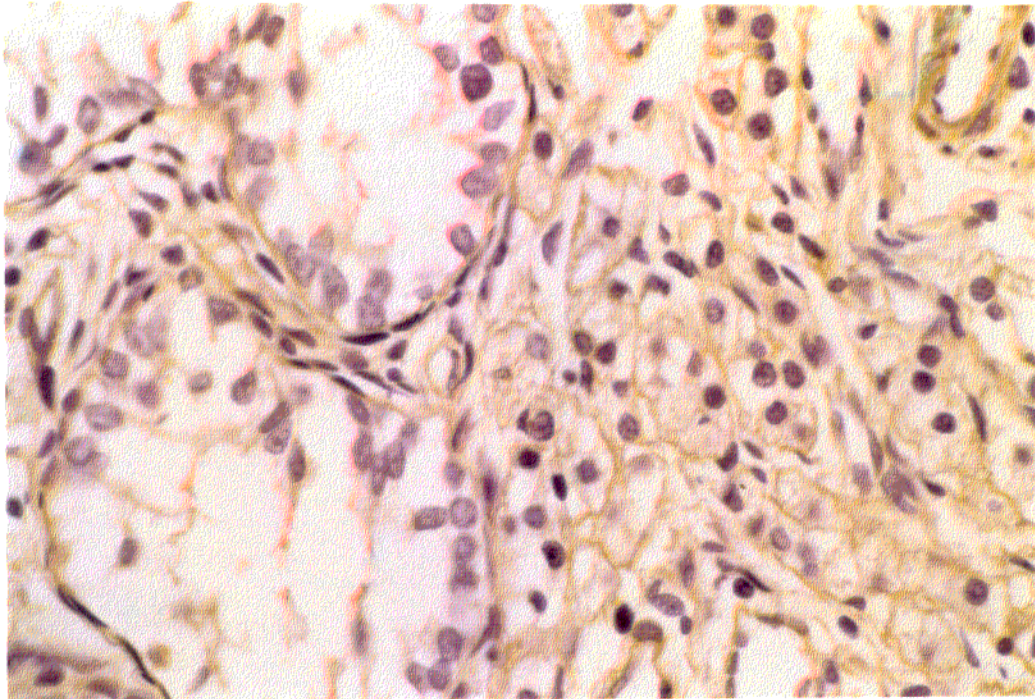


Fig. 22. PAP anti-laminina. Inmunotinción en membranas basales de túbulo seminífero y alrededor de grupos de células de Leydig. x 132.



Fig. 23. Túbulo seminífero infantil. Células de Sertoli, debajo membrana basal simple. x 4000.

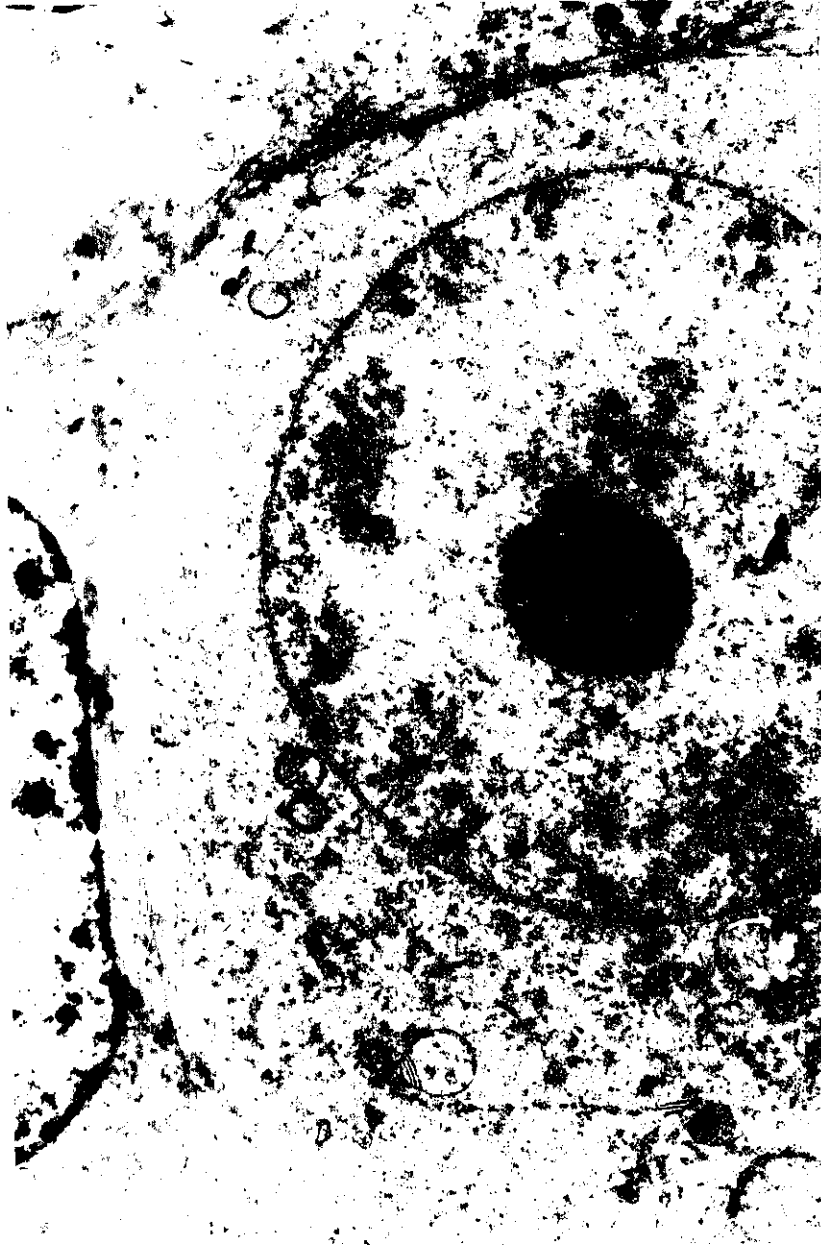


Fig. 24. Espermatogonia fetal con nucleolo muy evidente y citoplasma electrolúcido. x 4000



Fig. 25. Célula de Leydig en vías de degeneración. Alrededor membrana basal discontinua y células peritubulares. x 4000

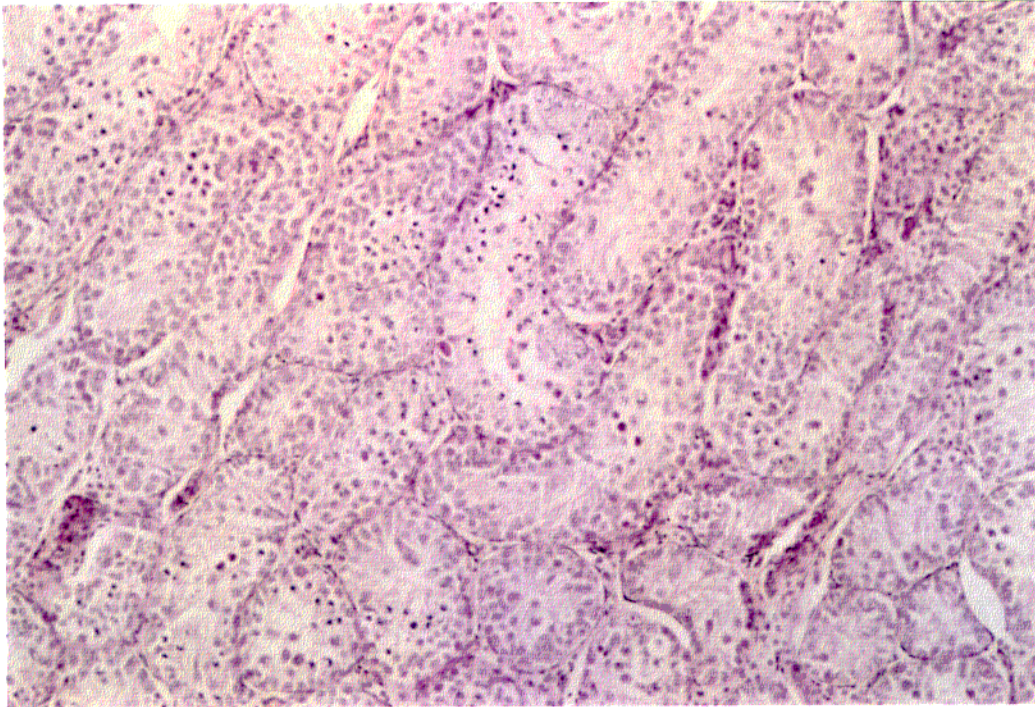


Fig. 26. Fase puberal. Túbulos seminíferos en diversos grados de desarrollo. H&E x 33.

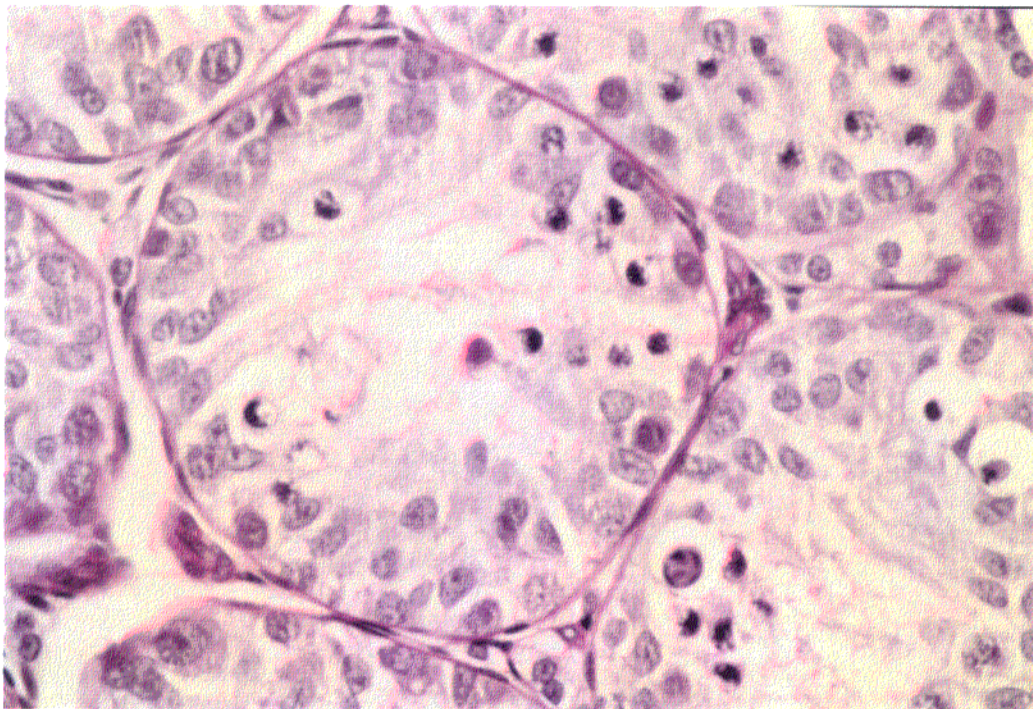


Fig. 27. Túbulos seminíferos con luces y epitelio germinal. Alrededor se observa una capa de células peritubulares. PAS x 132.

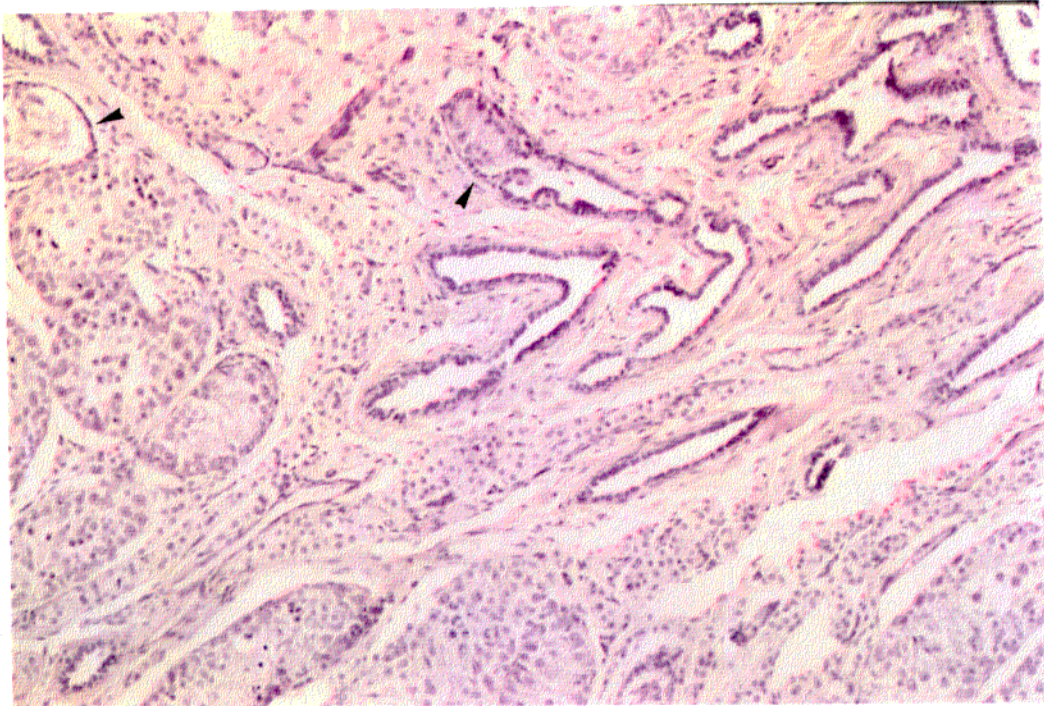


Fig. 28. Transición entre túbulos seminíferos y túbulos rectos (▲). Red testicular mediastínica. H&E x 33.

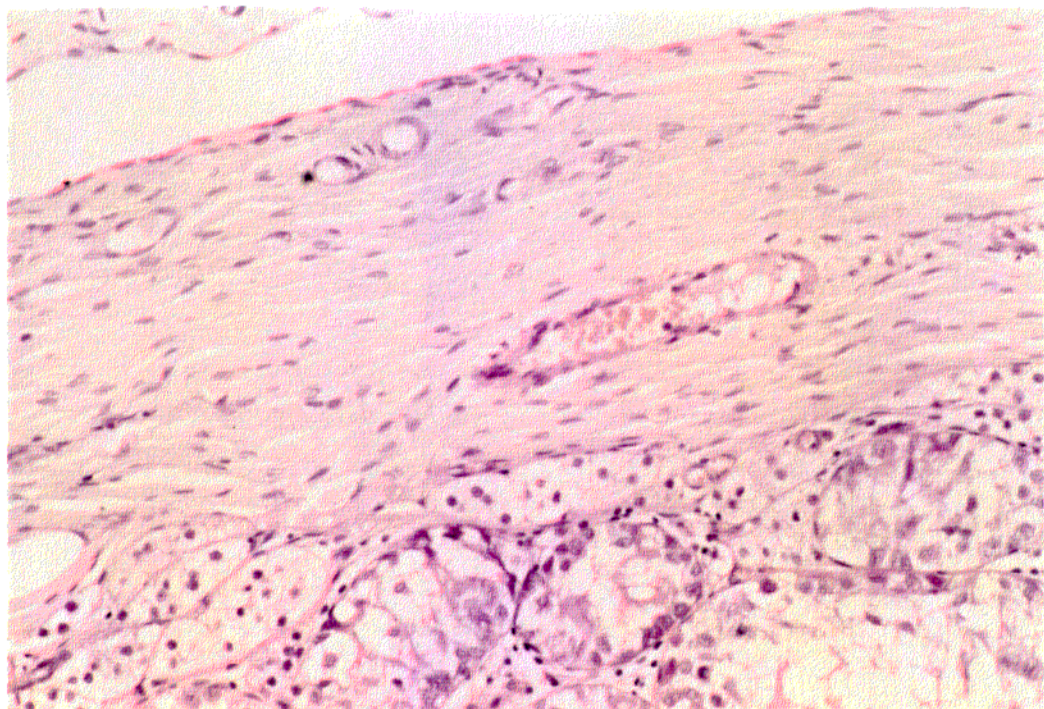


Fig. 29. Cápsula albugínea y grupos de células de Leydig. H&E x 66.

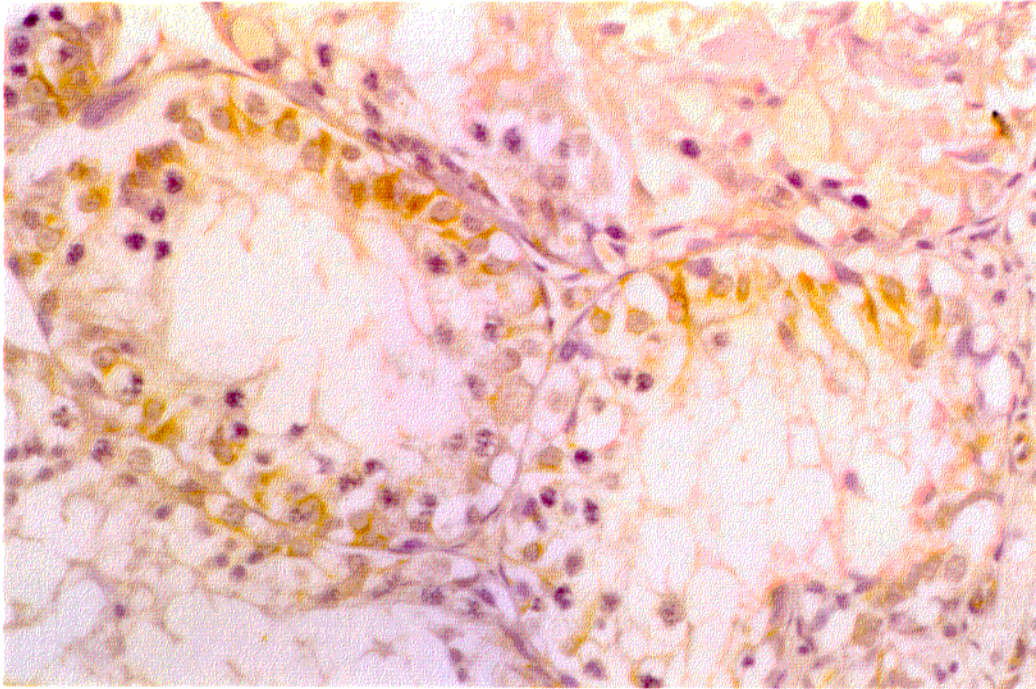


Fig. 30. PAP anti-vimentina. Inmunotinción media de las células de Sertoli y débil de las células peritubulares mioides. x 100.

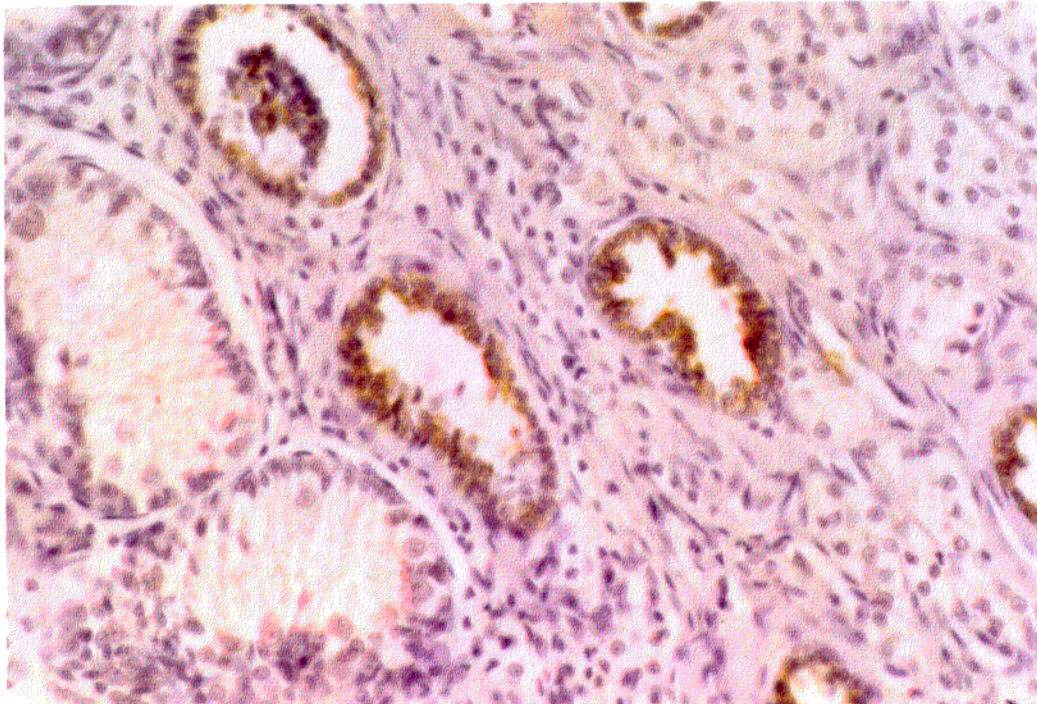


Fig. 31. PAP anti-citoqueratinas. Intensa positividad de las células de los túbulos rectos. x 80.

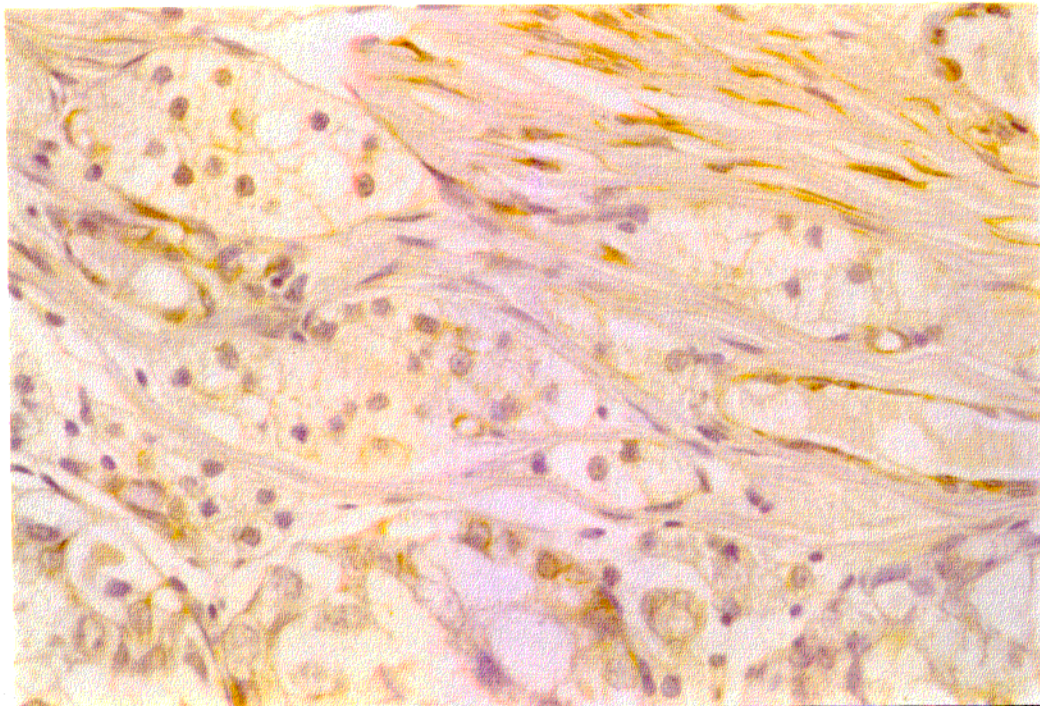


Fig. 32. PAP anti-vimentina. Escasa positividad de células de Leydig y fuerte inmunotinción de fibroblastos en la cápsula. x 132.



Fig. 33. Célula de Sertoli adulta (★) con núcleo de contorno irregular y espermatocito primario en leptotene (▲). x 2200



Fig. 34. Células epiteliales de túbulo recto. Membrana basal subyacente. x 6000.

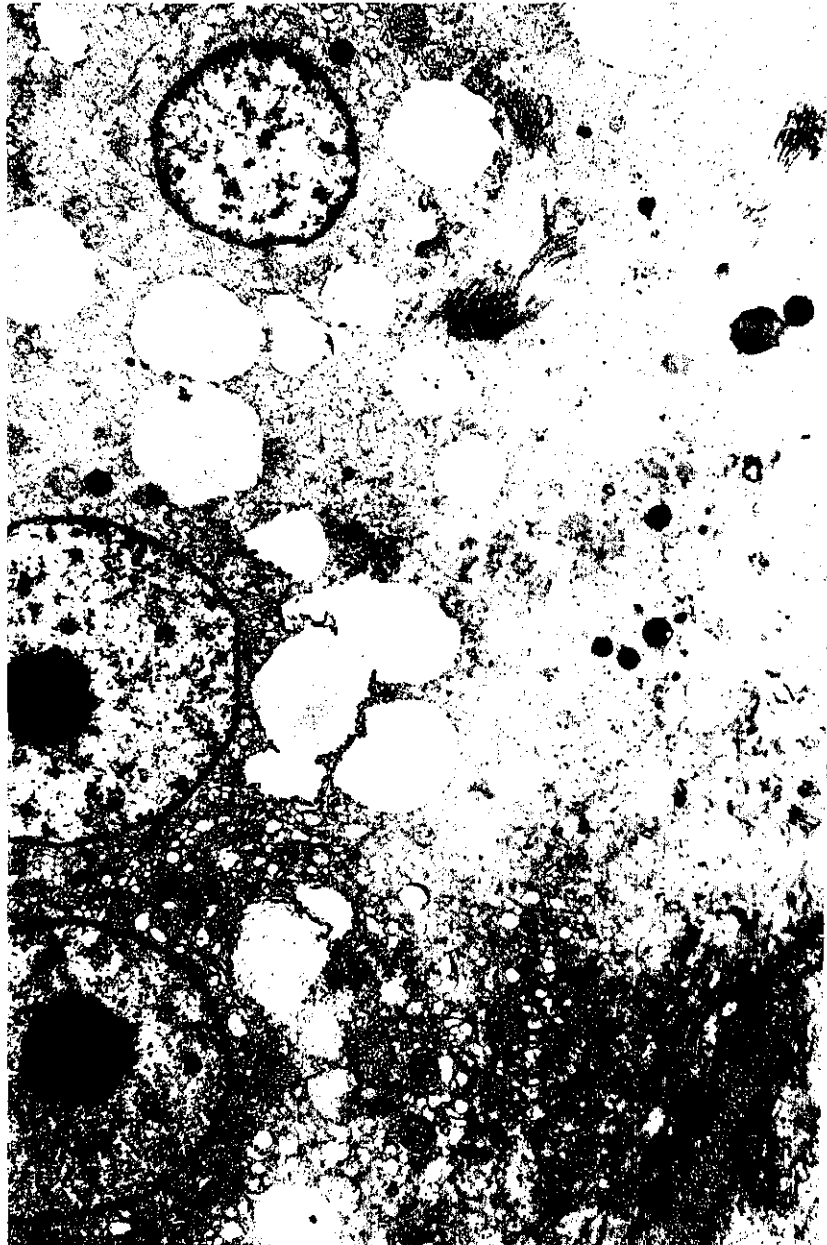


Fig. 35. Grupo de células de Leydig. En el citoplasma abundante REL y vacuolas lipídicas. x 2900.

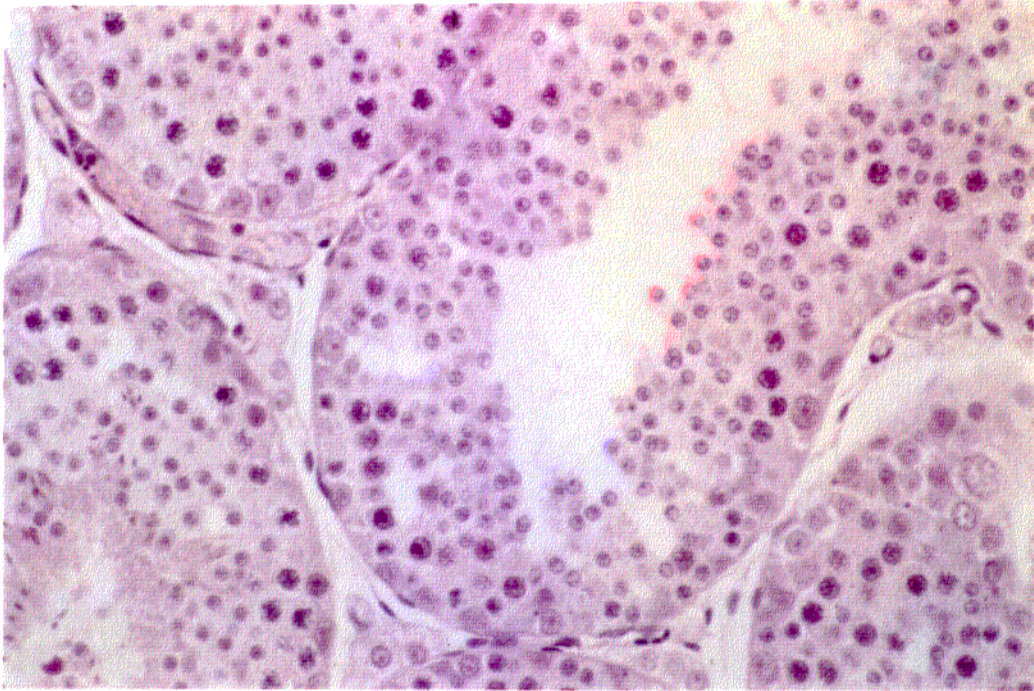


Fig. 36. Fase adulta. Túbulo seminífero en estadio I. H&E x 100.

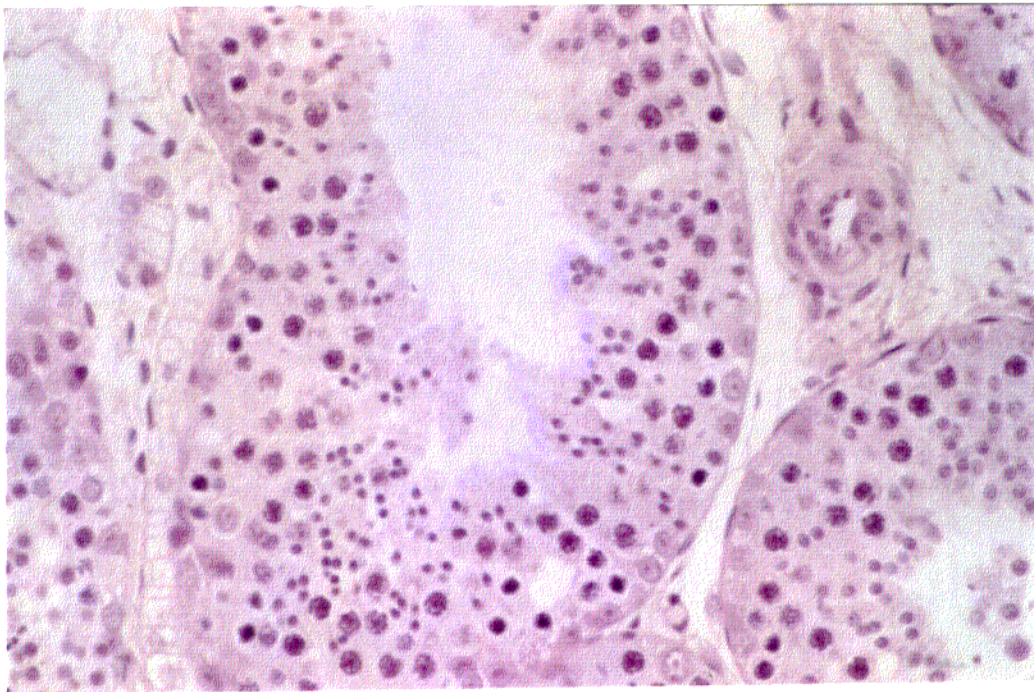


Fig. 37. Estadio II. H&E x 100.

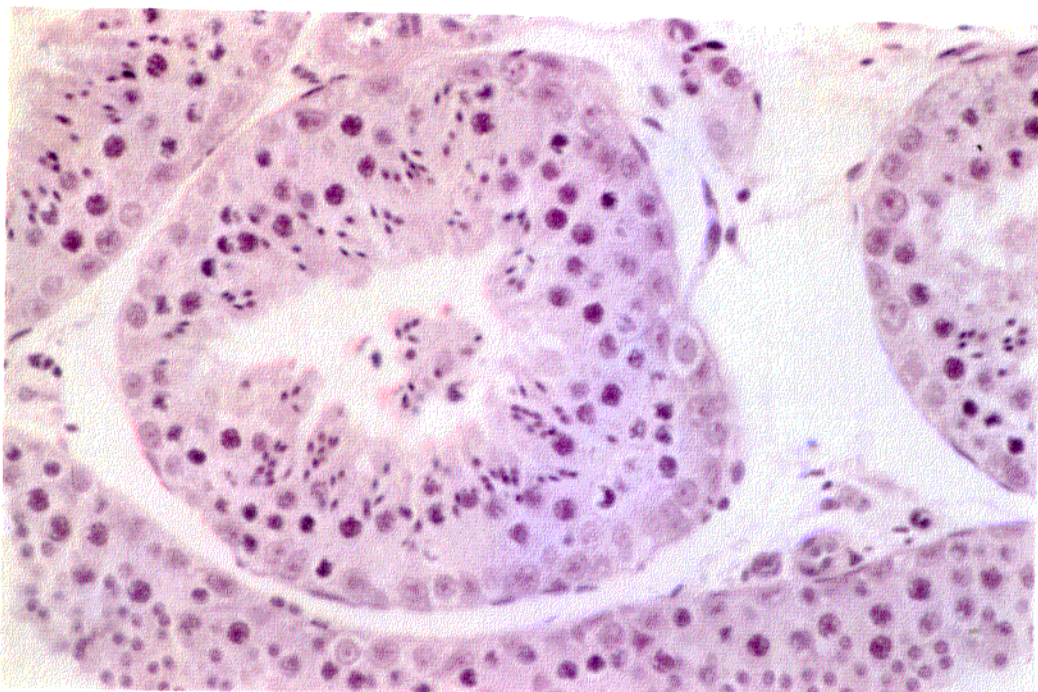


Fig. 38. Estadio III. H&E x 100.

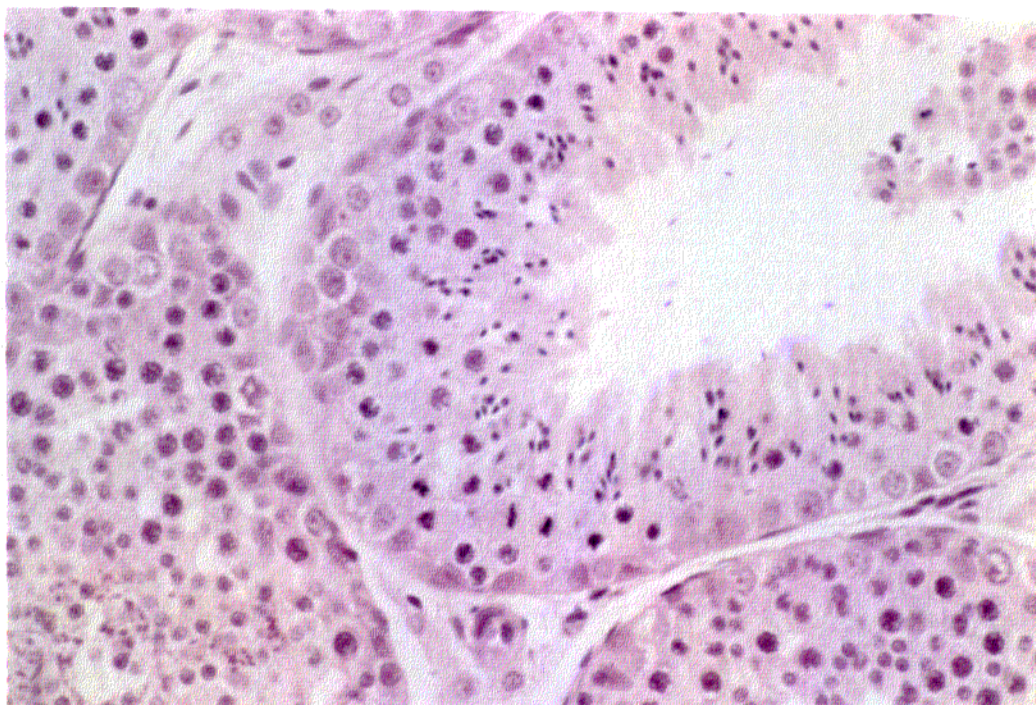


Fig. 39. Estadio IV. H&E x 100.

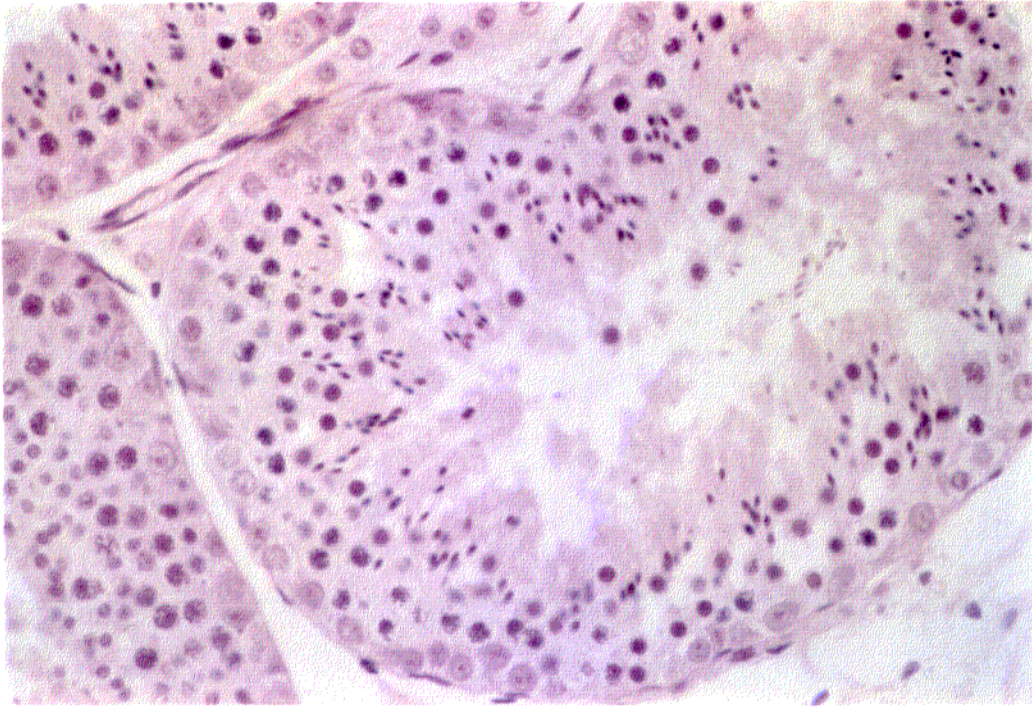


Fig. 40. Estadio V. H&E x 100.

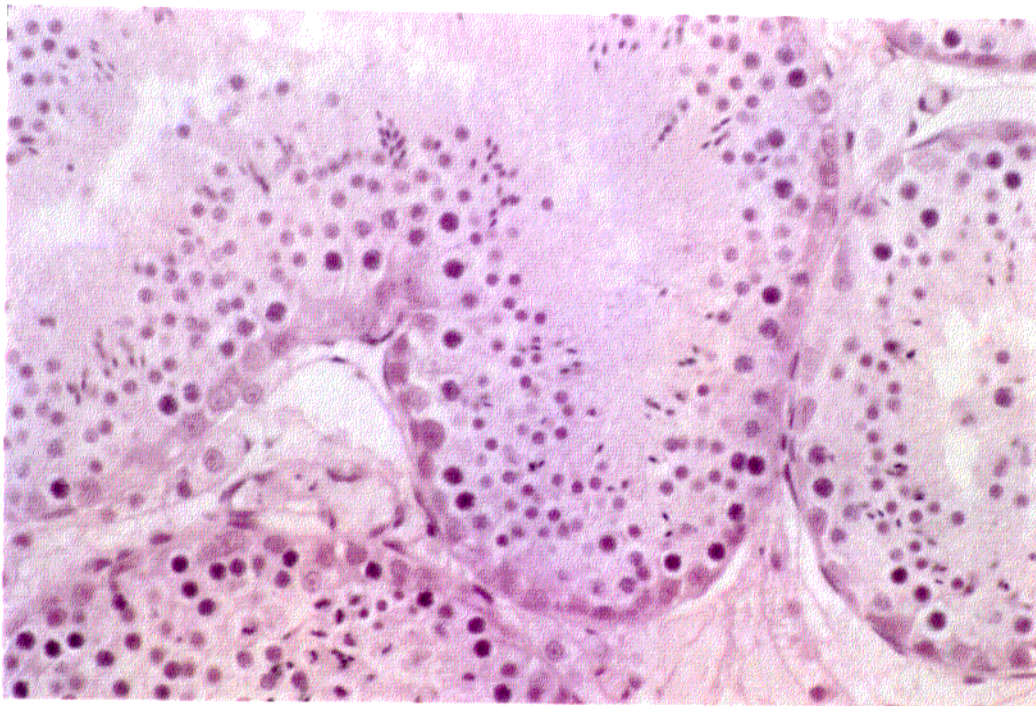


Fig. 41. Estadio VI. H&E x 100.

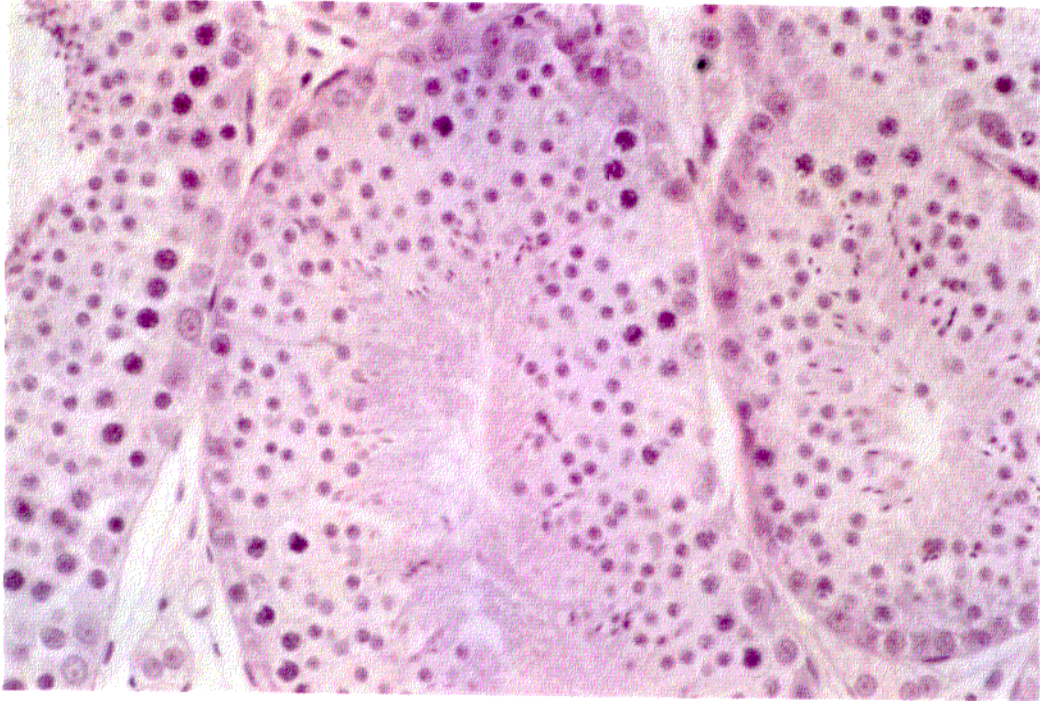


Fig. 42. Estadio VII. H&E x 100

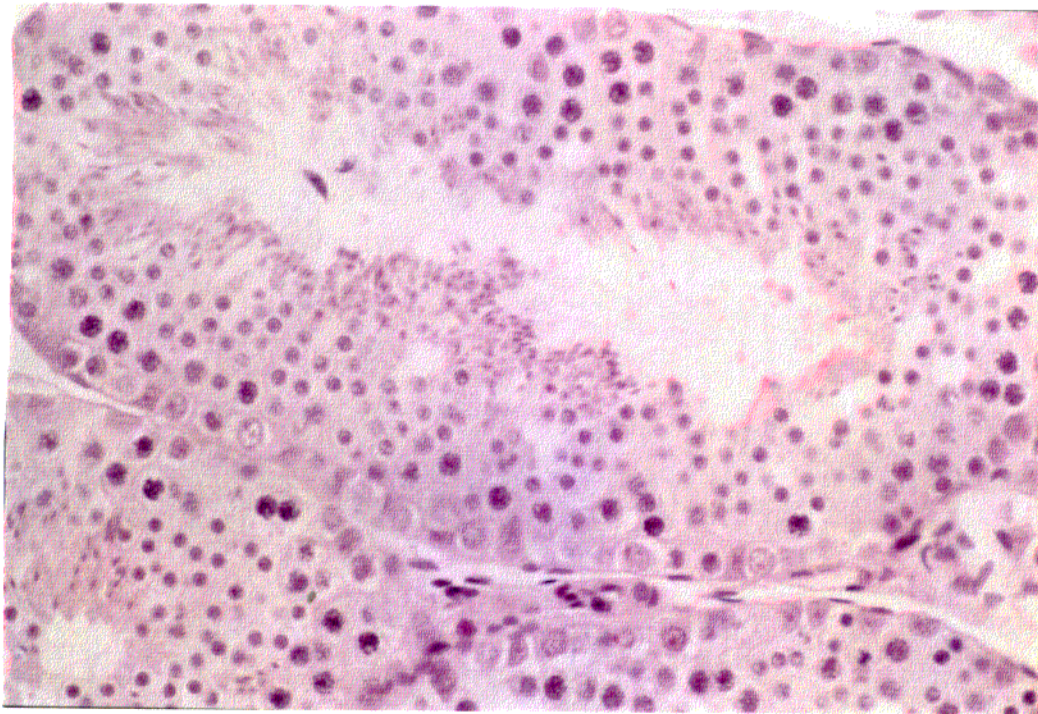


Fig. 43. Estadio VIII. H&E x 100.

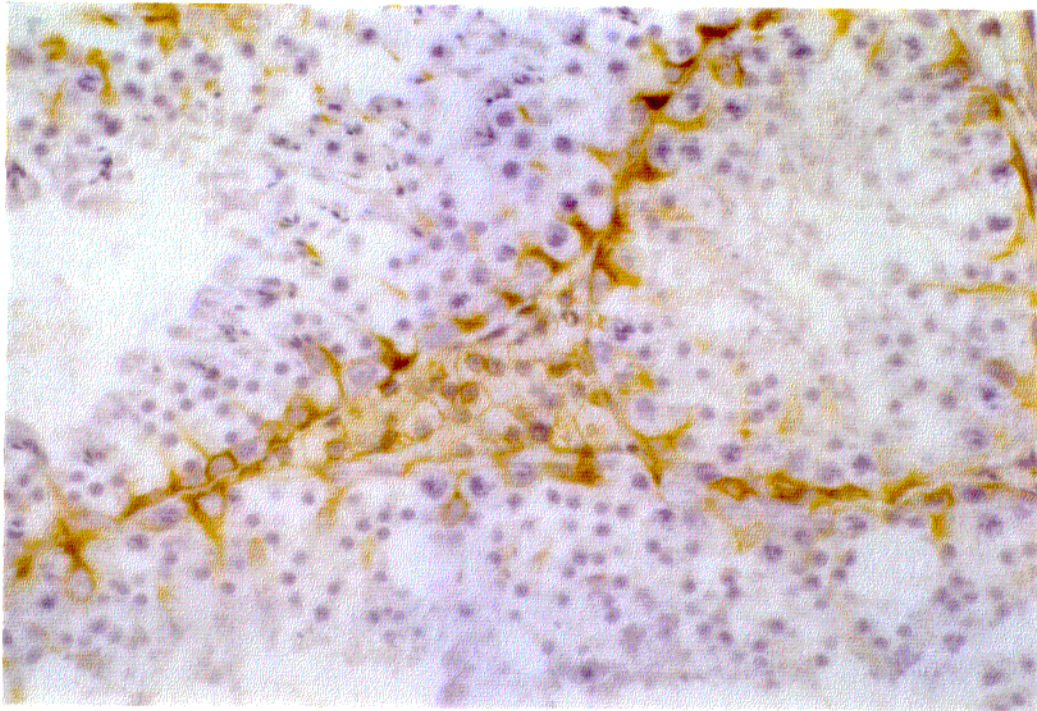


Fig. 44. PAP anti-vimentina. Positividad intensa de las células de Sertoli, media de las células de Leydig y débil de las células mioides. x 100.

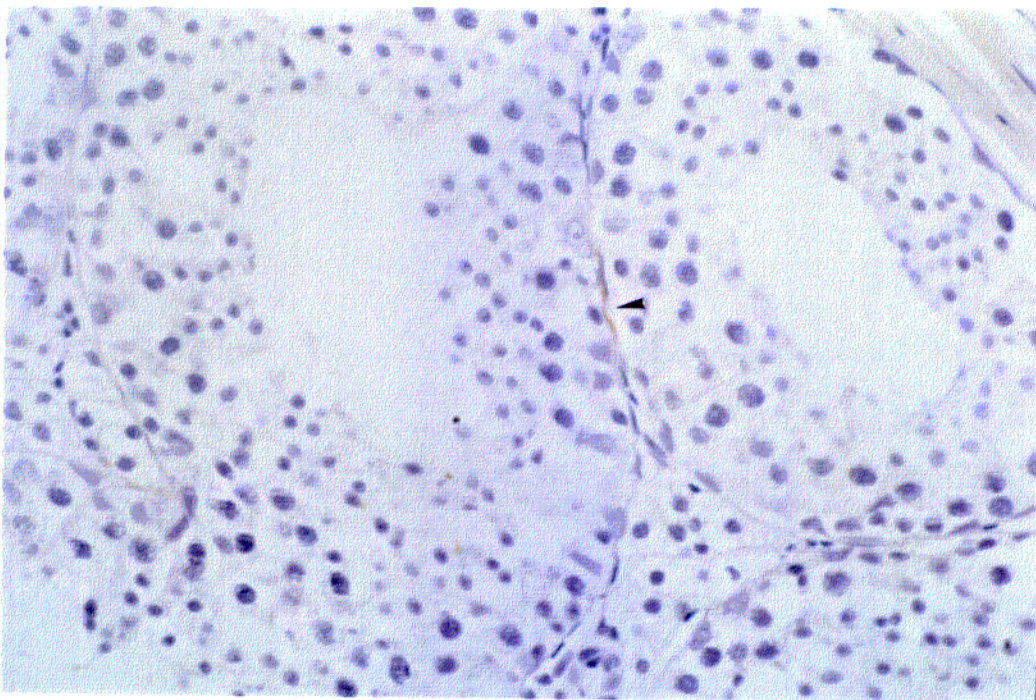


Fig. 45. PAP anti-desmina. Débil inmunotinción en células peritubulares mioides (▲). x 100.

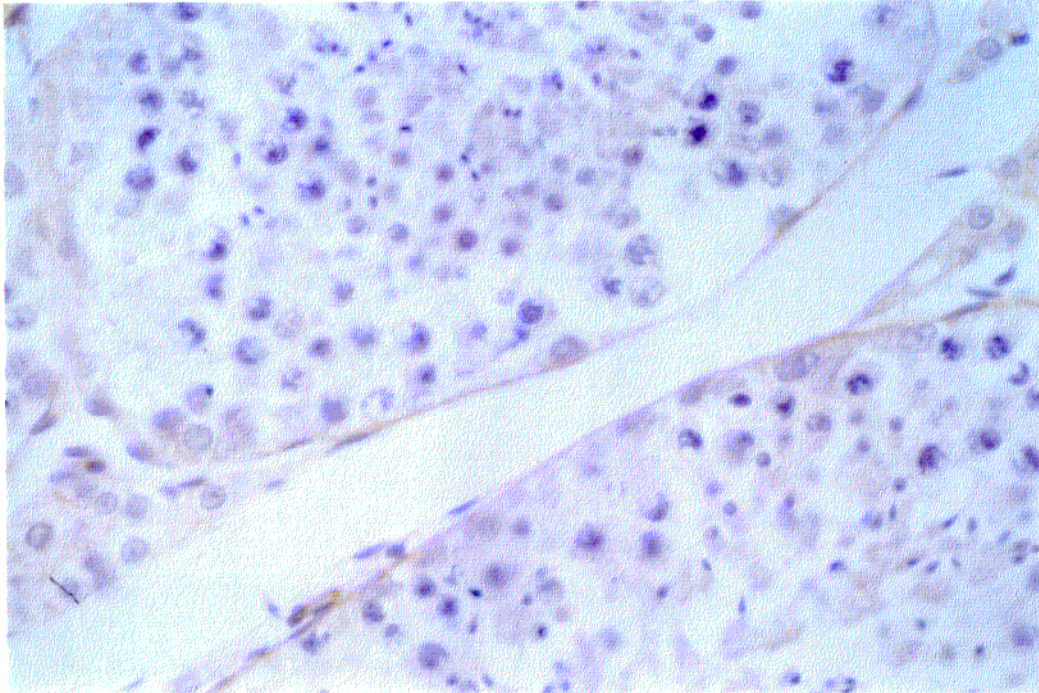


Fig. 46. PAP anti-laminina. Inmunotinción en membranas basales de túbulos seminíferos. x 132.

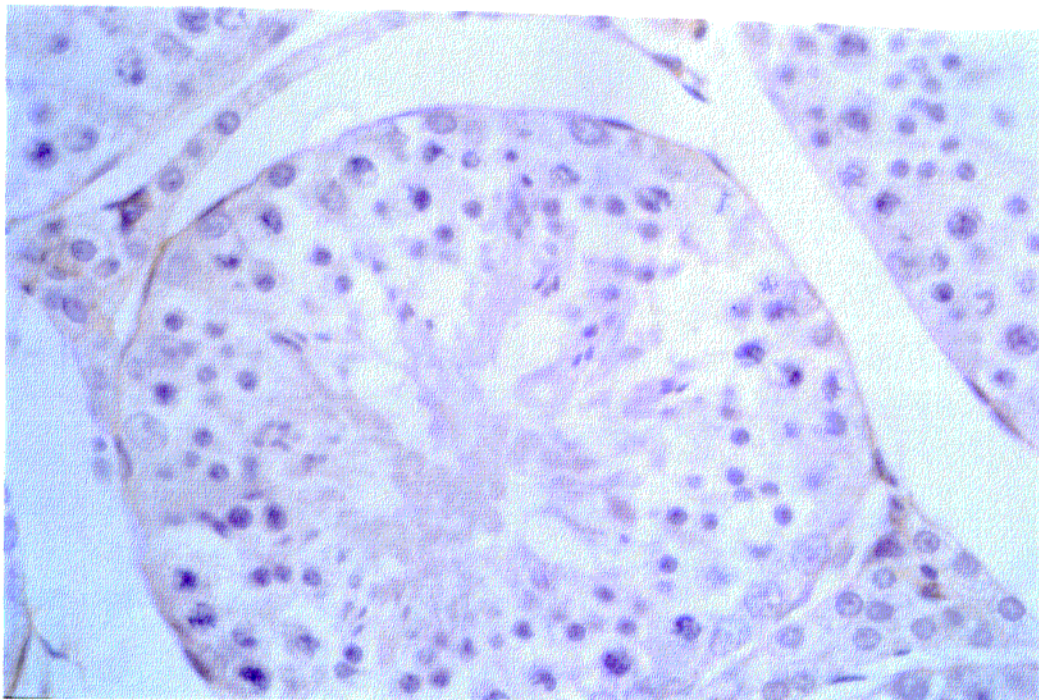


Fig. 47. PAP anti-colágeno tipo IV. Inmunotinción en membranas basales de túbulos seminíferos.

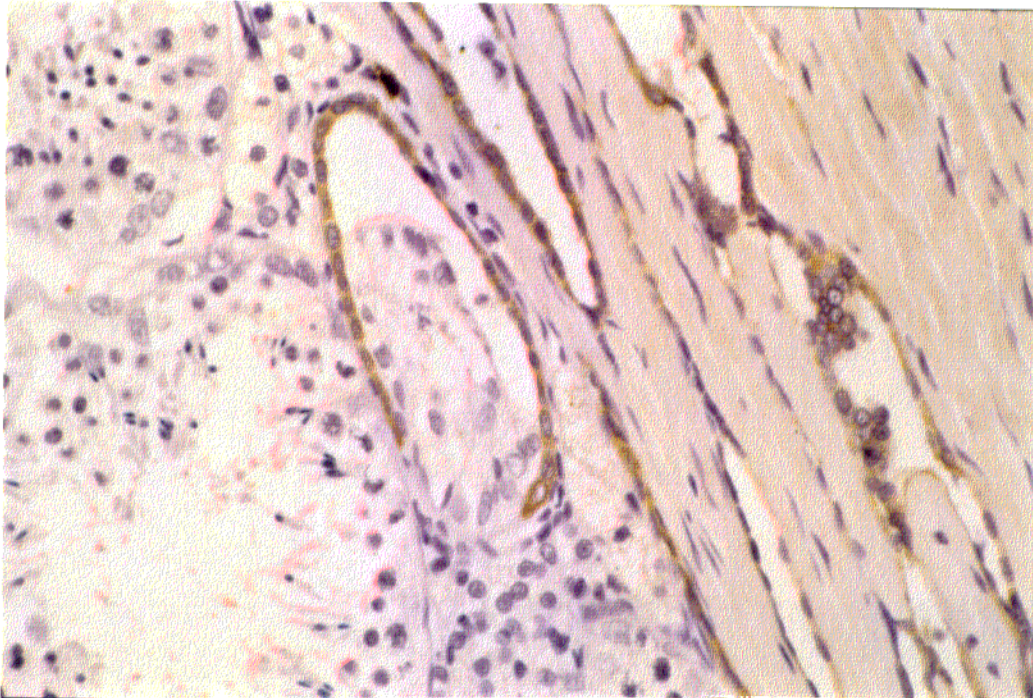


Fig. 48. PAP anti-citoqueratinas. Positividad en células de túbulos rectos y red testicular. x 100.

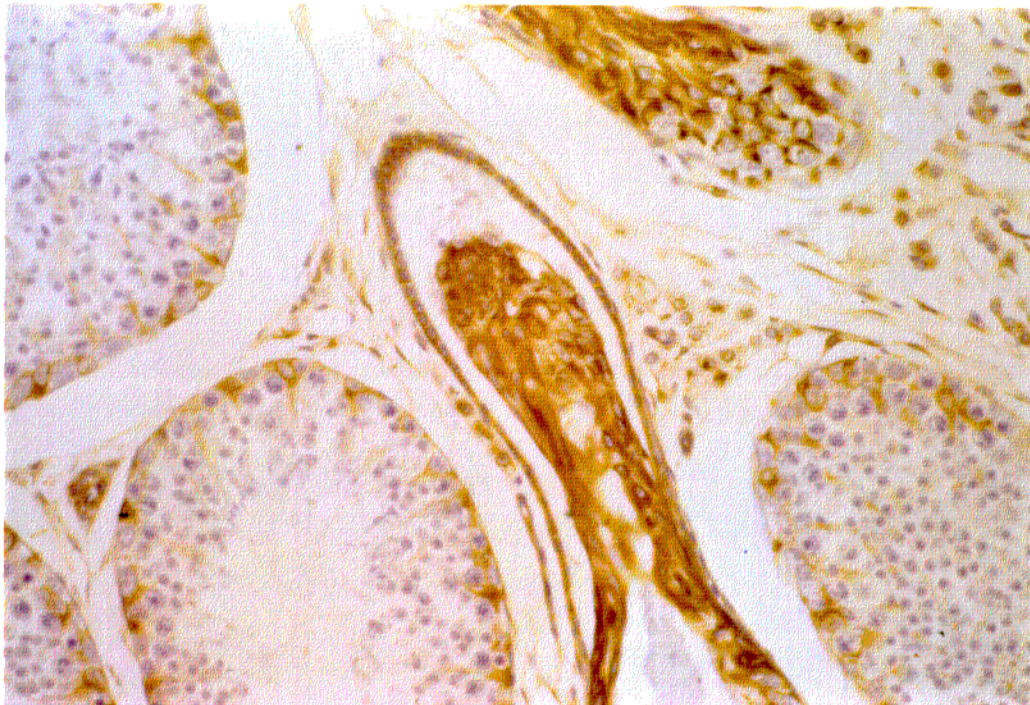


Fig. 49. PAP anti-vimentina. Positividad de las células de Sertoli y de las células epiteliales de túbulos rectos. x 66.

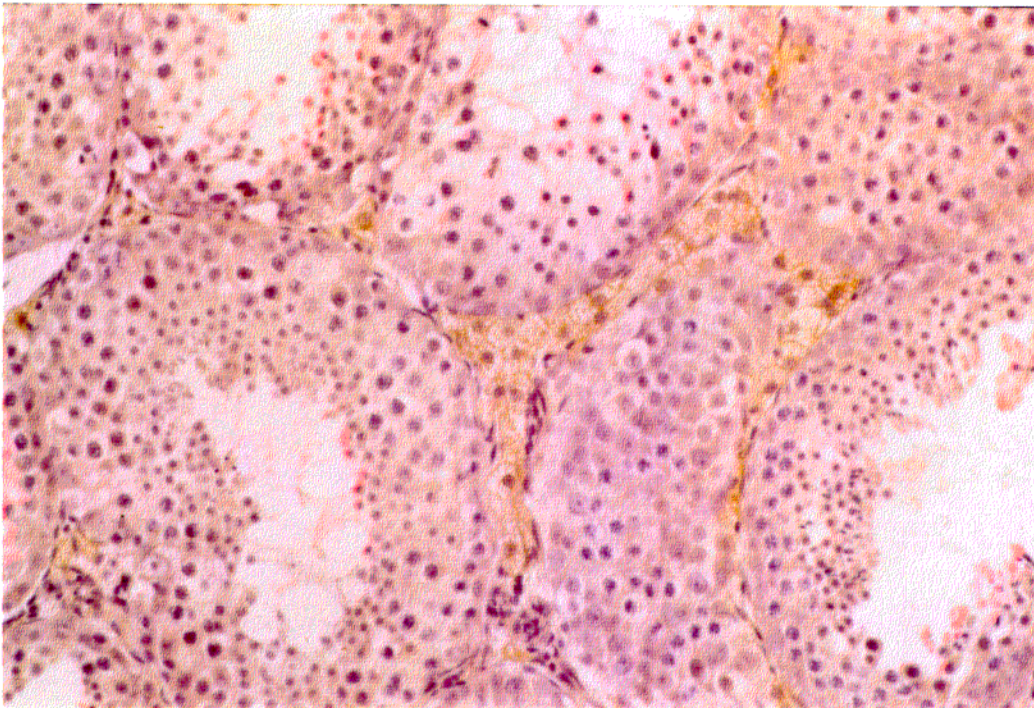


Fig. 50. PAP anti-testosterona. Inmunotinción de las células de Leydig. x 66.

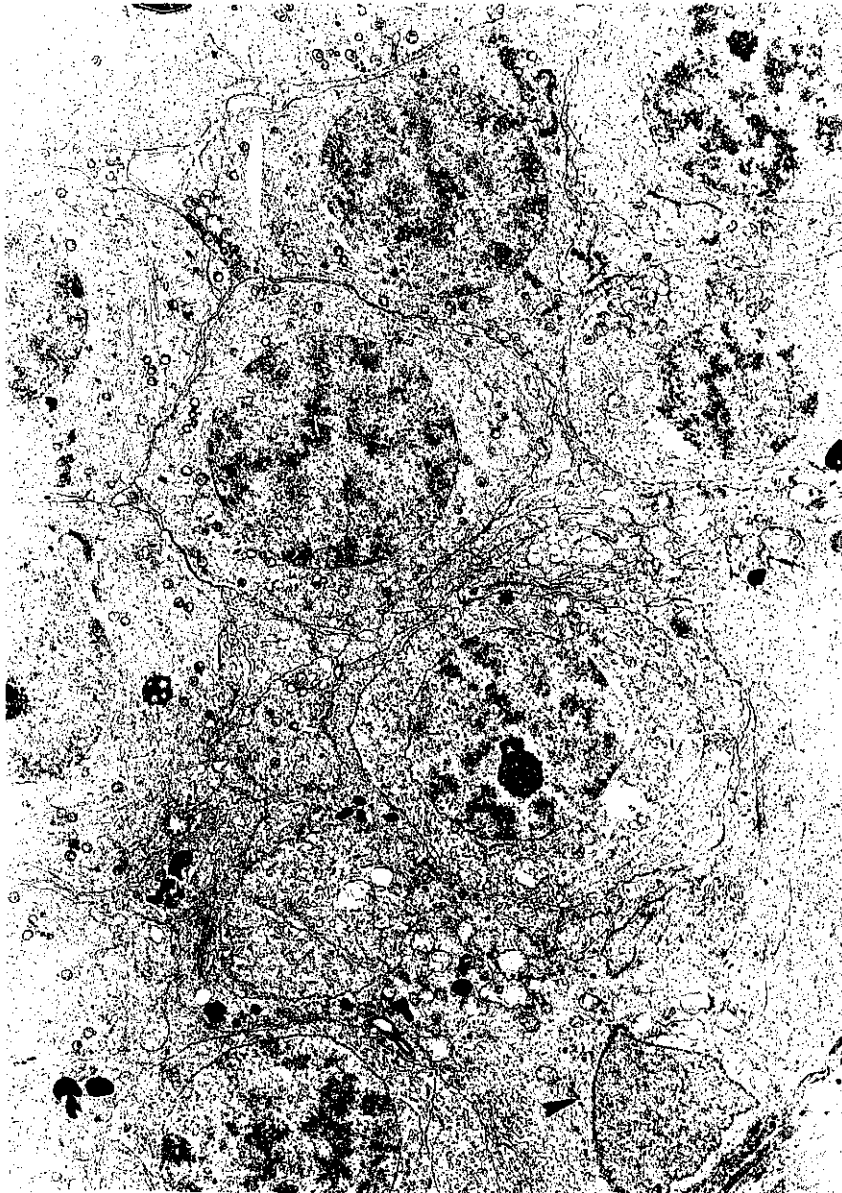


Fig 51. Túbulo seminífero en el que se observa una célula de Sertoli (▲) y espermatocitos primarios (*). x 1600.



Fig. 52. Espermatidas alargadas con acrosomas rodeando parte de los núcleos.
x 3000

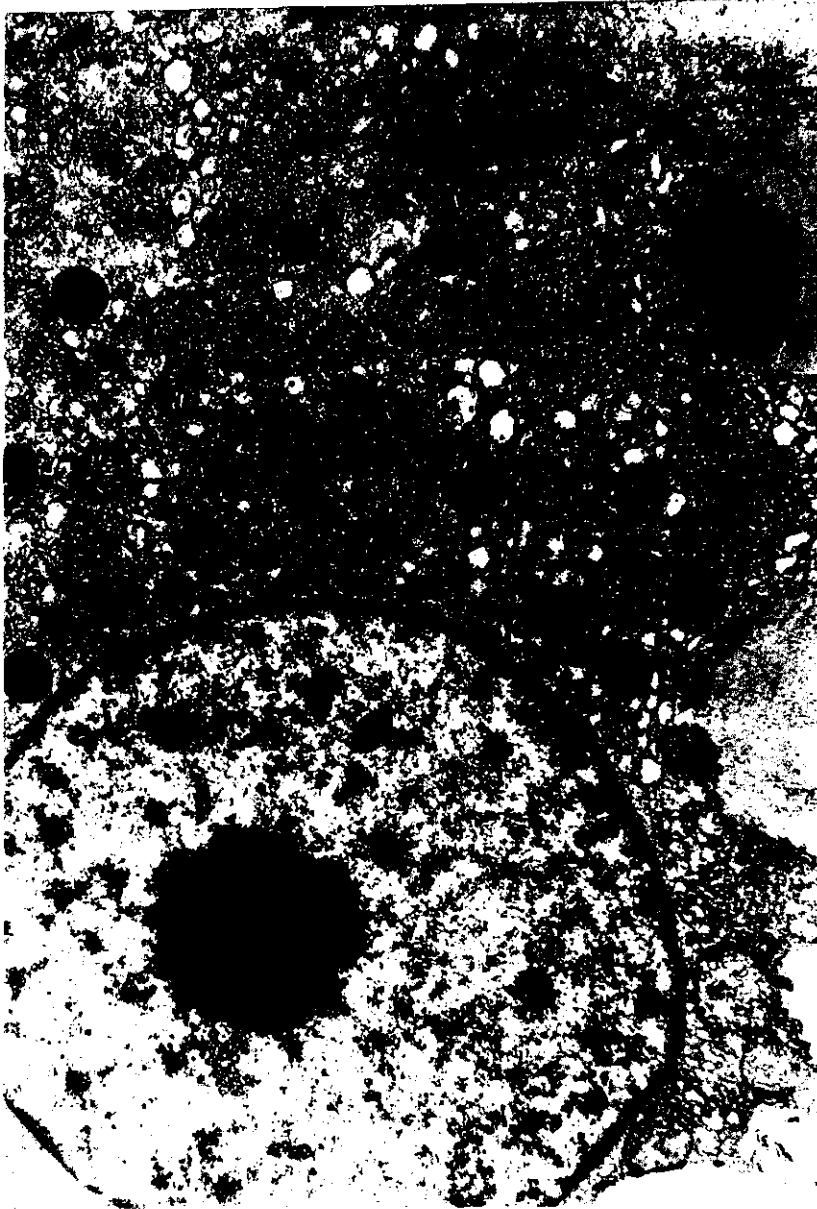


Fig. 53. Célula de Leydig, con abundante REL, mitocondrias de crestas tubulares y gotas lipídicas. x 6000.

FE DE ERRATAS

- . Pags. de 106 a 111: el aumento total de las imágenes histológicas es el indicado multiplicado por 3 (índice de conversión).
- . Pags. de 116 a 119: el aumento total de las imágenes histológicas es el indicado multiplicado por 3 (índice de conversión).
- . Pags. de 123 a 126: el aumento total de las imágenes histológicas es el indicado multiplicado por 3 (índice de conversión).
- . Pags. de 130 a 137: el aumento total de las imágenes histológicas es el indicado multiplicado por 3 (índice de conversión).

6. DISCUSSION

7. DISCUSION

Como ya hemos expuesto a lo largo de la revisión bibliográfica, el estudio histológico del aparato genital del macho, y concretamente del testículo, ha sido abordado por numerosos autores desde hace muchos años. Estas investigaciones han sido realizadas en diversas especies animales (bóvidos, óvidos, équidos, cerdos, perros, ratas, etc...), y en los diferentes campos científicos (histológico, fisiológico, inmunohistoquímico, ultraestructural, etc...). Algunos de ellos han estudiado en general todas las fases del desarrollo testicular, y otros se han centrado en fases concretas de su evolución.

Sin embargo, tal y como planteábamos en la introducción, son muy escasos los trabajos científicos que abordan el estudio del testículo de gato, y los pocos investigadores que han estudiado esta especie han centrado sus investigaciones en el testículo de animales adultos.

Para una mejor comprensión del proceso de maduración del testículo, algunos autores han dividido su evolución en diferentes fases de desarrollo. Así, en testículo humano, Nistal y Paniagua (1983) diferencian entre el periodo fetal, infantil, puberal y adulto. Flores y col. (1989a) en testículo equino, distinguen una fase prepuberal inicial hasta el año, una fase pre-puberal tardía hasta los 16 meses, una fase puberal hasta los 18 meses, y una fase adulta a partir de los 2 años. En nuestro trabajo los resultados obtenidos tanto histológica como ultraestructuralmente han presentado una serie de características comunes, que también nos ha permitido dividir el desarrollo del testículo del gato en cuatro fases bien definidas: perinatal, infantil, puberal y adulta.

Para la presentación de la discusión seguiremos el mismo orden, aunque en ocasiones tengamos que obviarlo para poder relacionar mejor los resultados obtenidos en las diferentes fases.

Durante la **fase perinatal** hemos podido comprobar, al igual que otros autores en diferentes especies, que la principal característica de los túbulos seminíferos es la ausencia de luces, hecho que es señalado por Sinowatz y Amselgruber (1986) en bóvidos, y por Flores y col.(1989a) en équidos.

La pared de los túbulos seminíferos, aparece tapizada por numerosas células de Sertoli y un escaso número de células germinales. Las células de Sertoli inmaduras se caracterizan por tener un núcleo ovoideo de contorno algo irregular localizado a diferentes alturas. Algunos autores describen dos tipos diferentes de células de Sertoli inmaduras, así en testículo humano Vilar (1970) observa células de Sertoli claras y oscuras, mientras que Hadziselimovic y Seguchi (1974) describen unas células de Sertoli redondas y basales y otras células de Sertoli alargadas. Nosotros hemos observado un solo tipo y al igual que otros autores (Nistal y col. 1982), creemos que estas dos variedades de célula de Sertoli descritas en testículo humano, podrían aparecer como consecuencia de una mala fijación del tejido.

En el estudio ultraestructural de las células de Sertoli inmaduras destacamos el desarrollo que presenta el RER, el cual se dispone en filas paralelas o en formaciones concéntricas. Nistal y Paniagua (1983) relacionan el desarrollo de esta organela con la secreción de hormona anti-Mülleriana, glicoproteína de gran importancia en la diferenciación sexual del macho. Esta hormona ha sido detectada inmunohistoquímicamente en el RER de células de Sertoli inmaduras de fetos de bóvidos de 50 a 80 días (Waites y col., 1985). En cerdos se han observado niveles máximos a los 33 días de la fecundación y se mantienen muy elevados hasta el nacimiento, momento a partir del cual su concentración disminuye (van Vorstenbosch y col., 1984).

En los túbulos seminíferos de testículo humano, Paniagua y Nistal (1984) describen la presencia de varios tipos de células germinales, los gonocitos que desaparecen tras el nacimiento, las espermatogonias fetales, que persisten durante toda la infancia y que se diferencian de las anteriores por su gran tamaño, y tres variedades de espermatogonias tipo A. Algunos investigadores consideran que las células germinales que aparecen en la etapa perinatal no son comparables con las que aparecen en el animal adulto (Vilar, 1970). Sin embargo Paniagua y Nistal (1984) señalan que

la terminología por ellos utilizada es correcta, ya que, ultraestructuralmente, las espermatogonias tipo A presentan mucha similitud con las células del mismo nombre que aparecen en testículo adulto.

En testículo de gato, durante esta primera fase, nosotros hemos encontrado dos variedades de espermatogonias tipo A, un escaso número de espermatogonias fetales y algunas espermatogonias con signos evidentes de degeneración ocupando la zona central de algunos túbulos seminíferos. La presencia de estas últimas células degeneradas ha sido observada también tras el nacimiento en conejo por Gondos y col. (1973), y en humana por Paniagua y Nistal (1984), los cuales indican que son espermatogonias en fases finales de degeneración y que su presencia es indicativa de la renovación constante a la que están sometidas estas células.

En el estudio ultraestructural de las células germinales coincidimos con la mayoría de los autores (Gondos y col., 1973. Paniagua y Nistal, 1984), que señalan la escasa presencia de organelas en su citoplasma.

Otro hecho característico que hemos encontrado entre las células de los túbulos seminíferos durante este periodo, ha sido la presencia de mitosis. Clermont y Perey (1957), describen la presencia de grandes y pequeñas mitosis entre las células de los túbulos seminíferos en ratas inmaduras. Las primeras se dan entre los gonocitos y aparecen a a partir del cuarto día. Las segundas se observan entre las células de soporte y duran desde el sexto al día 18.

En testículo humano, las mitosis en las células de Sertoli cesan tras el nacimiento (Nistal y col., 1982). Sin embargo en testículo de rata aparecen durante las dos primeras semanas de vida, coincidiendo con un aumento en el número de receptores para la FSH en las células de Sertoli. Estos hechos son explicados porque la FSH y la LH ejercen una acción muy importante sobre el desarrollo testicular, interactuando con los receptores de membrana expresados en las células de Sertoli y de Leydig respectivamente (Bortolussi y col. 1990).

Alrededor de los túbulos seminíferos, observamos una fina membrana basal, alrededor de la cual se disponen dos o tres capas de células fibroblásticas, que ultraestructuralmente se caracterizan por tener en su citoplasma RER como organela más destacable. Estos resultados difieren en parte con los obtenidos por otros autores

en distintas especies. Bustos-Obregón y Courot (1974), encuentran que, en óvidos de una semana de edad, la membrana basal tiene una apariencia multilaminar y, externamente a ella, existen dos o tres capas de células fibroblásticas, de las cuales, las células de la más interna tienen en el citoplasma filamentos de 80 Å de diámetro. En bóvidos de cuatro semanas de vida, Sinowitz y Amselgruber (1986) describen también una membrana basal multilaminar, y externamente, una o dos capas de células fibroblásticas que son identificadas como células peritubulares contráctiles.

Entre las células peritubulares, también hemos observado mitosis, fenómeno que ya ha sido señalado por otros autores como Leeson y Forman (1981) en conejos de hasta 28 días de edad.

Durante la fase perinatal, la utilización de técnicas inmunohistoquímicas para la valoración de la presencia de filamentos intermedios en las células de los túbulos seminíferos, nos ha puesto en evidencia la escasa presencia de éstos. Así encontramos que frente a la vimentina existe débil positividad, casi nula, en las células de Sertoli y frente a la desmina la inmunotinción ha sido totalmente nula en las células peritubulares. Van Vorstenbosch y col. (1984b), en testículo fetal y neonatal de cerdo, obtienen resultados análogos a los nuestros. Nosotros consideramos que la débil positividad que hemos detectado puede ser debida a la inmadurez de las células de Sertoli durante esta fase.

En el caso de la desmina nuestros resultados no coinciden con los obtenidos por Virtanen y col. (1986) en ratas recién nacidas, donde evidencian una capa de células peritubulares positivas a este filamento; estos autores indican que dichas células son de naturaleza muscular y que pueden ser identificadas como tal, antes de su maduración.

Es muy escasa la bibliografía con respecto al estudio de los túbulos rectos y red testicular durante la primera fase del desarrollo postnatal. Al igual que Wrobel y col. (1986) encontramos que la transición entre los túbulos seminíferos y túbulos rectos en esta primera fase se produce de manera brusca. Túbulos seminíferos, en los cuales sólo existen células de Sertoli, se continúan con túbulos que presentan un epitelio cilíndrico bajo. Estos autores describen también, en testículos de bóvidos de pocos días de edad, túbulos rectos con una estrecha luz y un epitelio estratificado que presenta canalículos

intracelulares. En nuestro estudio observamos que los túbulos rectos presentan una estrecha luz, pero, a diferencia de lo descrito en bóvidos, su pared está tapizada por un epitelio cilíndrico bajo con escasas y cortas prolongaciones en la zona apical.

Los túbulos rectos se continúan a nivel del mediastino testicular, con una red testicular mediastínica axial, integrada por unos canales de forma irregular tapizados por un epitelio cúbico, y con una red albugínea localizada en el polo craneal del testículo e inmediatamente debajo de la cápsula testicular. Esta organización de la red testicular es análoga a la descrita por Benoit (1926) y por Dym (1976) en diversos mamíferos, y la identifican como una red de tipo axial.

El estudio inmunohistoquímico nos muestra la reacción tan evidente que presentan las células epiteliales de estas estructuras, frente a las citoqueratinas de amplio espectro y frente a la vimentina. Estos resultados coinciden totalmente con los presentados por Dingess y col. (1991), que describen la coexpresión de ambos filamentos en las células epiteliales de los túbulos rectos y red testicular. Para estos autores la coexpresión de ambos filamentos es normal ya que estas estructuras derivan en su desarrollo embriológico de los túbulos mesonéfricos.

El empleo del suero anti-citoqueratinas nos ha permitido localizar la zona exacta del inicio de los túbulos rectos, ya que en ella aparecen células claramente positivas a este filamento intermedio, mientras que en la zona anterior, integrada únicamente por células de Sertoli, no presentó ninguna inmunotinción.

Otro hecho destacable que hemos encontrado durante esta fase es el gran desarrollo del intersticio. Wrobel y col. (1988), señalan que, en bóvidos recién nacidos, el intersticio supone un 50% de todo el tejido testicular, mientras que a las 30 semanas se ha reducido hasta un 20% aproximadamente.

En nuestro estudio histológico comprobamos que el principal elemento intersticial son las células de Leydig poligonales de núcleo redondo y excéntrico, que tienden a organizarse en grupos de forma y número de elementos variable, dependiendo de su localización: así, los grupos localizados entre los túbulos son de forma triangular y contienen un menor número de elementos celulares, los localizados debajo de la túnica albugínea son alargados, y los localizados en el mediastínico son más amplios

y de forma irregular. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Wrobel y Hees (1987) también en testículo de gato pero de animal adulto. A las células de Leydig localizadas debajo de la túnica albugínea y en el mediastino testicular las denominan "células de Leydig heterotópicas", y consideran además que las últimas suponen un aporte importante de andrógenos para la cabeza del epidídimo.

Ultraestructuralmente las células de Leydig se caracterizaron por el gran desarrollo del REL, la presencia de numerosas mitocondrias y de algunas gotas lipídicas. Células con iguales características fueron observadas por van Vorstenbosh y col. (1984a) en testículo de cerdo durante el periodo fetal tardío y postnatal temprano. Estos autores las identifican como células de Leydig fetales, muy activas durante este periodo. En cerdos, la esteroidogénesis empieza a los 30-35 días postfecundación, y coincide con una gran diferenciación de las células de Leydig, las cuales contienen abundante REL (Waites y col., 1985).

En testículo humano, las células de Leydig fetales se diferencian alrededor de la octava semana de gestación, y sus precursores son células mesenquimatosas indiferenciadas (Gondos, 1977). Su diferenciación es atribuida al estímulo que supone la síntesis por parte de la placenta de gonadotropina coriónica humana (hCG), que actúa sobre receptores de membrana existentes en las células de Leydig. Valores altos de hCG son hallados desde la 8 a la 17 semana de gestación.

Otro hallazgo ultraestructural interesante que hemos encontrado en las células de Leydig fetales es la presencia de una membrana basal alrededor de los grupos de células de Leydig. Esta estructura ha sido descrita anteriormente en el perro (Connell y Christensen, 1975), así como en el hombre y en la rata (Kuopio y col., 1989).

Codesal y col. (1990), en un estudio en testículo humano, comprueban que la mayoría de las células de Leydig fetales, desde la 13^a semana de gestación hasta el 8^o mes tras el nacimiento, son positivas al método PAP anti-testosterona, demostrando así la alta actividad secretora de estas células durante ese periodo, fenómeno que también nosotros hemos podido comprobar, utilizando la misma técnica en testículo de gato, durante la fase perinatal.

Respecto a otros resultados inmunohistoquímicos obtenidos en el intersticio, destacamos la inmunotinción que presentaron la mayoría de las células de Leydig

fetales frente al filamento intermedio vimentina, hecho que ya ha sido señalado en diferentes especies por otros autores (Franke y col., 1978; Miettinen y col., 1985), y la positividad evidente pero discontinua frente al colágeno tipo IV y laminina, detectada en la membrana basal existente alrededor de los grupos de células de Leydig. La laminina juega un papel importante en los procesos de adhesión celular, morfogénesis y migración celular, mientras que el colágeno tipo IV actúa como "columna vertebral" de las membranas basales (DeLellis, 1988). Kuopio y col. (1989), observan grupos de células de Leydig rodeados por una membrana basal, positiva en toda su extensión a laminina y a colágeno tipo IV; estos autores destacan sobre todo el papel que desempeña la laminina en los procesos de diferenciación que sufren las células de Leydig hasta su maduración.

En la cápsula albugínea, durante la fase perinatal, hemos diferenciado histológicamente dos zonas: una zona externa integrada por un tejido conjuntivo más laxo con fibroblastos de morfología entre ovoidea y estrellada, y una zona interna donde el tejido conjuntivo es más denso, con fibroblastos más alargados, y en la que se localiza la mayoría de los vasos. A esta zona rica en vasos se le denomina túnica vascular; en perros y óvidos tiene una localización superficial, mientras que en cerdos y équidos aparece, como en nuestro caso, en la zona más interna de la cápsula (Banks, 1993).

La presencia de células contráctiles en la cápsula testicular, ha sido descrita en conejo (Holstein, 1967) y en rata, perro y gato (Leeson y Cookson, 1974). La función de estos elementos está relacionada con el mantenimiento de una correcta presión dentro del testículo, necesaria para regular el movimiento de fluidos (Setchell, 1978). Leeson (1975), en la cápsula testicular de rata, observa células musculares lisas inmediatamente después del nacimiento, y Leeson y Forman (1981), en testículo de conejo, encuentran que algunas células musculares lisas empiezan a diferenciarse, en animales de 5 días de edad. En nuestro caso, no hemos podido evidenciar ultraestructuralmente durante esta fase fibras musculares lisas, y al realizar la técnica del PAP anti-desmina no hemos encontrado ningún elemento positivo a este filamento intermedio, presente en el citoplasma de células de naturaleza muscular.

Durante el **periodo infantil**, hemos observado que el parénquima testicular queda organizado en lobulillos testiculares mediante el desarrollo de tabiques de tejido conjuntivo incompletos, que penetran desde la cápsula hacia el interior del órgano. Una organización análoga ha sido descrita en el testículo equino a partir de la fase prepuberal tardía (Flores y col. 1989).

Los túbulos seminíferos siguen careciendo de luz, su diámetro ha disminuido y su elemento principal continúa siendo la célula de Sertoli, la cual aparece en menor número y con el núcleo en posición basal, por lo que se pierde en parte la pseudoestratificación típica de la fase anterior. Un descenso progresivo del número de células de Sertoli por túbulo seminífero es también observado por Nistal y col. (1982) en testículo humano, desde el nacimiento hasta el comienzo de la pubertad, coincidiendo con una disminución del diámetro tubular. Estos mismos autores encuentran, sin embargo, que el número total de células de Sertoli por testículo se mantiene constante durante este periodo, hecho que es debido a que se produce simultáneamente un aumento en el número de túbulos seminíferos por unidad de área.

Pocas diferencias ultraestructurales hemos observado en las células de Sertoli, con respecto al periodo anterior. El núcleo tiene un contorno algo más irregular, y en el citoplasma se sigue observando, principalmente, RER, mitocondrias y extensas interdigitaciones entre las células de Sertoli vecinas; Nistal y Paniagua (1983), señalan la importancia de estas interdigitaciones y su presencia la relacionan con un mecanismo que facilitaría la redistribución de las células de Sertoli desde una disposición pseudoestratificada a una organización simple. Por lo demás, coincidimos con otros autores que indican que las células de Sertoli desde el nacimiento hasta el comienzo de la pubertad sufren pocos cambios (Flickinger, 1967; Nistal y Paniagua, 1983; Sinowatz y Amselgruber, 1986).

El número de células germinales en este periodo infantil, es todavía escaso y entre ellas diferenciamos las dos variedades de espermatogonias tipo A, que son las más numerosas, así como espermatogonias fetales y células germinales degeneradas que aparecen en menor número con respecto a la fase anterior. Nuestros resultados coinciden en parte con los obtenidos por Paniagua y Nistal (1984), que observan

espermatogonias fetales durante toda la infancia y espermatogonias degeneradas, desde el nacimiento hasta la pubertad.

Durante este periodo, se continúan observando mitosis entre las células de los túbulos seminíferos, las cuales consideramos que se producen entre las células germinales, ya que el número de células de Sertoli ha descendido con respecto al periodo anterior, mientras que el número de células germinales se mantiene más o menos constante. En la mayoría de las especies, las mitosis entre las células de Sertoli cesan tras el nacimiento (Nistal y col., 1982; Bortolussi y col. 1990). Sólo en bóvidos (Sinowazt y Amselgruber, 1986), se describe un aumento en el número de células de Sertoli durante la etapa infantil, coincidiendo además con un incremento del diámetro tubular.

Las modificaciones que sufre la lámina propia de los túbulos seminíferos tras el nacimiento, han sido estudiadas en diversas especies, comprobándose que éstas no siguen un patrón determinado. Así, en óvidos, el grosor de la membrana basal aumenta tras el nacimiento, a la vez que el número de capas de células peritubulares disminuye a 2 ó 3 (Bustos-Obregón y Courot, 1974). En testículo humano la membrana basal adquiere una estructura multilaminar, a la vez que se incrementa el número de capas de células peritubulares (Nistal y col. 1983), mientras que en bóvidos, pasa de estar integrada por una membrana basal de 2 μm de espesor con 1 ó 2 capas de células peritubulares a medir 3 μm y presentar alrededor 3 capas de células peritubulares, en animales de 16 semanas de edad (Wrobel y col. 1988).

En nuestro caso, hemos observado que la membrana basal presenta el mismo grosor con respecto al periodo anterior, y el número de capas de células peritubulares se reduce a una o dos.

El proceso de maduración de las células peritubulares hacia células mioideas se produce, en la mayoría de las especies, en fases tempranas del desarrollo testicular. Este hecho se caracteriza por la adquisición de miofilamentos, la presencia de microtúbulos y la aparición de cuerpos densos o de placas de unión, así como de vesículas de micropinocitosis y de una membrana basal rodeando a la célula (Leeson y Forman, 1981; Paniagua, 1993). En óvidos, estas células se diferencian en la primera semana tras el nacimiento (Bustos-Obregon y Courot, 1974), mientras que en bóvidos

se observan en animales de 8 semanas de edad (Wrobel y col., 1988). En nuestro estudio hemos comprobado que la maduración de estas células, en el testículo de gato, sigue un patrón diferente al descrito por los autores anteriormente citados; así, ultraestructuralmente, no encontramos miofilamentos, vesículas de micropinocitosis o membrana basal, por lo que consideramos que durante este periodo infantil estas células no han madurado aún y por tanto carecen de la ultraestructura descrita para las células mioides adultas.

En esta fase infantil, desde el punto de vista inmunohistoquímico, y a diferencia de los resultados obtenidos en los túbulos seminíferos durante el periodo perinatal, hemos encontrado, al igual que Franke y col. (1979) y Virtanen y col. (1986), positividad en las células de Sertoli frente a la vimentina. Para estos autores la presencia de este filamento intermedio es indicativo del origen mesenquimatoso de estas células y señalan su importancia en el mantenimiento de la complicada arquitectura celular. Chevalier y Dufaure (1982) señalan que el citoesqueleto de las células de Sertoli se organiza durante la etapa prepuberal.

En cuanto a los resultados obtenidos en la organización de los túbulos rectos y red testicular durante esta fase infantil, cabe destacar la presencia de los segmentos iniciales de los túbulos rectos, en el del tejido conjuntivo de los septos interlobulillares próximos al mediastino testicular; Viotto y col. (1993) a esta parte la denominan red testicular septal, que se continúa con la red mediastínica y posteriormente con la albugínea, claramente identificadas también en nuestro estudio.

Por otro lado el estudio histológico de estas estructuras nos muestra la presencia de luces, tanto en los túbulos rectos como en la red testicular, resultados que no coinciden con los de Dym (1976), el cual indica que una de las principales características de la red testicular en bóvidos prepuberales es la ausencia de luz.

Los resultados inmunohistoquímicos nos mostraron, al igual que en la fase anterior, la clara positividad de las células epiteliales de los túbulos rectos y red testicular, a las citoqueratinas de amplio espectro y a la vimentina, resultados que como

ya hemos indicado anteriormente coinciden con los obtenidos por Dinges y col. (1991) en testículo humano durante la fase infantil.

Para nosotros los cambios más drásticos que sufre el testículo durante esta fase infantil están localizados principalmente en el intersticio, el cual aparece disminuido cuantitativamente. Estos resultados obtenidos coinciden con los expresados por la mayoría de los autores, ya que tras el nacimiento se produce una drástica regresión de las células de Leydig fetales (van Vorstenbosch y col., 1984a; Nistal y col., 1986; Flores y col., 1989b; Kuopio y col., 1989; Codesal y col., 1990).

Durante esta fase hemos podido identificar dos tipos de células de Leydig: las fetales en vías de degeneración, que aparecen organizadas en grupos, y las infantiles, localizadas alrededor de los túbulos seminíferos. Las primeras son, ultraestructuralmente, similares a las células de Leydig fetales, pero aparecen en menor número y muestran signos evidentes de degeneración, presentando un núcleo de forma irregular y heterocromático, dilatación del REL y mitocondrias de matriz electrodensas. El segundo tipo de células que por su morfología se podrían identificar como células fibroblásticas, presentan muchas organelas en común con las células de Leydig, pero menos desarrolladas: REL, mitocondrias, gotas lipídicas, etc...

Resultados análogos a los nuestros han sido encontrados por Nistal y col. (1986) durante la etapa infantil humana y Flores y col. (1989b) en testículo equino durante la fase prepuberal. Ambos grupos de investigadores observan células de Leydig fetales en vías de degeneración, y células de Leydig infantiles o células pre-Leydig con una morfología similar a las células de Leydig infantiles observadas por nosotros. En testículo humano estas últimas se observan desde el nacimiento y su número desciende a partir de los 8 años de edad (Nistal y col. 1986). La transformación de células mesenquimatosas hacia nuevas células de Leydig, y la degeneración de células de Leydig fetales, se produce de manera simultánea (Wrobel y col. 1988). A estas células de Leydig inmaduras se las consideran progenitoras de la población adulta (Prince, 1984).

El estudio inmunohistoquímico con suero anti-testosterona nos ha mostrado la escasa actividad de las células de Leydig durante el periodo infantil. Resultados análogos han encontrado Nistal y col. (1986) en testículo humano, y Flores y col. (1989b) en testículo equino. Codesal y col. (1990) basándose en resultados inmunohistoquímicos similares a los nuestros, junto al hecho de que el número de células de Leydig infantiles aumenta a la vez que el número de células de Leydig fetales disminuye, llegan a la conclusión de que estas últimas células pueden sufrir dos tipos de procesos: algunas degeneran mientras que otras se diferencian hacia células de Leydig infantiles.

Otro resultado inmunohistoquímico interesante que obtuvimos fue la escasa positividad de las células de Leydig fetales e infantiles frente al filamento intermedio vimentina. Este hallazgo está en desacuerdo con los resultados obtenidos por van Vorstenbosch y col. (1984) en testículo de cerdo, los cuales encuentran una evidente positividad frente a este filamento intermedio en células de Leydig en estado de regresión, y relacionan su presencia con los cambios degenerativos que sufren estas células tras el nacimiento.

El estudio de la membrana basal existente alrededor de los grupos de células de Leydig fetales nos muestra resultados análogos a los observados en el periodo anterior, es decir, una positividad evidente pero discontinua frente a laminina y al colágeno IV. Estos hallazgos coinciden sólo en parte con los encontrados por Kuopio y col. (1989) en testículo de rata, ya que ellos además de evidenciar positividad en la membrana basal existente alrededor de los grupos de células de Leydig, también detectan reacción alrededor de las células de Leydig infantiles, hecho que nosotros no hemos podido constatar.

La cápsula albugínea, durante esta fase infantil, no ha presentado modificaciones importantes con respecto al periodo anterior. Seguimos sin observar células de naturaleza muscular, que como ya hemos señalado anteriormente están descritas en la cápsula del testículo de rata (Leeson, 1975) y en la de conejo (Leeson y Forman, 1981)

Los resultados obtenidos en testículos de gatos pertenecientes a la **fase puberal** mostraron diferencias muy marcadas con respecto al periodo anterior, encontrando además que algunas de las estructuras estudiadas presentaron ya características típicas del animal adulto. Uno de los hallazgos más característicos fue el predominio de los túbulos sobre el intersticio, hecho que no aparece en fases anteriores y que ha sido descrito en testículo equino durante el periodo prepuberal (Flores y col. 1989a).

El comienzo de la pubertad viene marcado por un aumento en el diámetro de los túbulos seminíferos como consecuencia del desarrollo del epitelio germinal (Nistal y Paniagua, 1983). Nosotros hemos observado que en esta fase la mayoría de los túbulos seminíferos han experimentado un aumento en el diámetro tubular, presentan luces y su pared está tapizada por células de Sertoli y varias capas de células pertenecientes a la línea germinal. Sinowatz y Amselgruber (1986) relacionan la aparición de luz en el interior de los túbulos con un incremento de la secreción de fluidos por parte de las células de Sertoli y con la degeneración de células germinales.

El estudio ultraestructural de las células de Sertoli nos muestra que éstas han sufrido cambios muy significativos en el proceso de maduración. Uno de los más llamativos lo hemos encontrado en el núcleo, el cual aparece muy eucromático, presenta un nucleolo muy desarrollado y tiene una profunda invaginación en la membrana nuclear. Estos resultados coinciden con los obtenidos en las células de Sertoli adultas de la mayoría de los mamíferos estudiados (Nistal y Paniagua, 1983; Sinowatz y Amselgruber, 1988; Flores y col. 1989a). Sin embargo no hemos hallado un nucleolo vesicular como aparece descrito en bóvidos (Sinowatz y Amselgruber, 1986), ni cuerpos satélites heterocromáticos que sí son observados en roedores (Flickinger, 1967). Nistal y Paniagua (1983) relacionan el patrón eucromático del núcleo y el desarrollo del nucleolo con un aumento en la actividad de la célula de Sertoli, que coincide con el inicio de la espermatogénesis, y el contorno irregular con un mayor intercambio entre el citoplasma y el nucleoplasma.

La célula de Sertoli se extiende desde la membrana basal hasta la luz del túbulo seminífero, siendo su contorno poco definido, ya que sus prolongaciones citoplasmáticas están rodeando a las células germinales. En el citoplasma de estas células hemos observado un REL muy desarrollado, un aparato de Golgi, numerosas

mitocondrias y escasa cantidad de RER. Estos resultados son análogos a los hallados en las células de Sertoli de otras especies estudiadas (Flickinger, 1967; Nistal y Paniagua, 1983; Sinowatz y Amselgruber, 1986; Ekstedt y col., 1986). La presencia de estas organelas se ha relacionado con la producción o transformación de hormonas que crearían un medio con una alta concentración de andrógenos, necesario para el proceso de transformación de las células germinales, con la secreción de un fluido rico en iones (Sinowatz y Amselgruber, 1988) y con la síntesis de proteínas como la ABP (proteína ligadora de andrógenos), plasminógeno y transferrina (Waites y col. 1985).

Las uniones entre las células de Sertoli adultas han sido descritas en numerosas especies. Consisten en uniones tipo ocluyentes que presentan asociadas microfilamentos y cisternas de RE en disposición paralela (Dym, 1973; Nagano y Suzuki, 1976; Russell, 1979). Estas estructuras son la base de la barrera hematotesticular, que en ratón queda establecida en animales de 16 días de edad (Nagano y Suzuki, 1976), en testículo humano se puede comenzar a observar a partir de los 8 años (Nistal y col., 1983), en bóvidos es funcional en animales de 24 semanas de vida (Sinowatz y Amselgruber, 1986) y en équidos es patente entre los 16 y 18 meses (Flores y col. 1989a).

En nuestro estudio hemos encontrado que, durante la fase puberal, este tipo de estructura solo aparece entre las células de Sertoli localizadas en aquellos túbulos que presentan luz y que además poseen varios tipos de células germinales en diferentes grados de maduración. La mayoría de los autores reconocen la gran influencia que tiene la formación de la barrera hematotesticular en el inicio de la espermatogénesis (Dym, 1973; Russell, 1979; Sinowatz y Amselgruber, 1986). Russell y col. (1989) relacionan también este hecho con la aparición de luces en el interior de los túbulos.

En las células de Sertoli también hemos observado uniones tipo desmosómicas con las células del epitelio germinal. Este tipo de unión ya ha sido descrita anteriormente por Russell (1979), que señala su importancia en la orientación y fijación de las células germinales a las células de Sertoli, evitando así su prematura liberación hacia la luz tubular.

Como ya hemos indicado, en algunos túbulos, durante esta fase puberal, aparecen varios tipos de células germinales en diferentes grados de maduración, aunque

la espermatogénesis no está totalmente establecida. Entre las células germinales hemos encontrado dos variedades de espermatogonias tipo A, espermatogonias tipo B, espermatocitos primarios en diferentes fases de división meiótica, un escaso número de espermatocitos secundario y algunas espermátidas redondas. Las espermatogonias tipo B aparecen por primera vez en esta fase y se caracterizan por ser células de menor tamaño, tener un núcleo totalmente esférico y estar algo más alejadas de la membrana basal del túbulo.

Estos resultados son análogos a los obtenidos por Foote y col. (1972) en testículo de perro, donde describe dos variedades de espermatogonias tipo A y una variedad de espermatogonia tipo B, y a los hallados por Pier (1985) en testículo de gato, aunque en este caso la nomenclatura utilizada por este autor varía algo con respecto a la nuestra, ya que habla de espermatogonias tipo A, espermatogonias In (intermedias) y espermatogonias tipo B.

En otras especies sin embargo los resultados difieren algo de los nuestros. Así en testículo humano se describen 4 variedades de espermatogonias tipo A y una de espermatogonia tipo B (Paniagua y col. 1987), mientras que en bóvidos, se diferencian tres variedades de espermatogonias tipo A, espermatogonias intermedias y espermatogonias tipo B (Ekstedt y col. 1986).

En testículo humano las espermatogonias tipo B aparecen por primera vez en testículos infantiles pero en número muy escaso, mientras que los espermatocitos primarios se observan a partir de los 8 ó 10 años de edad (Paniagua y Nistal, 1984). En nuestro caso hemos encontrado que, durante la fase puberal, existen espermatogonias tipo B en un alto porcentaje de túbulos seminíferos, mientras que los espermatocitos primarios sólo han sido observados en aquellos túbulos que presentaron luces.

La distribución de los espermatocitos primarios dentro de los túbulos seminíferos presenta una organización similar a la descrita por Russell (1977b) en testículo de rata. Hemos observado que los espermatocitos en preleptotene se localizan en el compartimiento basal del túbulo seminífero, es decir, por debajo de las uniones que integran la barrera hematotesticular, los espermatocitos en leptotene ocupan un compartimiento intermedio, mientras que el resto de los espermatocitos primarios se

localizan en el compartimiento luminal, es decir, por encima de la barrera hematotesticular.

Coincidimos con la mayoría de los autores (Clermont, 1963; Swierstra, 1968; Foote y col., 1972; Pier, 1985; Ekstedt y col., 1986; Paniagua y col., 1987) en que los espermátocitos secundarios son muy difíciles de observar, ya que rápidamente sufren una segunda división meiótica y se transforman en espermátidas.

En cuanto a la lámina propia de los túbulos seminíferos, durante esta fase puberal adquiere una organización definitiva e idéntica a la que presentará en el animal adulto. Aparece integrada por una membrana basal simple y alrededor de ella se dispone una sola capa de células peritubulares mioides. Esta organización es similar a la que presenta el testículo equino en la fase adulta (Flores y col. 1989a) y diferente a la que existe en óvidos (Bustos-Obregón y Courrot, 1974), en bóvidos (Wrobel y col. 1979) y en humana (Nistal y Paniagua, 1983), las cuales se caracterizan por tener una membrana basal de apariencia multilaminar, y de tres a cinco capas concéntricas de células peritubulares.

Con respecto a los resultados inmunohistoquímicos de los túbulos seminíferos durante esta fase puberal, algunos de los obtenidos fueron diferentes a los descritos en fases anteriores. Así frente a la vimentina encontramos una intensa inmunotinción en las células de Sertoli localizada principalmente alrededor del núcleo y en la periferia celular. Como ya hemos indicado anteriormente, Franke y col. (1979) consideran a este filamento típico de la célula de Sertoli adulta, y de vital importancia en el mantenimiento de la complicada arquitectura de estas células. En la membrana basal que existe alrededor de los túbulos seminíferos observamos una positividad media frente a la laminina y al colágeno tipo IV, ambos constituyentes esenciales de las membranas basales (DeLellis, 1988).

Uno de los resultados inmunohistoquímicos más interesantes que hemos encontrado es la reacción, por primera vez a lo largo de nuestro estudio, de las células peritubulares frente a la desmina y a la vimentina, aunque de manera débil. La desmina es considerada como un marcador específico de células mioides (Virtanen y col., 1986;

Anthony y Skinner, 1989), y su presencia está descrita en testículo adulto humano y de rata (Virtanen y col., 1986; Anthony y Skinner, 1989). Los resultados obtenidos en estas células nos hace considerar el hecho de que las células peritubulares mioides del testículo de gato presentan algunas características diferenciales con respecto a otras especies. Nosotros hemos detectado la desmina por primera vez y de manera muy débil, en la fase puberal, mientras que en ratas este filamento está ya presente en animales recién nacidos y se expresa de manera muy evidente en los adultos (Virtanen y col., 1986). Esto nos lleva a concluir que las células peritubulares mioides adultas del testículo de gato presentan desmina, pero en muy pequeña cantidad, lo que dificulta su inmunotinción.

En la zona de unión entre los túbulos seminíferos y túbulos rectos, hemos podido diferenciar dos zonas, al igual que Wrobel y col.(1986) en testículo bovino de 20 a 25 semanas de edad: un segmento inicial que presenta luz y está integrado por células de Sertoli formando una sola capa, y otro segmento sin luz integrado también sólo por células de Sertoli dispuestas en varias capas y que hacen protusión hacia el interior de la parte inicial de los túbulos rectos.

La red testicular presenta en esta fase una organización similar a la descrita por Viotto y col. (1993) en gato adulto. Se caracteriza por la presencia de tres partes diferentes: septal, mediastínica y albugínea, de las cuales la más desarrollada es la parte mediastínica, que consiste en una red de canales de luces amplias intercomunicados entre sí y dispuesto a lo largo de todo el mediastino testicular. Ultraestructuralmente las células epiteliales de la red testicular han presentado características similares en los tres segmentos. Destacamos la presencia de complejos de unión entre células adyacentes y la existencia de microvellosidades, estructuras también observadas por Wrobel y col. (1986) en testículo bovino.

Con respecto a la presencia de filamentos intermedios en las células epiteliales de los túbulos rectos y red testicular, estamos de acuerdo con los resultados obtenidos por Dingy y col. (1991), que señalan a las citoqueratinas y vimentinas como filamentos intermedios típicos de las células de estas estructuras. Sin embargo

queremos indicar que, aunque estos filamentos se expresan en fases anteriores, su positividad es más intensa en el periodo puberal.

Durante esta fase puberal, el intersticio sigue siendo escaso, aunque hemos encontrado algunas diferencias significativas con respecto al periodo anterior. Las células más numerosas son las células de Leydig poligonales, que como ya hemos indicado en fases anteriores, se encuentran reunidas formando grupos localizados entre los túbulos seminíferos, en el mediastino testicular y debajo de la túnica albugínea, organización idéntica a la descrita por Wrobel y Hees (1990) también en testículo felino.

Ultraestructuralmente estas células presentan características análogas a las células de Leydig adultas descritas en otras especies animales : un núcleo redondo y eucromático, un REL muy desarrollado, numerosas mitocondrias con crestas tubulares y vacuolas de grasa (Belt y Cavazos, 1967; Nistal y col., 1986; Lunstra y col., 1986; Flores y col., 1989). Todas estas organelas son indicativas de la capacidad que tienen estas células para la síntesis de hormonas esteroideas (Lunstra y col., 1986).

También queremos destacar la presencia entre las células de Leydig adyacentes de complejos de unión. Esta característica, también ha sido observada por Wrobel y col. (1986) en testículo bovino, los cuales indican, que las células de Leydig próximas a los vasos reciben señales gonadotrópicas y producen pequeñas moléculas mensajeras, capaces de pasar a través de los complejos de unión a células más distantes de los vasos. En definitiva, estas estructuras modularían la producción de andrógenos testiculares. Sin embargo, también hemos encontrado que existen algunas características diferenciales con las células de Leydig de bóvidos, donde se observan además un RER muy desarrollado (Wrobel y col., 1981).

Otro hallazgo ultraestructural interesante, que queremos destacar, es que la membrana basal observada alrededor de los grupos de células de Leydig en fases anteriores, apenas es evidente durante este periodo.

Por otro lado es llamativo el descenso que se produce en el número de células de Leydig infantiles, con respecto al periodo anterior. Estos resultados son análogos a los encontrados por Nistal y col. (1986) en testículo humano, donde describen cómo

a partir de los 8 años de edad aparecen células de Leydig adultas cuyo número va aumentando gradualmente, a la vez que va disminuyendo el número de células de Leydig infantiles.

La mayoría de los autores están de acuerdo en que las células de Leydig infantiles desaparecen durante la pubertad, a la vez que las células de Leydig adultas se diferencian a partir de fibroblastos intersticiales o células mesenquimatosas (Lunstra y col., 1986; Nistal y col., 1986; Kuopio y col., 1989).

En el estudio inmunohistoquímico del intersticio durante esta fase puberal, cabe destacar la intensa reacción que han presentado las células de Leydig adultas frente al suero anti-testosterona, terminando de verificar así la alta capacidad de estas células para la secreción de hormonas esteroideas. Estos hallazgos coinciden con los encontrados en el testículo humano (Nistal y col., 1986) y en testículo equino (Flores y col., 1989b) durante la fase puberal.

Estamos de acuerdo con Lunstra y col. (1986) que señalan que el comienzo de la pubertad está íntimamente relacionado con los cambios que se observan ultraestructuralmente en las células de Leydig y la capacidad que adquieren estas células para la producción de hormonas. A su vez, estos fenómenos coinciden con un aumento en el diámetro de los túbulos seminíferos y con la proliferación de las células germinales (van Straaten y Wensing, 1978).

También son interesantes los resultados inmunohistoquímicos que hemos obtenido alrededor de los grupos de células de Leydig, donde hemos encontrado una positividad muy débil frente a laminina y al colágeno tipo IV. Estos resultados son similares a los descritos por Kuopio y col. (1989) en testículo de rata. Para estos autores, la diferente positividad detectada en la membrana basal de las células de Leydig fetales y en las células de Leydig adultas frente a laminina y al colágeno IV, confirman el concepto de que se trata de dos poblaciones de células de Leydig diferentes.

Los resultados obtenidos en la cápsula durante esta etapa puberal nos muestran que ya no existe una diferencia tan marcada entre la superficie interna y externa, como

aparecía en fases previas. Como ya hemos indicado anteriormente, la localización de la túnica vascular es interna, al igual que la de cerdos y la de équidos (Banks, 1993).

En la **fase adulta** hemos incluido testículos de animales a partir de los 8-9 meses de edad, los cuales han presentado como características comunes, la presencia de túbulos seminíferos con luces amplias y el establecimiento completo de la espermatogénesis. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kirkpatrick (1985) que indican la presencia de espermatozoides en gatos a partir de los 8 meses de edad.

Entre las células de los túbulos seminíferos hemos podido diferenciar todos los elementos pertenecientes a la línea germinal: espermatogonias tipo A, espermatogonias tipo B, espermaticitos primarios en diferentes fases de división meiótica, espermaticitos secundarios, espermátidas redondas y alargadas, y espermatozoides desprendidos en la luz tubular.

El estudio de los túbulos seminíferos en diferentes cortes histológicos, nos ha permitido comprobar como éstos varían de aspecto a causa de las diferentes asociaciones celulares que contienen. Estos estados o asociaciones en los que se divide el ciclo del epitelio seminífero han sido estudiados en la mayoría de los mamíferos empleando diferentes criterios.

Para nuestro estudio hemos utilizado el criterio empleado por Clermont (1963) y Swierstra (1968), basado en la morfología y localización de las células germinales, y así hemos podido diferenciar 8 estadios o asociaciones. Como punto de partida del inicio del ciclo del epitelio seminífero, hemos tomado de referencia la aparición de una nueva generación de espermátidas redondas y la ausencia de espermatozoides (Swierstra, 1968; Foote y col., 1976).

Nuestros resultados son similares a los descritos en cerdo (Swierstra, 1968) y en perros (Foote y col., 1972), aunque presentando algunas diferencias: en ambas especies las espermatogonias tipo B aparecen a partir del estadio VI, mientras que en nuestro caso las hemos observado a partir del VII.

Nuestra descripción difiere también en parte, con la realizada por Pier (1985) en testículo de gato. Este autor, aunque señala la existencia de 8 asociaciones en el ciclo del epitelio seminífero del gato, observa las espermatogonias tipo B en los

estadios III y IV. Pensamos que estas diferencias son lógicas, ya que el criterio utilizado por Pier (1985) es el empleado por Leblond y Clermont (1952) basado en las diferentes fases del desarrollo del acrosoma de la espermátida.

Queremos así mismo indicar que, aunque nuestros resultados difieren de los obtenidos en testículo humano donde se describen 6 asociaciones celulares (Clermont, 1963), encontramos también algún punto en común, puesto que hemos observado que en algunos túbulos seminíferos pueden coexistir más de una asociación celular.

En el estudio ultraestructural de los túbulos seminíferos durante esta fase adulta destacamos el total establecimiento de la barrera hematotesticular, que divide a los túbulos en dos compartimientos: basal y adluminal. Cualquier alteración que afecte a la integridad de esta estructura originaría graves alteraciones en el microambiente creado en el túbulo seminífero, quedando seriamente dañada la espermatogénesis (Ekstedt y col., 1986).

En el citoplasma de las células de Sertoli hemos observado acúmulos de REL en aquellas zonas próximas a las espermátidas. Estas estructuras también han sido descritas en los testículos bovinos (Sinowatz y Amselgruber, 1988) y en humanos (Nistal y col., 1986).

Dentro de los túbulos seminíferos, entre las espermátidas que se hallan en idéntica fase de desarrollo, hemos hallado puentes intracitoplasmáticos. Para Dym y Fawcett (1970), esto es indicativo del origen común de estas células a partir de la misma espermatogonia.

Los resultados inmunohistoquímicos, obtenidos en el túbulo seminífero en esta fase, no han mostrado diferencias significativas con respecto al periodo puberal. Encontramos una inmunotinción intensa en las células de Sertoli frente al filamento intermedio vimentina, localizada principalmente alrededor del núcleo y en la periferia del citoplasma. Como ya hemos comentado, estos resultados son análogos a los obtenidos por Franke y col. (1979) en testículo de rata adulta.

También observamos una positividad fuerte alrededor de los túbulos seminíferos frente al colágeno tipo IV y laminina, marcadores ambos específicos de membranas basales (DeLellis, 1988).

El estudio ultraestructural e inmunocitoquímico de las células peritubulares mioides no ha reportado nada nuevo con respecto a la fase anterior, por lo que queremos recalcar lo ya señalado previamente, y es que las células mioides del testículo de gato presentan escasa cantidad de desmina en comparación con las de otras especies, como pueden ser las células mioides de la rata o las del hombre (Virtanen y col., 1986).

En esta fase adulta, en la zona de unión entre los túbulos seminíferos y los túbulos rectos hemos observado tres zonas bien definidas: una región de transición donde se observa como existe una pérdida gradual de los elementos germinales, una región intermedia integrada sólo por células de Sertoli dispuestas en una capa, y una región terminal que no presenta luz, donde existen varias capas de células de Sertoli, y que se introduce en la parte inicial de los túbulos rectos. Estos resultados son análogos a los hallados por Wrobel y col. (1986) en testículo bovino, y por Viotto y col. (1993) en testículo felino.

Uno de los resultados, que queremos destacar, es que el proceso de maduración que sufre la zona de unión entre los túbulos seminíferos y túbulos rectos, se produce en tres fases, y es similar al descrito por Wrobel y col. (1986) en testículo de bóvidos. Durante la fase perinatal e infantil existe una transición brusca entre túbulos seminíferos y túbulos rectos; en la fase puberal aparecen dos regiones bien definidas: una región donde existe una disminución del diámetro del túbulo y que está libre de células germinales, y una segunda región integrada por células de Sertoli dispuestas en varias capas y que hace protusión hacia el interior del túbulo recto; en la fase adulta encontramos que esta zona queda integrada por las tres regiones que hemos descrito anteriormente.

Encontramos que el resto de las estructuras que integran la red testicular, presentan características histológicas y ultraestructurales similares a las descritas por Dym (1976) en varios mamíferos, y por Viotto y col. (1993) en gato.

En cuanto a los hallazgos inmunohistoquímicos obtenidos en los túbulos rectos y red testicular, queremos indicar la intensa reacción que mostraron las células

epiteliales frente a las citoqueratinas de amplio espectro, resultados que, coinciden con los obtenidos en testículo humano adulto por Achtstätter y col. (1985).

A lo largo de nuestras investigaciones hemos podido comprobar, la positividad de las células epiteliales de los túbulos rectos y red testicular frente a las citoqueratinas de amplio espectro y a la vimentina, en las cuatro fases estudiadas. Sin embargo queremos destacar que, aunque la presencia de estos filamentos ha sido evidente desde la fase neonatal, esta positividad ha sido más marcada en las fases puberal y adulta. Estos resultados nos sugieren que, en el proceso de maduración de las células epiteliales de estas estructuras, se produce un aumento progresivo del número de filamentos intermedios.

Otro hecho que nos gustaría resaltar es que el patrón de distribución de estos filamentos ha sido diferente según la fase, y así durante el periodo perinatal e infantil encontramos que se localizaban principalmente en la región apical de las células epiteliales, mientras que en las fases puberal y adulta la distribución ha sido más homogénea a lo largo de todo el citoplasma. Este resultado está parcialmente en desacuerdo con el obtenido por Dinger y col. (1991), ya que durante la fase neonatal e infantil encuentran que la inmunorreacción frente a la vimentina y citoqueratinas es más o menos homogénea en todo el citoplasma, mientras que en la fase adulta la vimentina es más intensa en la base celular y las citoqueratinas en la superficie apical.

El intersticio, durante esta fase adulta, está integrado principalmente por células de Leydig adultas, ya que las células de Leydig infantiles han desaparecido.

Las características ultraestructurales de las células de Leydig, como ya vimos en la fase puberal, son similares a las descritas en las células de Leydig de otras especies animales: un gran desarrollo del REL, mitocondrias de crestas tubulares, gotas lipídicas... (Belt y Cavazos, 1967; Nistal y col., 1986; Lunstra y col., 1986; Flores y col., 1989b), organelas todas ellas típicas de una célula productora de hormonas esteroideas (Lunstra y col., 1986).

El estudio inmunohistoquímico del intersticio durante esta fase adulta nos muestra la fuerte inmunotinción que presentan la mayoría de las células de Leydig

frente al suero anti-testosterona, resultado similar a los obtenidos por Nistal y col. (1986) en testículo humano y por Flores y col. (1989b) en testículo equino.

Por los resultados obtenidos tanto histológicos como ultraestructurales e inmunohistoquímicos en el intersticio a lo largo de las cuatro fases estudiadas en el testículo de gato, consideramos que en el desarrollo de las células de Leydig existen tres estadios consecutivos: células de Leydig fetales, células de Leydig infantiles, y células de Leydig adultas. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones realizadas por Kuopio y col. (1989) en testículo de rata y con los resultados obtenidos por Codesal y col. (1990) en testículo humano. Resultados también similares son hallados por Flores y col. (1989b) en testículo equino, donde se describen tres poblaciones de células de Leydig: fetales, pre-Leydig y adultas.

A la vista de los resultados obtenidos a lo largo de nuestro estudio sobre la maduración testicular felina, hemos podido comprobar que, si bien este proceso tiene numerosos puntos en común con la maduración testicular de otros mamíferos estudiados, aparecen una serie de características propias claramente reflejadas en el desarrollo de esta investigación que no habían sido constatadas hasta la fecha y que nos gustaría ampliar y completar con futuras aportaciones.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1.- En el desarrollo del testículo del gato se pueden diferenciar cuatro fases histológicas bien definidas: perinatal, infantil, puberal y adulta.

2.- La barrera hematotesticular es evidente durante la fase puberal, en aquellos túbulos que presentan luz y estratificación de su epitelio germinal.

3.- Las células de Sertoli experimentan un aumento gradual del filamento intermedio vimentina durante el proceso de maduración testicular, evidenciándose por vez primera en la fase infantil y aumentando hasta la fase adulta.

4.- La maduración de las células peritubulares hacia mioides, se produce durante la fase puberal. Estas células se caracterizan, tanto en dicha fase como en la adulta, por la escasa cantidad observada del filamento intermedio desmina.

5.- Las células epiteliales tanto de los túbulos rectos como de la red testicular, presentan ya desde la fase perinatal, una coexpresión muy evidente a los filamentos intermedios vimentina y citoqueratinas.

6.- En las cuatro fases estudiadas las células de Leydig aparecen organizadas en grupos de forma y número de elementos integrantes variables, localizados entre los túbulos seminíferos, en el mediastino testicular por debajo de la cápsula testicular.

7.- En las fases perinatal e infantil se ha observado ultraestructuralmente, la presencia de una membrana basal discontinua alrededor de grupos de células de Leydig, que inmunohistoquímicamente es positiva a laminina y colágeno tipo IV.

Conclusiones

8.- El estudio inmunohistoquímico de las células de Leydig con el suero específico antitestosterona, evidencia la capacidad secretora de estas células durante las fases perinatal, puberal y adulta.

8. RESUMEN

RESUMEN

Hemos realizado un estudio histológico, ultraestructural e inmunohistoquímico del testículo del gato, desde la fase fetal tardía hasta alcanzar la madurez sexual, utilizando testículos de 51 animales obtenidos mediante castración o a partir de animales eutanasiados que no presentaron alteraciones testiculares.

El estudio histológico nos permitió dividir el desarrollo del testículo del gato en cuatro fases bien definidas: perinatal (feto a término a 1 mes de edad), infantil (1 a 4-4,5 meses), puberal (4-4,5 a 6-7 meses) y adulta (de 6-7 meses en adelante).

La fase perinatal se caracterizó por la presencia de pequeños túbulos seminíferos separados entre sí por abundante intersticio, el cual estaba integrado principalmente por células de Leydig fetales organizadas en grupos.

Durante este periodo evidenciamos positividad en las membranas basales de los túbulos seminíferos, túbulos rectos y red testicular frente a laminina y al colágeno tipo IV, y la coexpresión de las células epiteliales de los túbulos rectos y red testicular frente a la vimentina y las citoqueratinas, hechos que se repitieron a lo largo de todos los periodos estudiados. En el intersticio se observó inmunorreacción en las células de Leydig fetales frente a la vimentina y testosterona; así mismo, la membrana basal, evidenciada ultraestructuralmente alrededor de los grupos de células de Leydig, presentó una positividad evidente pero discontinua frente a laminina y a colágeno tipo IV, durante esta fase y la infantil.

El periodo infantil se caracterizó por presentar el parénquima testicular organizado en lobulillos testiculares mediante el desarrollo de tabiques incompletos de tejido conjuntivo. Los túbulos seminíferos carecían de luces, y en el intersticio, que estaba menos desarrollado que la fase anterior, se observaron dos tipos de células de Leydig: fetales en vías de degeneración e infantiles.

Entre los resultados obtenidos en este periodo queremos resaltar la positividad de las células de Sertoli frente a la vimentina y la ausencia de reacción de las células de Leydig frente a testosterona y a vimentina.

La principal característica de los testículos en la fase puberal fue que el desarrollo de los túbulos seminíferos no era uniforme, existiendo zonas con túbulos que carecían de luces, junto a otras donde los túbulos presentaron luces y estratificación del epitelio germinal. Ultraestructuralmente, en estos túbulos se observó que la barrera hematotesticular estaba ya establecida. En el intersticio comprobamos la escasa presencia de células de Leydig infantiles y de numerosas células de Leydig adultas.

En este periodo destacó la inmunotinción, que presentaron por primera vez las células peritubulares frente a desmina y a vimentina, hecho que también pudimos observar en la fase adulta. También cabe resaltar la existencia de numerosas células de Leydig positivas a testosterona.

La fase adulta se caracterizó por la presencia de túbulos seminíferos con amplias luces, donde la espermatogénesis estaba totalmente establecida, distinguiéndose además, ocho asociaciones celulares en el ciclo del epitelio seminífero. Queremos resaltar así mismo la intensa inmunotinción que presentaron la mayoría de las células de Leydig frente a la testosterona.

SUMMARY

We have accomplished a histological, ultrastructural and immunocytochemical study of the testicles of 51 cats ranging from late fetal stage to sexual maturity. Testicles were obtained by castration or from euthanized animals which presented no testicular alterations.

From the histological study, the development of the testicle of the cat could be divided in four distinct phases: perinatal (late fetal to the end of the first month), infantile (1 to 4-4.5 months), pubertal (4-4.5 to 6-7 months) and adult (from 6-7 months on).

The perinatal phase was characterized by the presence of small seminiferous tubules separated by abundant interstitial tissue, mainly comprised of fetal Leydig cells organized in groups. During this stage, positive cells to laminine and to type IV collagen were detected in the basal membranes of the seminiferous tubules, straight tubules and rete testis. Coexpression of vimentine and cytokeratins was detected in the epithelial cells of the straight tubules and the rete testis. This coexpression was also seen in all of the other stages. A marked immunoreaction against vimentine and testosterone was observed in fetal Leydig cells of the interstitium. Moreover, during both the perinatal and infantile phases, the basal membrane around the groups of Leydig cells presented an evident but discontinuous positive reaction to laminine and type IV collagen.

The infantile period was characterized by the presence of testicular parenchyma organized in testicular lobules by the development of incomplete walls of connective tissue. The seminiferous tubules presented no lumen, and in the interstitium, which was less developed than in the previous phase, we could observe two types of Leydig cells: degenerating fetal cells and infantile cells. During this phase, Sertoli cells were positive to vimentine and Leydig cells were negative to testosterone and vimentine.

The main characteristic of the testicles in the pubertal phase was that the development of the seminiferous tubules was not uniform. There were some areas where the tubules had no lumen, next to others where the tubules presented lumen and stratified germinal epithelium. Ultrastructurally, in these tubules the blood-testis barrier was already established. In the interstitium there were few infantile Leydig cells, but abundant adult Leydig cells. During this phase, the peritubular cells were positive to desmine and vimentine for the first time, a fact that we could also observe in the adult phase, along with numerous Leydig cells positive to testosterone.

The adult phase was characterized by the presence of seminiferous tubules with wide lumens, where spermatogenesis was totally established. Eight cellular associations could be distinguished in the cycle of the seminiferous epithelium. In the interstitium, most of the Leydig cells were positive for testosterone.

9. BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFIA

Achtstätter, T.; Moll, R.; Moore, B. and Franke, W.E. (1985). Cytokeratin polypeptide patterns of different epithelia of human male urogenital tract: immunofluorescence and gel electrophoretic studies. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33, 5, 415-426.

Allen, E. (1918) Studies on cell division in the albino rat. *J. Morph.* 133-185.

Amann, R.P. (1981). A review of anatomy and physiology of stallion. *J. Equine Vet. Sci.* 1, 83-105.

Amann, R.P.; Johnson, L. and Pickett, B.W. (1977) Connection between the seminiferous tubules and the efferent ducts in the stallion. *Am. J. Vet. Res.* 38, 10, 1571-1579.

Amann, R.P. and Schanbacher, B.D. (1983). Physiology of male reproduction. *J. An. Sci.* 57, 2, 380-403.

Amlani, S. and Vogl, A.W. (1988) Changes in the distribution of the microtubules and intermediate filaments in mammalian Sertoli cells during spermatogenesis. *The Anat. Rec.* 220, 143-160.

Anthony, C. T. and Skinner, M. K. (1989) Cytochemical and biochemical characterization of testicular peritubular myoid cells. *Biology of reproduction.* 40, 811-823.

Banks, W.J. (1993). *Applied Veterinary Histology. Third Edition.* Mosby Year Book.

- Bascom, K. F. and Osterud, H. L.** (1927) Quantitative studies of the testis. III. A numerical treatment of the development of the pig testis. *Anat. Rec.* 37, 63-82.
- Baumans, V.; Dijkstra, G. and Wensing, C.J.G.** (1981) Testicular descent in the dog. *Anat. Histol. Embryol.* 10, 97-110.
- Benoit, J.M.** (1926). Recherches anatomiques cytologiques et histologiques sur les voies excrétrices du testicule chez les mammifères. *Arch. Anat. Micr.* 5, 175-412
- Belt, W.D. and Cavazos, L.F.** (1967) Fine structure of the interstitial cells of Leydig in the boar. *Anat. Rec.* 158, 333-350.
- Bookhout, C.G.** (1937) The germ cell cycle in the guinea pig. The postnatal development of the testis. *Z. Zellforsch.* 25, 749-763.
- Bortolussi, M.; Zanchetta, R.; Belvedere, P. and Colombo, L.** (1990) Sertoli and Leydig cell numbers and gonadotropin receptors in rat testis from birth to puberty. *Cell Tissue Res.* 260, 185-191.
- Brökelmann, J.** (1962) Fine structure of germ cells and Sertoli cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Zeitschrift für Zellforschung* 59, 820-850.
- Burke, T.J.** (1986). Small animal reproduction and infertility. C. 1. Physiology of Reproduction. 19-21. Ed. Lea-Febriger.
- Bustos-Obregon, E. and Courot, M.** (1974). Ultrastructure of the lamina propria in the ovine seminiferous tubule. *Cell. Tiss. Res.* 150, 481-492.
- Charny, C.W.; Conston, A.S. and Meranze, D.R.** (1952) Testicular development histology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55, 597-608.

- Chevalier, M. and Dufaure, J.P.** (1982). Cytoskeleton of the Sertoli cell: effects of FSH and testosterone in the immature pig testis. *Annals N. Y. Academy Sciences*, 383, 433-434.
- Christensen, A. K. and Fawcett, D.W.** (1966) The fine structure of testicular interstitial cells mice. *Am. J. Anat.* 118, 551-572.
- Clark, R.V.** (1976) Three-dimensional organization of testicular interstitial tissue and lymphatic space in the rat. *Anat. Rec.* 184, 203-226.
- Clermont, Y.** (1958) Contractile elements in the limiting membrane of the seminiferous tubules of the rat. *Experimental Cell Research*, 15, 438-440.
- Clermont, Y.** (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J. Anat.* 112, 35-51
- Clermont, Y. and Leblond, C.P.** (1959) Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, *Macacus rhesus*. *Am. J. Anat.* 104, 237-273.
- Clermont, Y.; McCoshen, J. and Hermo, L.** (1980) Evolution of the endoplasmic reticulum in the Sertoli cell cytoplasm encapsulating the heads of late spermatids in the rat. *Anat. Rec.* 196, 83-99.
- Clermont, Y. and Perey, B.** (1957) Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in the immature rats. *Am. J. Anat.* 100, 241-267.
- Codesal, J.; Regadera, J.; Nistal, M.; Regaderas-Sejas, J. and Paniagua, R.** (1990) Involution of human fetal Leydig cells. An immunohistochemical, ultrastructural an quantitative study. *J. Anat.* 172, 103-114.

- Connell, C.J.** (1973). The ultrastructure of the testicular interstitial tissue of the dog. *Anat. Rec.* 175, 296.
- Connell, C.J.** (1976). Scanning electron microscope study of the interstitial tissue of the canine testis. *Anat. Rec.* 185, 389-402.
- Courot, M.** (1962). Developpement du testicule chez l'agneau. Establissement de la spermatogenese. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 2, 25-42.
- Cuevas, P.; Ying, S-Y.; Ling, N.; Ueno, N.; Esch, F. and Guillemin, R.** (1987). Immunohistochemical detection of inhibin in the gonad. *Biochemical and Biophysical Research communications* 142, 1, 23-30.
- DeLellis, R. A.** (1988). *Advances in Immunohistochemistry*. Raven Press. New York.
- Delhon, G. A. and von Lawzewitsch, I.** (1985). Aparato reproductor masculino comparado. En *Lecciones de Histología Veterinaria*. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- Dellmann, H.D.** (1993). *Textbook of Veterinary Histology*. Fourth edition. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Dinges, H. P.; Zatloukal, K.; Schmidt, C.; Mairs, S. and Wirnsherger, G.** (1991). Co-expression of cytokeratin and vimentin filament in rete testis and epididymis. An immunohistochemical study. *Virchows Archiv A. Pathol. Anat.* 418, 119-127.
- Dyce, K.M.; Sack, W.O. and Wensing, C.J.G.** (1987). *Textbook of Veterinary Anatomy*. Ch. 15: The pelvis and reproductive organs of the carnivores. pp. 436-441. W.B. Ed. Saunders Philadelphia.

Bibliografía

Dym, M. (1973). The fine structure of the monkey (*Macaca*) Sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier. *Anat. Rec.* 175, 639-656.

Dym, M. (1974). The fine structure of monkey Sertoli cells in the transitional zone at the junctional of the seminiferous tubules with the tubuli recti. *Am J. Anat.* 140., 1-26.

Dym, M. (1976). The mammalian rete-testis. A morphological examination. *Anat. Rec.* 186, 493-524.

Dym, M. and Fawcett, D.W. (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* 3, 308-326.

Ekstedt, E.; Söderquist and Plöen, L. (1986). Fine structure of spermatogenesis and Sertoli cell (epitheliocytus sustentans) in the bull. *Anat. Histol. Embryol.* 15, 23-48.

Elcock, L. H. and Schoning, P. (1984). Age-related changes in the cat testis and epididymis. *Am. J. Vet. Res.* 45,11, 2380-2384

Fawcett, D. W. (1987). *Tratado de Histología.* Bloom-Fawcett. 11 ed. Interamericana, Madrid.

Fawcett, W. and Burgos, H. (1956). The fine structure of Sertoli cells in the human testis. *Anat. Rec.* 124, 401-402.

Fawcett, D.W.; Heidger, P.M. and Leak, L.V. (1969). Lymph vascular system of the interstitial tissue of the testis as revealed by electron microscopy. *J. Reprod. Fert.* 19, 109-119.

Bibliografía

Fawcett, D.W.; Neaves, W.B. and Flores, M.N. (1973). Comparative observations of intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.* 9, 500-532.

Flickinger, C.J. (1967). The postnatal development of the Sertoli cells of the mouse. *Zeitschrift für Zellforschung* 78, 92-113.

Flickinger, C. and Fawcett, D.W. (1967). The junctional specialization of Sertoli cells in the seminiferous epithelium. *Anat. Rec.* 158, 207-222

Flores, J.M.; Gonzalez, M.; Pizarro, M. and Sánchez, B. (1989a). Estudio evolutivo morfológico del epitelio seminífero equino. *Histología Médica* 5, 109-110.

Flores, J.M.; Gonzalez, M.; Sánchez, B. and Pizarro, M. (1989b). Estudio histológico de las células de Leydig en testículo equino de diferentes edades. *Histología Médica.* 5, 111-112.

Foote, R. H.; Swierstra, E. E. and Hunt, W. L. (1972). Spermatogenesis in the dog. *Anat. Rec.* 173, 341-352.

Franke, W.W.; Grund, C. and Schmid, E. (1979). Intermediate sized filaments present in Sertoli cells are of the vimentin type. *European Journal of Cell Biology.* 19, 269-275.

Fritz, I. B.; Rommerts, F. G.; Louis, B. G. and Dorrington J. H. (1976). Regulation by FSH and dibutyryl cyclic AMP of the formation of androgen-binding protein in Sertoli cell-enriched cultures. *J. Reprod. Fert.* 46, 17-24.

Garde, S. V.; Moodbidri, S. B.; Phadke, A. M. and Sheth A. R. (1988). Localization of inhibin in human testes by immunoperoxidase technique. *Anat. Rec.* 222, 357-361.

- Getty, R.** (1975). Sisson and Grossman. The anatomy of domestic animals, 5a ed. Ed. W. B. Saunders Co. Philadelphia.
- Gier, H. T. and Marion, G. B.** (1969). Development of the mammalian testis and genital ducts. Biol. Reprod. 1, 1.
- Gillman, J.** (1948). The development of the gonads in man with consideration of the role of fetal endocrines and the histogenesis of ovarian tumors. Contr. Embryol. 32, 83-131.
- Gondos, B.; Renston, R. H. and Conner, L. A.** (1973). Ultrastructure of germ cells and Sertoli cells in the postnatal rabbit testis. Am. J. Anat. 136, 427-440.
- Gondos, B.** (1977). Testicular development. The testis, vol. 4. Ed. A. D. Johnson and W. R. Gomes. New York: Academic Press.
- Gonzalez-Angulo, M.; Hernandez-Jauregui, P. and Martinez-Zedilo, H.** (1975). Fine structure of the gonads of the horse and its functional implications. J. Rep. Fert. 23, 536-567.
- Grove, B. D.; Pfeiffer, D. C. Allen, S. and Vogl, A. W.** (1990). Immunofluorescence localization of vinculin in ectoplasmic ("junctional") specializations of rat Sertoli cells. Am. J. Anat. 188, 44-56.
- Hadziselimovic, F. and Seguchi, H.** (1974). Ultramikroskopische untersuchungen an tubulus seminiferous bei kindern von der geburt bis zur pubertät. II. Entwicklung und morphologie der Sertolizellen. Verhandlungen der anatomischen Gessellschaft, Anatomischer Anzeiger 68, 140-161.

- Hermo, L. and Dworkin** (1988). Transitional cells at the junction of seminiferous tubules with the rete testis of the rat: their fine structure, endocytic activity and basement membrane. *Am. J. Anat.* 181, 111-131.
- Herrera, J.; Sosa, M.; Ayala, F.; Galina, C.; Hernandez-Jauregui, P. and Bermudez, J. A.** (1983). Morphophysiological correlation of boar Leydig cell during postnatal stage. *Cornell Vet.* 73, 67-75.
- Holstein, A. F.** (1967). Muskulatur and motilität des Nebenhodens beim kanindrem. *Zeitschrift fur Zellfors. Mikroskopische Anatomie* 76, 498-510.
- Hooker, C.W.** (1944). The postnatal history and functions of the interstitial cells of the testis of the bull. *Am. J. Anat.* 74, 1-38.
- Hutson, J. C. and Stocco, D. M.** (1981). Peritubular cell influence on the efficiency of androgen-binding protein secretion by Sertoli cells in culture. *Endocrinology.* 108, 4, 1362-1368.
- Jost, A.; Magre, S. and Cressent, M.** (1974). Sertoli cells and early testicular differentiation. In: "Male fertility and sterility" pp 1-11. Eds. R.E. Mancini, and Martini, L. Acad. Press.
- Kirkpatrick, J. F.** (1985). Seasonal testosterone levels, testosterone clearance, and testicular weights in male domestic cats. *Canada Journal Zool.* 63, 1285-1287.
- Kirkham, W. B.** (1915). The germ cycle in the mouse. *Anat. Rec.* 10, 217-219.
- Kothari, L. K.; Srivastava, D. K.; Mishra, P. and Patni, M. K.** (1972). Total Leydig cell volume and its estimation in dogs and in models of testis. *Anat. Rec.* 174, 259-264.

Kuopio, T.; Paranko, J. and Pelliniemi, L. J. (1989). Basement membrane and epithelial features of fetal-type Leydig cells in rat and human testis. *Differentiation* 40, 198-206.

Kuopio, T.; Tapanainen, J.; Pelliniemi, L. J. and Huhtaniemi, I. (1989). Development stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development* 107, 213-220.

Langman, J. (1981). *Medical Embriology*. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore-London

Leblond, C. P. and Clermont, Y. (1952). Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin sulfurous acid" technique. *A. J. Anat.* 90, 2, 167-215.

Lee, W., Mason, A. J.; Schwall, R. Szonyi, E. and Mather J. P. (1989) Secretion of activin by interstitial cells in the testis. *Science.* 243, 396-398.

Leeson, T. S. (1975). Smooth muscle cells in the rat testicular capsule: a development study. *Journal of Morphology* 147, 171-186.

Leeson, T. S. and Cookson, F. B. (1974). The mammalian testicular capsule and its muscle elements. *Journal of Morphology* 144, 237-254.

Leeson, C. R. and Forman, D. E. (1981). Postnatal development and differentiation of contractile cells within the rabbit testis. *J. Anat.* 132, 4, 491-511.

Lunstra, D. D.; Ford, J. J.; Christenson, R. K. and Allrich, R. D. (1986). Changes in Leydig cell ultrastructure and function during pubertal development in the boar. *Biol. Reprod.* 34, 145-158.

- Mancini, R. E.; Narbaitz, R. and Lavieri, J. C.** (1960). Origin and development of the germinative epithelium and Sertoli cells in the human testis: cytological, cytochemical, and quantitative study. *Anat. Rec.* 136, 477-490.
- Mancini, R. E.; Nolzco, J. and de la Balze, F. A.** (1952). Histochemical study of normal adult human testes. *Anat. Rec.* 114, 2, 127-145.
- Mancini, R. E.; Vilar, O.; Lavieri, J. C.; Andrada, J. A. and Heinrich** (1963). Development of Leydig cells in the normal human testis. A cytological, cytochemical and quantitative study. *Am. J. Anat.* 112, 203-214.
- McEntee, K.** (1990). Reproductive pathology of domestic mammals. Ed. Academic Press, Inc. San Diego.
- Meyers-Wallen, V.N.; Manganaro, T.F.; Kuroda, T.; Concannon, P.W.; McLaughlin, D.T. and Donahue, P.K.** (1991). The critical period for Mullerian duct regression in the dog embryo. *Biol. Reprod.* 45, 626-633.
- Miettinen, M.; Virtanen, I. and Talerma, A.** (1985). Intermediate filament proteins in human testis and testicular germ-cell tumors. *A. J. P.* 120. 3, 402-410.
- Morales, C.; Clermont, Y. and Hermo, L.** (1985). Nature function of endocytosis in Sertoli cells of the rat. *Am. J. Anat.* 173, 203-217.
- Mori, H. and Christensen, A. K.** (1980). Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J. Cell. Biology.* 84, 340-354.
- Nagano, T. and Suzuki, F.** (1976) The postnatal development of the junctional complexes of the mouse Sertoli cells as revealed by freeze-fracture. *Anat. Rec.* 185, 403-418.

Nickel, R.; Schummer, A. and Seiferle, E. (1979). The viscera of the domestic mammals. pp 304-350. Verlag Paul Parey. Berlin-Hamburg.

Nistal, M.; Abaurrea. M. A. and Paniagua, R. (1982). Morphological and histometric study on the human Sertoli cell from birth to onset of puberty. *J. Anat.* 14, 2, 351-363.

Nistal, M.; Codesal, J. and Paniagua, R. (1986). Multinucleate spermatids in aging human testes. *Archives of Andrology* 16, 125-129.

Nistal, M. and Paniagua, R. (1983). The postnatal development of the human Sertoli cells. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch. Leipzig* 97, 5, 739-752.

Nistal, M.; Paniagua, R.; Regadera, J.; Santamaría, L. and Amat, P. (1986). A quantitative morphological study of human Leydig cells from birth to adulthood. *Cell Tissue Res.* 246, 229-236.

Nistal, M.; Santamaría, L. and Paniagua, R. (1984). Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood. *Acta Anat.* 119, 155-160.

Nistal, M.; Santamaría, L.; Paniagua, R.; Regadera, J. and Codesal, J. (1986). Multinucleate Leydig cells in normal human testes. *Andrología* 18(3), 268-272

Nitta, H.; Bunick, D.; Hess, R.A.; Janulis, L.; Newton, S.C.; Millete, C.F.; Osawa, Y.; Shizuta, Y. and Toda, K. (1993). Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology* 132, 3, 1396-1401.

Noden, D. M. and De Lahunta, A. (1990). Embriología de los animales domésticos. Ed. Acribia. Zaragoza.

- Nykänen, M.** (1980). Loose connective tissue of rat rete testis. *Cell. Tissue Res.* 206, 501-504.
- Oakberg, E. F.** (1957). Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. 99, 507-516.
- Orsi, A. M.; Mombrum de Carvalho, I.; Moreira, J. E.; Valente, M. M. and Guazelli Filho, J.** (1984). Morfología de la red testicular en el caprino doméstico (*Capra hircus*, L.) *Anat. Histol. Embryol.* 13, 42-49.
- Orth, J. M.** (1982). Proliferation of Sertoli cells i fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.* 203, 485-492.
- Paniagua, R.** (1993). *Citología e Histología Vegetal y Animal.* 1^a ed. Interamericana-Mc Graw-Hill
- Paniagua, R.; Amat,P.; Nistal, M. and Martin, A.** (1985). Ultrastructural changes in Sertoli cells in ageing humans. *International Journal of Andrology.* 8, 295-312.
- Paniagua, R.; Codesal, J.; Nistal, M.; Rodriguez,M. C. and Santamaría L.** (1987). Quantification of cell types throught the cycle of the human seminiferous epithelium and their DNA content. *Anat. Embryol.* 176, 225-230
- Paniagua, R. and Nistal, M.** (1984). Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to onset of puberty. *J. Anat.,* 139, 3, 535-552.
- Paniagua, R.; Nistal, M. and Bravo. P.** (1984). The formation of annulate lamellae in the human Sertoli cell. *Archives of Andrology.* 13, 9-14

- Paniagua, R.; Rodriguez, M.C.; Nistal, M.; Fraile, B. and Amat, P. (1987).** Changes in the lipid inclusion/Sertoli cell cytoplasm area ratio during the cycle of the human seminiferous epithelium. *J. Reprod. Fert.* 80, 335-341.
- Pelliniemi, L. J. (1975a).** Ultrastructure of the gonadal ridge in male and female pig embryos. *Anat. Embryol.* 147, 19-43.
- Pelliniemi, L. J. (1975b).** Ultrastructure of the early ovary and testis in pig embryos. *Am. J. Anat.* 144, 89-112.
- Pelliniemi, L. J.; Dym, M.; Crigler, J. F. Retik, A. B. and Fawcett, D. W. (1980).** Development of Leydig cells in human fetuses and in patients with androgen insensitivity. *Testicular Development, Structure and Function.* (ed. A. Steinberger, E. Steinberger) pp 49-54. New York Raven Press.
- Perey, B.; Clermont, Y. and Leblond, C. P. (1961).** The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am. J. Anat.* 108, 47-77.
- Pier, C. (1985).** The seminiferous epithelial cycle of the Tom cat (*felis catus*). Thesis, Freie Universitat Berlin.
- Pöllänen, P. P.; Kallajoki, M.; Risteli, J. and Suominen, J. J. O. (1985).** Laminin and type IV collagen in the human testis. *International Journal of Andrology* 8, 337-347.
- Prince, F. P. (1984).** Ultrastructure of immature Leydig cells in the human prepubertal testis. *Anat. Rec.* 209, 165-176.
- Ross, M. H. (1967).** The fine structure and development of the peritubular contractile cell component in the seminiferous tubules of the mouse. *Am. J. Anat.* 121, 523-558.

Russell, L. (1977a). Desmosome-like junctions between Sertoli and germ cells in the rat testis. *Am. J. Anat.* 148, 301-312.

Russell, L. (1977b). Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am. J. Anat.* 148, 313-328.

Russell, L. (1978). The blood-testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult rat: a lanthanum tracer study. *Anat. Rec.* 190, 99-112.

Russell, L. D.; Bartke, A. and Goh, J. C. (1989). Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Am. J. Anat.* 184, 179-189.

Santamaría, L.; Martínez-Onsurbe, P.; Paniagua, R. and Nistal, M. (1990). Laminin, type IV collagen and fibronectin in normal and cryptochid human testes. An immunohistochemical study. *International Journal of Andrology* 3, 135-146.

Setchell, B. P. (1978). *The mammalian testis.* Cornell University Press. Ithaca, New York.

Sinowatz, F. and Amselgruber, W. (1986). Postnatal development of bovine Sertoli cells. *Anat. Embryol.* 174, 413-423.

Sinowatz, F. and Amselgruber, W. (1988). Ultrastructure of sustentacular (Sertoli) cells in the bovine testis. *Acta Anat.* 133, 274-281.

Sinowatz, F.; Wrobel, K-H.; Sinowatz, S. and Kugler, P. (1979). Ultrastructural evidence for phagocytosis of spermatozoa in the bovine rete testis and testicular straight tubules. *J. Reprod. Fert.* 57, 1-4.

Bibliografía

- Skinner, J. D.; Booth, W. D.; Rowson, L. E. A. and Karg, H.** (1968). The postnatal development of the reproductive tract of the Suffolk ram and changes in the gonadotrophin content of the pituitary. *J. Reprod. Fert.* 16, 463-477.
- Skinner, M. and Griswold, M. D.** (1980). Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. *The Journal of Biological Chemistry* 255, 20, 9523-9525.
- Skinner, M. K.; Tung, P. S. and Fritz, I. B.** (1985). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J. Cell. Biology.* 100, 1941-1947.
- Sternberger, L. A.** (1979). *Immunocytochemistry*. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York.
- Stewart, D. W. and Raeside, J. I.** (1976). Testosterone secretion of the early fetal pig testis in organ culture. *Biol.Reprod.* 15, 25-28.
- Swierstra, E. E.** (1968). Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *Anat. Rec.* 161, 171-186.
- Swierstra, E. E.; Gebauer, M. R. and Pickett, B. W.** (1974). Reproductive physiology of the stallion I. Spermatogenesis and testis composition. *J. Reprod. Fert.* 40, 113-123.
- Swift, C. H.** (1916). Origin of the sex cords and definitive spermatogonia in the male chick. *Am J. Anat.* 20, 375-410.
- Takano, H. and Abe, K.** (1987). Age-related histologic changes in the adult mouse testis. *Arch. Histol. Jap.* 50, 5, 533-544

Toyama, Y.; Obinata, T. and Holtzer, H. (1979). Crystalloids of actin-like filaments in the Sertoli cell of the swine testis. *Anat. Rec.* 195, 47-62.

Van Straaten, H. W. M. and Wensing, C. J. G. (1978). Leydig cell development in the testis of the pig. *Biol. Reprod.* 18, 86-93.

Van Vorstenbosch, C. J. A. H. V.; Colenbrander, B. and Wensing, C. J. G. (1982). Leydig cell development of pig testis in the early fetal period. *Am. J. Anat.* 165, 305-318.

Van Vorstenbosch, C. J. A. H. V.; Colenbrander, B. and Wensing, C. J. G. (1984a). Leydig cell development in the pig testis during the late fetal and early postnatal period: an electron microscopic study with attention to the influence of fetal decapitation. *Am. J. Anat.* 169, 121-136.

Van Vorstenbosch, C. J. A. H. V.; Colenbrander, B. and Wensing, C. J. G. (1984b). Cytoplasmic filaments in fetal and neonatal pig testis. *European Journal of Cell Biology* 34, 292-299.

Van Vorstenbosch, C. J. A. H. V.; Spek, E.; Colenbrander, B. and Wensing, C. J. G. (1984). Sertoli cell development of pig testis in the fetal and neonatal period. *Biol. Reprod.* 31, 565-577.

Vigier, B.; Picard, J. Y.; Tran, D.; Legeai, L. and Josso, N. (1984). Production of anti-Mullerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 114, 1315-1320.

Vilar, O. (1970). Histology of the human testis from neonatal period to adolescence. In: *The human testis*. Plenum Press, New York.

Vilar, O.; Pérez del Cerro, M. I. and Mancini R. E. (1962). The Sertoli cell as a "bridge cell" between the basal membrane and the germinal cells. *Experimental Cell Research*, 27, 158-161.

Viotto, M. J. S.; Orsi, A. M.; Vicentini, C. A.; Mello Dias, S. and Gregorio, E. A. (1993). Ultrastructure of the rete testis in the cat (*Felis domestica*, L.). *Anat. Histol. Embryol.* 22, 114-122.

Virtanen, I.; Kallajoki, M.; Närvänen, O.; Paranko, J.; Thornell, L-E.; Miettinen, M. and Lehto, V-P. (1986). Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin type intermediate filaments. *Anat. Rec.* 215, 10-20.

Waites, G. M. H.; Alison, C. S. and Jenkins N. (1985). The functional maturation of the Sertoli cell and Leydig cell in the mammalian testis. *J. Reprod. Fert.* 75, 317-326.

Wensing, C. J. G. (1968). Testicular descent in some domestic animals. I. Anatomical aspects of testicular descent. *Proc. Kon. Med. Akad. Wetensch.* 71, 423.

Wensing, C. J. G. (1973). Testicular descent in some domestic animals. II. The nature of the gubernacular change during the process of testicular descent in the pig. *Proc. Kon. Med. Akad. Wetensch.* 76, 190.

Wildt, D. E.; Bush, M.; Howard, J. G.; O'Brien, S. J.; Meltzer, D.; van Dyk, A.; Ebedes, H. and Brand, D. J. (1983). Unique seminal quality in the South African Cheetah and a comparative evaluation in domestic cat. *Biol. Reprod.* 29, 1019-1025.

Whitehead, R. H. (1904). The embryogenic development of the interstitial cells of Leydig. *A. J. Anat.* 3, 167-181.

- Wright, M. and Walters, S. (1982).** El gato. Evolución. Conocimiento. Crianza. Mantenimiento. Edi. Blume.
- Wrobel, K-H.; Dostal, S. and Schimmel, M. (1988).** Postnatal development of the tubular lamina propria and intertubular tissue in the bovine testis. Cell. Tiss. Res. 252, 639-653.
- Wrobel, K-H. and Hees, H. (1987).** Über heterotope Leydigzellen bei der Katze. Anat. Histol. Embryol. 16, 289-292.
- Wrobel, K-H.; Mademann, R. and Sinowatz, F. (1979).** The lamina propria of the bovine seminiferous tubule. Cell Tissue. Res. 202, 357-377.
- Wrobel, K-H.; Schilling, E. and Zwack, M. (1986).** Postnatal development of the connexion between tubulus seminiferus and tubulus rectus in the bovine testis. Cell Tissue. Res. 246, 387-400.
- Wrobel, K-H.; Sinowatz, F. and Mademann, R. (1981).** Intertubular topography in the bovine testis. Cell Tissue Res. 217, 289-310.
- Wrobel, K-H.; Sinowatz, F. and Mademann, R. (1982).** The fine structure of the terminal segment of the bovine seminiferous tubule. Cell Tissue Res. 225, 29-44.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a los profesores Dr D^a Juana María Flores y Dr D. Manuel Pizarro por la dirección de este trabajo así como por sus orientaciones y consejos tan importantes en el planteamiento de esta tesis.

A D. Pedro Aranda y D^a Ana Vicente por su inestimable ayuda en la obtención y preparación de los cortes tanto para microscopía óptica como para microscopía electrónica.

Al servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Veterinaria de Córdoba, y en especial al Dr. D. Tomás Moyano, por su importante ayuda en la obtención de algunas de las fotos del estudio ultraestructural.

A las clínicas veterinarias Dumbo (Illescas), Valdemoro y Argüelles por su desinteresada colaboración en la facilitación de muestras.

A mis compañeros de la Cátedra de Histología y Anatomía Patológica, que han contribuido de una u otra manera a la realización de este trabajo.

Así como a todo el personal del Departamento de Patología Animal II que en todo momento me ha apoyado y estimulado en la elaboración de esta tesis.