



11674

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MEXICO**

---

---

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
DE LA SALUD ANIMAL  
**FES CUAUTITLAN**  
EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE LAS CÉLULAS  
DE SERTOLI EN OVINOS DURANTE EL PERÍODO  
POSTNATAL

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

**JESÚS HERRERA ALARCÓN**

TUTOR: HÉCTOR JIMÉNEZ SEVERIANO

COMITÉ TUTORAL:

EVERARDO GONZÁLEZ PADILLA

EUGENIO VILLAGOMEZ AMEZCUA MANJARREZ

AJUCHITLAN, QRO.

2005

m. 345230



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# **DEDICATORIAS**

## **A MI MADRE**

Altagracia Alarcón Hernández, por todo su amor y consejos a lo largo de mi vida y por todos los valores infundidos en mi.

## **A MI ESPOSA**

Edoné, por su paciencia y apoyo en todos estos años. Gracias por tu amor y cariño. Te amo.

## **A MIS HIJOS**

Jesús Ignacio y Valeria Isabel, por su inocencia y espera. Los quiero mucho.

## **A MIS HERMANOS**

Enrique, Valentín, Francisco, Isabel, Iraís y Esther. Por seguirme apoyando moral y espiritualmente, muchas gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al PhD. Héctor Jiménez Severiano, por todo su apoyo, dedicación y conocimientos que me otorgo durante mis estudios. Pero lo mas importante su confianza y amistad. Gracias por darme la oportunidad de ser mi tutor.

A mi honorable jurado: Dr. Everardo González Padilla, Dr. Javier Valencia Méndez, Dr. Eugenio Villagómez Amezcua, Dr. Moisés Montaña Bermúdez y Héctor Jiménez Severiano, por sus comentarios y ayuda para concluir el escrito.

Al PhD. Héctor Vera Ávila, por su apoyo y paciencia en mi estancia por la Maestría. Doctor le estoy muy agradecido.

Al Dr. Eugenio Villagómez Amezcua Manjarrez, por su colaboración en los análisis de las hormonas.

A la Dra. Teresa Morales, por sus enseñanzas y colaboración en el trabajo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro: MVZ. Víctor Manuel Robledo Murua y Adolfo Paulín Pineda, por las facilidades para la realización del trabajo apoyando con los corderos.

Al Departamento de Patología-FMVZ-UNAM: Dr. Fernando Constantino Casas, Guadalupe Juárez Jiménez, Luis Antonio Morales Arreola, por su ayuda para la elaboración de las laminillas.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM: M.C. Leopoldo González Santos, Ing. Elsa Nidya Hernández Ríos por sus enseñanzas y colaboración para procesar y capturar las imágenes.

Al Instituto de Neuroetología de la Universidad Veracruzana: Dr. Pablo Pacheco Cabrera, Mayvi Alvarado Olivares, Roberto Ortiz López por su colaboración y facilidades para procesar y capturar las imágenes.

Al Centro Nacional en Fisiología y Mejoramiento Animal del INIFAP.

A mis compañeros de Maestría: Gisela, Demian, Jehfcet, Alejandro y Lety (la Secre) por su amistad.

Al Gobierno de México por el otorgamiento de la beca a través de CONACYT.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo mediante el Proyecto No. I 39290 B.

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>II</b>
<b>LISTA DE CUADROS Y FIGURAS</b>	<b>III</b>
Capítulo 1.	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Capítulo 2.	
<b>REVISION DE LITERATURA</b>	<b>2</b>
<b><i>2.1 TESTÍCULO</i></b>	<b>2</b>
2.1.2. Características estructurales del testículo	2
2.1.3 Origen embrionario	4
2.1.4. Diferenciación del testículo	6
2.1.5. Control hormonal de la diferenciación sexual	7
<b><i>2.2. INTERACCIONES PARACRINAS QUE INFLUENCIAN EL DESARROLLO TESTICULAR</i></b>	<b>8</b>
2.2.1. Comunicación célula de Sertoli-célula de Leydig	8
2.2.2. Interacción célula de Sertoli- gonocitos	11
2.2.3. Interacción célula de Sertoli-células miodes	13
<b><i>2.3. DESARROLLO FETAL DE LAS PRINCIPALES CÉLULAS DEL TESTÍCULO</i></b>	
2.3.1. Desarrollo de las células de Sertoli en la etapa fetal	14
2.3.2. Desarrollo de las células de Leydig en la etapa fetal	16
2.3.3. Desarrollo de las células germinales en la etapa fetal	18

<b>2.4. CÉLULAS DE SERTOLI</b>	<b>19</b>
2.4.1. Características estructurales	19
2.4.2. Funciones	21
2.4.3. Las células de Sertoli y la espermatogénesis	23
<b>2.5 FACTORES REGULADORES DE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE SERTOLI</b>	<b>25</b>
2.5.1. Hormona folículo estimulante	25
2.5.2. Hormonas tiroideas	27
2.5.3. Activina e inhibina	34
2.5.4. Estrógenos	37
2.5.5. Andrógenos	40
2.5.6. Otras hormonas esteroideas	41
2.5.7. Insulina y factores de crecimiento tipo insulina	41
2.5.8. Pro-opiomelanocortina (POMC)-péptidos derivados	42
<b>2.6. Resumen de la revisión de literatura</b>	<b>44</b>
<b>Capítulo 3.</b>	
<b>REFERENCIAS DE LA REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>45</b>
<b>Capítulo 4.</b>	
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>57</b>

## **Capítulo 5.**

### **Experimento: Estudio morfométrico del desarrollo testicular de ovinos Black belly 58**

Introducción	58
Material y métodos	60
Resultados	65
Peso corporal y crecimiento testicular	65
Morfometría testicular	65
Células de Sertoli	67
Discusión	69
Referencias	76

## **Capítulo 6.**

### **CONCLUSIONES**

## Resumen

Jesús Herrera Alarcón: **Evaluación del desarrollo de las células de Sertoli en ovinos durante el período postnatal** (Bajo la dirección del Dr. Héctor Jiménez Severaiano)

Estudios en diferentes especies han demostrado que el número de células de Sertoli por testículo es positiva y altamente correlacionado con el tamaño testicular y la producción de espermatozoides. Así mismo se ha identificado que la multiplicación de estas células ocurre en un período de tiempo limitado entre la vida fetal y la pubertad, siendo la FSH el factor de proliferación más importante, aunque también se ha observado que las hormonas tiroideas pueden modificar la longitud del período de proliferación de las células de Sertoli. Por lo que en el presente estudio, investigamos el desarrollo de los testículos mediante técnicas de morfometría cuantitativa, con especial énfasis en el desarrollo de la población de células de Sertoli, en corderos Blackbelly desde el nacimiento hasta 32 semanas de edad. El mayor crecimiento testicular ocurre entre las semanas 9 y 12. Con relación a las variables de los túbulos seminíferos, el mayor incremento en el diámetro se observó principalmente en las semanas 9 y 12, mientras que la longitud aumentó principalmente (12 veces) del nacimiento a las 12 semanas de edad. La aparición del lumen en los túbulos inició alrededor de la semana 12 y los primeros túbulos conteniendo espermátides alargadas aparecieron en la semana 15, hacia la semana 18 la mayoría de los túbulos evaluados presentaban espermátides. El número total de células de Sertoli se estabilizó a partir de la semana 15. En los grupos de corderos de mayor edad, el número de células de Sertoli por gramo de tejido (epitelio germinal, túbulos y parénquima) fue menor. Las concentraciones de hormonas tiroideas disminuyeron conforme aumentó la edad, sin observarse una relación clara con el desarrollo de la población de células de Sertoli. En conclusión se puede mencionar que el desarrollo testicular está relacionado con los incrementos del diámetro y longitud de los túbulos seminíferos y la aparición del lumen, ocasionados por la proliferación y crecimiento de las células de Sertoli y germinales (quizá espermatogonias) durante las primeras semanas de edad y por la proliferación y diferenciación de las células germinales, al iniciar y establecerse la espermatogénesis, alrededor y a partir de las 8 ó 9 semanas de edad; además, no se observó una relación clara entre las concentraciones de hormonas tiroideas y el desarrollo de la población de las células de Sertoli.

Palabras clave: Células de Sertoli, Desarrollo Testicular, Morfometría Cuantitativa, Ovinos Blackbelly.



## **Abstract**

**Jesús Herrera Alarcón: Evaluation of Sertoli cell development in sheep during the post-natal period** (Under the supervision of Dr. Hector Jimenez-Severiano)

Previous studies in different species have shown that total number of Sertoli cells is highly correlated with testis size and sperm production. Proliferation of these cells is limited to a period between fetal life and puberty. It has been considered that FSH is the primary factor inducing Sertoli cell multiplication before and after birth; however, thyroid hormones might have a role on determining the length of this period. Therefore, in the present study quantitative morphometry techniques were used to describe testis development at the microscopic level in Blackbelly ram lambs, from birth to 32 wk of age, taking special attention on development of Sertoli cell population. Higher rate of testis growth occurred between 9 and 12 weeks of age. Seminiferous tubule diameter increased primarily at 9 and 12 weeks, whilst tubule length increased 12-fold between birth and 12 weeks of age. Tubule lumen was first observed at 12 weeks, and tubules containing elongated spermatids started appearing between 15 and 18 weeks of age. Total number of Sertoli cells did not change from 15 weeks of age onwards, and Sertoli cell numbers per gram of testicular tissue (germinal epithelium, tubular tissue and parenchyma) were less in older ram lambs. Thyroid hormone concentrations decreased as the age of ram lambs increased, and no relationship was observed with the development of Sertoli cell population. In conclusion, testis development is related to the increase of seminiferous tubule diameter and length, and tubule lumen appearance. During the first weeks after birth, tubule development primarily results from proliferation and growth of Sertoli cells and germ cells (perhaps only spermatogonia); whilst from 8 or 9 weeks of age onwards (estimated time when spermatogenesis started in ram lambs from this study), germ cell differentiation and proliferations are the main factors inducing tubule growth. No relationship was observed between thyroid hormone concentrations and development of Sertoli cell population.

**Keywords:** Blackbelly Sheep, Quantitative Morphometry, Sertoli Cells, Testis Development.

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Página

### CUADROS

Cuadro 1. Características del tejido tubular, túbulos seminíferos y epitelio germinal, entre el nacimiento y las 32 semanas de edad, en corderos Blackbelly nacidos en verano <sup>1</sup> .	77
Cuadro 2. Correlaciones entre las variables de la morfometría testicular mas importantes.	78
Cuadro 3. Promedios ( $\pm$ EE) del volumen nuclear total y del número de células de Sertoli, entre el nacimiento y las 32 semanas de edad, en corderos Blackbelly nacidos en verano <sup>a</sup> .	79

### FIGURAS

Fig. 1. Peso corporal (promedio $\pm$ EE) de corderos Blackbelly entre el nacimiento y 32 semanas de edad.	80
Fig. 2. Peso testicular (promedio $\pm$ EE) de corderos Blackbelly entre el nacimiento y 32 semanas de edad. Peso Los promedios con la misma letra son similares entre si.	81
Fig. 3. Los túbulos seminíferos ocuparon una pequeña porción del parénquima testicular del nacimiento hasta las 6 semanas. Los túbulos seminíferos incrementaron en longitud y diámetro mostrando el desarrollo y aparición del lumen (flecha) a las 12 semanas.	83
Fig. 4. (A) La presencia de lumen dentro de los túbulos a través de las diferentes edades, es expresada en forma de proporción. (B) La aparición de espermátides dentro de los túbulos expresada en porcentajes.	84
Fig. 5. Microfotografías de tejido testicular de corderos de diferentes edades teñidos con hematoxilina-eosina.	87
Fig. 6. Microfotografías de tejido testicular de corderos de diferentes edades teñidos con hematoxilina-eosina.	88
Figura 7. Volumen individual de los núcleos de células de Sertoli (promedio $\pm$ EE) de corderos Blackbelly entre el nacimiento y 32	89

semanas de edad.

Fig. 8. Desarrollo de la población total de las células de Sertoli (promedio  $\pm$  EE) en corderos Blackbelly, entre el nacimiento y 32 semanas de edad. Los datos fueron convertidos a su logaritmo natural para los análisis estadísticos y reconvertidos a su valor real para su presentación (panel A). En el panel B se presentan los promedios transformados a su logaritmo natural, además de la línea (discontinua) y la ecuación de regresión que describe el desarrollo del número de células de Sertoli. 90

Fig. 9. Concentraciones séricas (promedio  $\pm$  EE) de triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) en corderos Blackbelly entre el nacimiento y 32 semanas de edad. 92

## 1. INTRODUCCION

Los testículos de los mamíferos se originan en el feto joven y continúan su desarrollo durante el resto de la vida fetal y parte del período postnatal. Después de la pubertad, cuando gran parte del desarrollo ha sido completado, los testículos juegan un papel dual, produciendo espermatozoides (función exocrina) y hormonas, principalmente andrógenos y algunas proteínas (función endocrina). Las bases de la función testicular son establecidas mucho antes de la pubertad, durante el desarrollo prenatal. En los embriones de los mamíferos de ambos sexos, las gónadas al inicio desarrollan consigo líneas idénticas a través de los diferentes estadios, posterior a esto y por procesos hormonales y genéticos se inicia el desarrollo que diverge en machos y hembras.

Las células de Sertoli constituyen la estructura de los túbulos seminíferos y soportan el desarrollo de las células germinales durante su división y maduración. Varios estudios han indicado que el número de célula de Sertoli en el testículo de las ratas determina en gran medida el potencial espermatogénico del animal adulto.

Las células de Sertoli en el testículo adulto juegan un papel central en la regulación de la producción espermática. El número de espermatozoides producidos por día es también dependiente del número de células de Sertoli por testículo, ya que cada célula de Sertoli puede soportar solamente un número finito de células germinales.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Testículo

#### 2.1.1. *Características estructurales del testículo*

Los testículos están contenidos en una bolsa de piel especializada llamada escroto, que los protege y soporta (Sisson, 1975). La función principal del escroto es regular la temperatura interna de las gónadas mediante la contracción involuntaria del músculo dartos, que recubre el escroto interna y basalmente (Salisbury et al., 1978).

*Cápsula testicular.* Cada testículo está recubierto por dos capas serosas de la túnica vaginalis y una de tejido conectivo denso e irregular, que constituye la túnica albugínea (Wrobel and Dellman, 1993). La túnica albugínea se halla compuesta de colágena y fibroblastos, pero en algunas especies (conejo, caballo, perro, gato, cerdo, humano), esta también contiene numerosas células de músculo liso. En el borde posterior de cada testículo, la túnica albugínea, se adelgaza considerablemente para formar el mediastino el cual es perforado por una red anastomosis de conductos (retes testis) y vasos. Septos conectivos del testículo, los cuales son frecuentemente incompletos, se extienden entre la cápsula y el mediastino. No todas las especies poseen estos septos. De la túnica albugínea emergen trabéculas de tejido conectivo que convergen en el mediastino ubicado en el centro del parénquima testicular, y dividen al testículo en un número variable de lobulillos testiculares que contienen de 1 a 4 túbulos seminíferos contorneados.

*Espacio intersticial.* El espacio intersticial entre los túbulos seminíferos contiene poco tejido conectivo, numerosos vasos sanguíneos y linfáticos, nervios, grupos de células de Leydig y células libres (fibroblastos, macrófagos, linfocitos, células mastoides). Las células de Leydig rodean cada tubo seminífero y lo bañan con un fluido rico en testosterona.

La red de sinuoides linfáticos es particularmente densa en roedores. En grandes mamíferos (toros, carneros, elefantes, changos, hombres), la asociación

entre células de Leydig y vasos sanguíneos y linfáticos está desarrollada en menor proporción que en otras especies. Los grupos de células de Leydig son dispersos a través del poco tejido conectivo y bañados por el fluido intersticial. Los macrófagos están en la proximidad de las células de Sertoli. La cantidad de tejido intersticial varía entre especies desde aproximadamente 10% en hamster y perros, 25 a 30% en el hombre y casi 40% en cerdos.

*Túbulos seminíferos.* Los túbulos seminíferos son largos, convolucionados, cilíndricos, con dos aberturas al final de la estructura finalizando dentro del túbulo recti. Los túbulos seminíferos se unen, a la salida de cada lobulillo, y forman los túbulos rectos agrupados en el mediastino, que a su vez conforman la rete testis (Sisson, 1975). De la rete testis salen una docena de túbulos llamados vasos eferentes que convergen en la porción dorsal del mediastino para luego llegar a la cabeza del epidídimo (Salisbury et al., 1975).

La pared de los túbulos está compuesta de una lámina basal más interna formada principalmente de laminina, colágena tipo IV, heparán-sulfato y entactina, rodeadas por una capa de células mioides. Estas células son cubiertas por afuera, por una capa de fibras de colágena en completa asociación con las células endoteliales. Las células mioides son ricas en actina, miosina, proteínas tipo actina y fibronectina.

El testículo se divide en dos compartimientos funcionales: intersticio y túbulos seminíferos; a su vez los túbulos seminíferos se dividen en un compartimiento basal (separado del anterior por la lámina propia testicular), que incluye la base de las células de Sertoli (células de sostén), y las espermatogonias (células espermáticas precursoras, que se dividirán por mitosis). Un segundo compartimiento, el adluminal, que incluye la porción apical de las células de Sertoli, y los espermatoцитos y espermátides (Amann and Schanbacher, 1983); y un tercero formado por el lumen, que contiene espermatozoides.

El compartimiento basal y el compartimiento adluminal están separados fisiológicamente en el animal adulto por la barrera hemotesticular, conformada por la uniones firmes entre las células de Sertoli (Jonhson and Everitt, 1980).

### 2.1.2. Origen embrionario y diferenciación sexual

La formación gonadal en mamíferos tiene lugar muy temprano en la vida fetal. Aunque el sexo genético es determinado a la concepción, las diferencias morfológicas sexuales entre fetos pueden ser reconocidas cuando sus gónadas empiezan a ser diferenciadas sexualmente. La diferenciación sexual en los mamíferos euterianos es un proceso secuencial iniciado en el establecimiento del sexo cromosómico después de la fertilización, seguido por el desarrollo del sexo gonadal y culminando en la formación de los fenotipos sexuales (Frederick and Wilson, 1994). El sexo genético en humanos, es mediado a través del grupo de cromosomas, el cual es usualmente 46, XY. Este patrón cromosomal es el comienzo de una cascada de eventos genéticos que conducen al desarrollo de las gónadas masculinas, el testículo (sexo gonadal) (Hiort, 2000). Diversos estudios han mostrado que el cromosoma Y acarrea una secuencia determinada del sexo, la cual ha sido designada Factor Determinante Testicular (TDF) o Gen Determinante Testicular en el gen Y en humanos (TDY) y en ratones (Tdy) (Frederick and Wilson, 1994).

Diversos genes están involucrados en el control de la determinación del tipo de gónada. SRY (región determinante del sexo) es el principal iniciador de la cascada de interacciones de genes que determinan el desarrollo de los testículos de la gónada indiferenciada. SOX9 juega un papel crucial en esta vía donde ésta es regulada por SRY y SF-1, para iniciar la diferenciación de células pre-Sertoli a células de Sertoli. En machos XY en desarrollo, la función de represor de SOX9 es normalmente reprimida o inhibida por SRY, permitiendo a SOX9 inducir la formación del testículo. En hembras en desarrollo normal, SOX9 funciona como represor y no se forma un testículo. (Leaun and Hughes, 2001).

Las gónadas se desarrollan cuando las células germinales y las diferentes células somáticas migran y se sitúan en la cresta gonadal de una forma ordenada. Las gónadas se desarrollan a lo largo de la parte ventro-craneal del mesonefros. Diversos eventos caracterizan la formación inicial de la gónada: la migración de las células germinales primordiales (PGCs) en el epitelio celómico y el subyacente

tejido mesenquimal que envuelve al mesonefros; la liberación y migración de las células mesonéfricas y otros tipos celulares dentro de la misma área y, el establecimiento de las células germinales soportando al linaje celular.

Las gónadas se desarrollan como estratificaciones del epitelio celómico sobre el área medial del riñón mesonéfrico (la cresta urogenital), alrededor de la cuarta semana de la gestación humana. La mayoría de los tipos de células de las gónadas son de origen del mesodermo de la cresta genital. Las PGCs se originan fuera de la presumible gónada y son inicialmente identificables en el endodermo de la yema del saco. Ellas son derivadas de las células ectodermales primitivas de la masa de células internas (Gardner et al., 1985) y son distinguibles de otras células del embrión en desarrollo debido a su talla grande y larga, con núcleo redondo y citoplasma claro. Histológicamente, ellas contienen fosfatasa alcalina y glicógeno (Makay et al., 1953). El mecanismo por el cual las células germinales se diferencian no está claro, pero el proceso empieza temprano así que las PGCs pueden ser reconocidas en el día 4.5 del blastocisto humano (Ginsburg et al., 1990).

El período crítico de organización testicular inicia después de 13.5 días de gestación en el embrión de rata en desarrollo (Magre, et al., 1991). Cerca de los 14.5 días de gestación las células somáticas se diferencian en las precursoras de las células de Sertoli, las cuales interactúan con las PGCs para organizar agregados celulares tipo isleta desprovistos de una lámina basal. Para el día 16.5 de la gestación, los agregados celulares se fusionan para formar cordones testiculares que adquieren una lámina basal y excluyen a los precursores de las células de Leydig de los cordones en desarrollo. Las células de Leydig se diferencian posteriormente, y adquieren las características de células que producen esteroides, incluyendo la actividad de 3,  $\beta$ 3-hidroxi-esteroide deshidrogenasa (Orth et al., 1980).

Desde una perspectiva celular, la gónada bipotencial está formada a partir de 4 células línea: células germinales y tres tipos de células somáticas. Los componentes somáticos incluyen: las precursoras de las células de soporte



capaces de diferenciarse en células de Sertoli o células foliculares, los precursores de las células estereidogénicas las cuales dan origen a las células de Leydig en el macho y teca o células de tejido conectivo tejido vascular dócil, túnica y células mioideas peritubulares en testículos y túnica y células estromales en ovarios (Novell-Badge, 1993). En el testículo, estos componentes derivan del mesonefros y del epitelio celómico, el cual cubre la cresta gonadal (Kart and Capel, 1998), siendo las células germinales de desarrollo extragonadal (Ginsburg et al., 1990).

### *2.1.3. Diferenciación del testículo*

Tres eventos caracterizan la diferenciación testicular: 1) las células germinales y las de Sertoli empiezan a encerrarse en los cordones testiculares, creando un compartimiento de las células germinales intracordal y un compartimiento extracordal. 2) Las células de Leydig producen esteroides en el espacio extracordal diferenciado. 3) El testículo empieza a redondearse, minimizando el efecto feminizante del mesonefros (Byskov, 1986 ).

La gónada empieza a separarse por septos perpendiculares a lo largo del eje, o en su defecto se forman estructuras tipo plato de células germinales y células somáticas, los cuales son convertidos a simples arcos, los cordones testiculares primitivos (Clermont et al., 1961). A través de la diferenciación, los cordones permanecen en conexión con la parte basal de la masa de células mesonéfricas (Zamboni et. al., 1981).

La formación del cordón seminífero es independiente de las gonadotropinas (Colebrander et al., 1979), por lo que la expansión de cada una de las poblaciones en testículo perinatal es aparentemente controlada por un grupo particular de factores, que interactúan específicamente con esta población durante el desarrollo testicular. La naturaleza de estas interacciones es compleja, teniendo algunos factores reguladores de origen extratesticular, primariamente de la pituitaria, y otros producidos dentro del propio testículo que actúan de manera paracrina.

#### 2.1.4. *Control hormonal de la diferenciación sexual.*

La fase postdeterminación gonadal de la diferenciación sexual es siempre dependiente de hormonas y es un proceso sexualmente activo para el macho. La Hormona Antimülleriana (AMH) y la testosterona son dos hormonas claves producidas por el testículo, en concentraciones óptimas durante un tiempo limitado de la gestación temprana, para asegurar el desarrollo del macho o también como un componente clave en el proceso de la expresión de receptores afines para esas hormonas en tejidos blancos. En la gestación final, el testículo migra transabdominalmente desde su origen, adyacente al riñón en desarrollo antes del descenso escrotal-inguinal final (Hughes, 2001).

La AMH es una larga glicoproteína dimérica (aprox. 140 K Da) formada por las células de Sertoli del testículo fetal y en recién nacidos (Price, 1979). Actúa localmente para suprimir al desarrollo de los conductos Müllerianos más que como una hormona circulante (Hutlson et al., 1983). Los conductos Müllerianos fetales son sensibles a la acción de la hormona solamente por un período corto durante la embriogénesis (Josso et al., 1991). Aunque la regresión de los conductos Müllerianos empieza en el embrión macho brevemente después de la formación de los cordones espermáticos en el testículo fetal (Josso et al., 1991), la secreción de la AMH es independiente de la formación del túbulo espermatogénico (Magre et al., 1984).

La testosterona es el esteroide androgénico formado por los testículos embrionarios durante el desarrollo fenotípico del macho (Lipsett and Tullner, 1965; Wilson, 1973). La síntesis y secreción de testosterona en el testículo empieza brevemente después del inicio de la diferenciación de los cordones espermatogénicos y es coincidente con la diferenciación histológica de las células de Leydig fetales (Gondos, 1980).

El papel crítico de la testosterona en el desarrollo del tracto urogenital del macho, fue deducido de tres tipos de evidencias embriológicas y endocrinas. Primero, el hecho de que la síntesis de testosterona precede inmediatamente a la iniciación de la virilización del tracto urogenital en una variedad de especies

sugiere una relación causa – efecto entre los dos eventos (Attal, 1969. Rigaudiere, 1979). Segundo, la administración de andrógenos en embriones hembras en un momento apropiado en el desarrollo fetal causa el desarrollo de características de macho en los genitales internos y externos (George et al., 1988. Schultz, 1974). Tercero, la administración de agentes farmacológicos que específicamente inhiben la síntesis o acción de andrógenos dañan el desarrollo del macho (Golman, 1971; Neumann et al., 1970).

## **2.2. INTERACCIONES PARACRINAS QUE INFLUENCIAN EL DESARROLLO TESTICULAR.**

### *2.2.1. Comunicación célula de Sertoli - célula de Leydig.*

Debido a que la FSH estimula a la célula de Sertoli para dividirse, los niveles circulantes de FSH durante el desarrollo testicular son críticos en la determinación de la talla poblacional de las células de Sertoli. Aunque factores paracrinos producidos dentro del propio testículo son probablemente los que afectan la respuesta mitótica de las células de Sertoli a FSH. Además, uno o más de estos agentes paracrinos se originan de las células de Leydig, lo que sugiere que la comunicación tiene lugar entre los compartimientos seminífero e intersticial del testículo durante su desarrollo.

Una vía en la cual las células de Leydig influyen la función de las células de Sertoli en animales inmaduros y adultos, es por la producción de péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina (POMC), tales como la  $\beta$ -endorfina y la hormona estimulante de los melanocitos (MSH); péptidos que actúan directamente en las células de Sertoli. Las células de Leydig expresan el gen POMC y por ello son un origen de los péptidos derivados de la POMC.

Ciertos estudios indican que al menos uno de estos factores,  $\beta$ -endorfina, funciona durante la vida perinatal para modificar la respuesta proliferativa de las células de Sertoli a FSH. Evidencias circunstanciales del involucramiento de la  $\beta$ -

endorfina en el desarrollo de las células de Sertoli fue probado, al observar que el modelo de la producción de células de Leydig de péptidos derivados de la POMC, corresponde estrechamente a aquel crecimiento de la población de las células de Sertoli. La proporción de la población de las células de Leydig fetales que produce  $\beta$ -endorfina tiene el mayor pico justo antes del nacimiento, cuando la tasa de proliferación de células de Sertoli probablemente tiende a ser la más alta. Posteriormente ambas declinan, en paralelo con un decremento en los niveles de división de células de Sertoli.

Se ha sugerido que otros péptidos derivados POMC, notablemente hormona adenocoticotropina (ACTH) y MSH están involucrados en la interacción células de Sertoli- células de Leydig durante el desarrollo testicular. Se ha encontrado que péptidos con actividad tipo MSH estimulan la adenilato ciclasa en células de Sertoli. Otros péptidos además de la endorfina pueden actuar para hacer más sensibles las células de Sertoli a FSH ( Bardin et al., 1988).

Existen algunos otros factores que pueden actuar como modificadores paracrinós de la proliferación de células de Sertoli en el desarrollo de los animales; por ejemplo, se han reportado que la somatomedina-C, el factor de crecimiento epidermal, factores de crecimiento de fibroblastos y ácido retinoico son capaces de estimular la síntesis de DNA por aislamiento de células de Sertoli de cerdos inmaduros (Jaillard et al., 1987). En algunos casos, los efectos observados parecen involucrar la sensibilidad alterada de las células para FSH y cambios concomitantes en la producción de cAMP. En otros, la proliferación elevada fue producida sin intervención del sistema FSH-cAMP.

Las células de Sertoli fetales, producen probablemente un factor que modifica la función de las células de Leydig, un péptido tipo hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en respuesta a FSH (Sharpe, 1984). Los sitios de unión para GnRH han sido detectados en testículos de ratas de un día de nacidos (Dalkin et al., 1981). El péptido tipo GnRH modifica la síntesis de testosterona estimulada por LH en las células de Leydig. La exposición de células de Leydig fetales a niveles bajos de este péptido produjeron una inhibición dependiente de la

dosis de producción de andrógenos en la presencia de LH, conduciendo a la sugerencia que las células de Sertoli ejercen un efecto local en las células de Leydig próximas, durante el desarrollo, vía secreción del péptido tipo GnRH (Dalkin et al., 1981).

### 2.2.2. *Interacción célula de Sertoli - Gonocito*

Después de la onda inicial de la división celular que ocurre en la vida fetal temprana, los gonocitos de machos permanecen mitóticamente inactivos hasta después del nacimiento. Este período de quiescencia puede ser impuesto en los gonocitos por uno o más factores que se originan en el testículo. Se ha sugerido que un reloj meiótico autónomo está presente en células germinales de machos y hembras. Algunas observaciones sugieren que una sustancia que previene la meiosis es producida por los testículos fetales para inhibir la entrada de gonocitos machos a la meiosis durante el desarrollo (Byskov, 1986).

Si el factor que previene la meiosis existe en fetos machos, este es posiblemente formado dentro del cordón seminífero; debido a que los gonocitos que permanecen fuera de los cordones pero dentro del testículo fetal, también entran en meiosis antes de su eventual degeneración (Byskov, 1986). Las células de Sertoli de ratas perinatales producen varios péptidos que son posibles candidatos para regular la función de los gonocitos; uno de estos, la AMH es aparentemente la primera proteína secretada por las células de Sertoli, por lo que se ha propuesto que esta puede prevenir la entrada de gonocitos en meiosis.

Algunos otros péptidos relacionados con AMH, tales como la inhibina y activina son producidos dentro del testículo, aunque primero reconocidos por sus efectos en la secreción de FSH de la pituitaria. Estos péptidos actúan como agentes paracrinos en adultos para promover la interacción de células de Leydig-células de Sertoli. La inmunotinción con antisuero generada contra varias subunidades de estas moléculas, fue alta en cordones seminíferos de fetos (Bardin et al., 1989), implicando que la inhibina o activina, o ambas, pueden ser importantes durante el desarrollo testicular así como durante la maduración.

Indirectamente la inhibina permanece como un posible candidato inhibidor de la meiosis en machos. Asimismo, otras proteínas específicas de las células de Sertoli no relacionadas con la AMH pueden ser secretadas en respuesta al estado de desarrollo de las células germinales y pueden tener un papel en la regulación a su entrada a la meiosis. Shabanowitz et al., (1986) encontraron una proteína de bajo peso molecular, llamada T<sub>35</sub>, cuya producción en las células de Sertoli fue grande en testículos fetales y postnatales tempranos, implicando que esta función pueda ser específica para eventos que ocurren solamente durante el desarrollo testicular. Así también, uno o más mensajes paracrinos producidos por la célula de Sertoli y actuando en las células germinales pueden ser importantes en la modificación o en el desarrollo de los gonocitos en testículo perinatales.

Es posible que el contacto entre células de Sertoli y gonocitos pueda mediar los cambios que ocurren en estas células después del nacimiento, incluyendo la reanudación de la mitosis, cambios en la posición dentro del cordón seminífero y maduración en la espermatogonia; esto es factible por el reconocimiento mediado por contacto entre gonocitos y células de Sertoli en un período de desarrollo temprano, cuando los cordones seminíferos son formados.

Posterior al nacimiento, los gonocitos están completamente rodeados por células de Sertoli, esto lleva a la posibilidad de que cambios postnatales en los gonocitos pueden ser estimulados por factores que pasan directamente a ellos desde la célula de Sertoli.

### *2.2.3. Interacción de la células de Sertoli-células mioideas*

Tung et al., (1986, 1987) sugirieron que la cooperación mediada por contacto entre las células de Sertoli - células peritubulares pueden ser esenciales para la formación del cordón testicular durante el desarrollo fetal. En un método in vitro, las células de Sertoli inmaduras fueron mezcladas en una monocapa preexistente de células peritubulares; teniendo como resultados que el aparente reconocimiento entre estos dos tipos de células condujo a la formación de crestas y montículos aislados de células de Sertoli, separadas de las células peritubulares

por una alta membrana basal organizada. Cuando la íntima aposición entre los dos tipos celulares fue bloqueada por un filtro, el material de la membrana basal no se formó entre ellos, sugiriendo que esta formación es medida por contacto entre células de Sertoli y células peritubulares (Taketo et al., 1984).

## **2.3. DESARROLLO FETAL DE LAS PRINCIPALES CÉLULAS DEL TESTÍCULO**

### *2.3.1. Desarrollo de las células de Sertoli en la etapa fetal*

La principal característica que distingue a un testículo fetal de un ovario es la presencia de cordones seminíferos. La formación de los cordones involucra a las células de Sertoli mesenquimales del epitelio en transición (Magre et al., 1980, 1991) y a las células germinales dentro de la gónada diferenciada. Los cordones contienen el epitelio seminífero que está separado del tejido peritubular, que lo rodea, por una membrana basal. El epitelio seminífero está constituido de elementos somáticos, las células de Sertoli y las células germinales o gonocitos. El testículo fetal está constituido de diferentes tipos de células, que mantienen una relación física y funcional entre ellas (células de Sertoli, células germinales, células de Leydig y células peritubulares) (Magre et al., 1980, 1991).

Los cordones sexuales primitivos de los testículos fetales de mamíferos se componen de células de soporte, las precursoras de las células de Sertoli que rodean las células germinales primordiales, y dentro del tejido intersticial, las células de Leydig están presentes entre los cordones sexuales. Esta morfología de los testículos permanece sin cambios hasta el período postnatal, aunque la actividad mitótica de los testículos es importante durante el período fetal (Hochereau-de Reviers et al., 1995). En el testículo fetal de la rata, la actividad mitótica de las células de Sertoli es máxima justo antes de nacer.

En mamíferos, la aparición de las células de Sertoli es el primer evento identificable en la diferenciación testicular. Estudios histológicos tempranos de la diferenciación fetal del testículo de la rata (Jost et al., 1972), confirmados

posteriormente por estudios de ultraestructura (Magre et al., 1980), indican que estas células aparecen en el día 13 post-fertilización y se agrupan para formar los cordones seminíferos al día siguiente. La señal responsable para iniciar la aparición de las células de Sertoli no ha sido identificada pero presumiblemente está relacionada a un producto de genes, codificados en el cromosoma Y. La aparición inicial de la diferenciación de las células de Sertoli y la subsecuente organogénesis, que es, la agregación y formación de los cordones seminíferos, son aparentemente regulados independientemente, ya que la organogénesis temprana es inhibida por factores presentes en el suero fetal del becerro, al mismo tiempo las células de Sertoli son desarrolladas (Agelopoulou et al., 1984; Jost et al., 1984).

Siguiendo la aparición inicial de las distintas células de Sertoli y las etapas tempranas de la organogénesis, existe un período de rápida proliferación de las mismas. En la rata este empieza en la vida fetal, continúa durante la vida neonatal temprana, y termina antes de que se cierre la barrera hemotesticular (Orth, 1982; Steinberger et al., 1971).

La diferenciación de las células de Sertoli y su subsecuente proliferación durante la vida fetal y neonatal son eventos complejos, que incluyen señales no conocidas para la iniciación de la diferenciación desde el interior de testículo, así como factores hormonales. Si bien existen en el presente, varios factores claramente identificables modulando su progresión, parece que, una vez iniciado, el proceso continúa en una forma ordenada y termina antes de la pubertad. En la rata, esto ocurre sobre un período de alrededor de 30 días de vida fetal y neonatal (Orth, 1982).

Orth (1982), demostró que la FSH regula el índice mitótico de las células de Sertoli en fetos de ratas normales, a una tasa similar a la que pueden ser logrados por suplementación de FSH en fetos decapitados. En ovinos el incremento en el número de células de Sertoli y su diferenciación después del nacimiento dependen de la LH y FSH ( Courot, 1967; Kilgour et al., 1998).



En carneros adultos, como en otros mamíferos, existe una correlación positiva entre el número total de células de Sertoli y células germinales por testículo (Hochereau de Reviers and Courot, 1978; Orth, 1982). Durante el período fetal en ovinos, el crecimiento testicular ocurre en la ausencia de diferenciación morfológica de las células germinales. En contraste, el crecimiento testicular postnatal corresponde al inicio de la espermatogénesis (Courot, 1967).

La integrina  $\alpha 6$  (Frojdman et al., 1994) y la lectina (Frojdman et al., 1992) se hallan involucradas en la formación de los cordones seminíferos durante las etapas tempranas.

El ácido retinoico también tiene efecto en la formación de los cordones durante el desarrollo embrionario del testículo (Marinos et al., 1995). Después de la formación de los cordones seminíferos, un segundo proceso ocurre que involucra un incremento en el crecimiento del testículo. Todas las poblaciones dentro del testículo proliferan después de la formación de los cordones, hacia el día 15, en la rata, el testículo es 11 veces más grande que el ovario de la misma edad (Mittwoch et al., 1969). Este proceso de crecimiento testicular embrionario es importante debido a que se requiere un adecuado número de células somáticas para soportar la espermatogénesis en el adulto. Una gran proporción del crecimiento testicular embrionario ocurre antes de la adquisición de los receptores de gonadotropinas (O' Shaughnessy et al., 1996) y puede ser atribuido a factores paracrinos producidos localmente en el testículo.

Durante la vida fetal, el incremento en el tamaño de los cordones sexuales es principalmente una consecuencia del incremento en longitud mas que en diámetro, esto se explica por el hecho que las células de Sertoli y los gonocitos se dividen pero no se diferencian (Courot, 1967).

### *2.3.2. Desarrollo de las células de Leydig en la etapa fetal*

La ontogénesis de la función de las células de Leydig en mamíferos involucra dos generaciones. La generación de células de Leydig tipo fetal es responsable de la masculinización de los caracteres sexuales primarios durante la

vida fetal y neonatal. Estas son seguidas por la emergencia de la población de tipo adulta, la cual es responsable de la masculinización durante la pubertad (Saez, 1994).

Las células de Leydig fetales probablemente persisten en la vida adulta, aunque su función, si la hay, en el adulto es desconocida (Kerr and Kell, 1988). Poco es conocido acerca de su regulación paracrina, aunque la ontogenia, números y función de las células de Leydig fetales probablemente son reguladas vía mecanismos análogos a aquellos en el adulto, envolviendo sistemas paracrinicos y endocrinos (Christensen, 1975; Gondos, 1977; Kerr et al., 1988).

Las primeras células de Leydig aparecen después de la formación de los cordones seminíferos (Gondos, 1980), en la región intersticial, por diferenciación de las células somáticas mesenquimales. Las células contienen grandes mitocondrias, gotas lipídicas y retículo endoplásmico liso. Los testículos de ratas fetales empiezan a producir testosterona, in vivo e in vitro, en el día 15.5 postcoito (p.c.) (Warren et al., 1973; Habert and Picon, 1984). En el día 13.5, los testículos fetales in vitro son capaces de convertir progesterona y dehidroepiandrosterona en testosterona (Noumura et al., 1966; Gangnerau and Picon, 1987), y en el día 14.5 los testículos pueden convertir pregnenolona en progesterona (Bloch, 1979). La habilidad del testículo fetal en desarrollo para unir específicamente LH y responder a esta hormona tiene lugar entre el día 14.5 y 15.5, al mismo tiempo cuando la secreción de testosterona inicia (Gangnerau et al., 1982; Warren et al., 1984).

La señal que dispara la diferenciación inicial de las primeras células de Leydig fetales es desconocida. Aunque la LH y FSH son conocidas por inducir la multiplicación y maduración de las células de Leydig en animales adultos (Kerr and Sharpe, 1985), la diferenciación inicial de las células de Leydig fetales en la rata es claramente independiente de gonadotropinas. Las gónadas, removidas y colocadas en un medio sintético sin alguna hormona o factores de crecimiento a los 12-13 días pc, completa su diferenciación morfológica (formación de los cordones seminíferos y aparición de las células de Leydig) y endocrina (secreción

de la hormona antimülleriana y testosterona) dentro de 3 días siguientes (Gangnerau and Picon, 1987; Agelopoulou et al., 1984; Magre and Jost, 1984).

Como la diferenciación de las primeras células de Leydig se lleva a cabo después de las células de Sertoli, se ha sugerido que las células de Leydig pueden diferenciarse bajo la acción paracrina de las células de Sertoli.

El relativo y acumulativo volumen de células de Leydig fetales decrece después del nacimiento, durante la primera y segunda semana postnatal (Lording and De Krester, 1972).

Se ha sugerido a manera de hipótesis que el decremento relacionado a la edad en la producción de testosterona por las células de Leydig fetales durante los últimos días de la gestación puede resultar de una disminución en las concentraciones de esteroides usados como sustratos para su biosíntesis (Huhtaniemi and Pilliniemi, 1992). El decremento en la función de las células de Leydig durante la vida fetal puede resultar de un decremento en el efecto o la concentración de algún factor actuando positivamente paracrino/autocrino, pero estos datos son todavía de controversia en la materia.

### *2.3.3. Desarrollo de las células germinales en la etapa fetal*

Durante el desarrollo fetal de los testículos de los mamíferos, las células espermatogénicas primitivas o gonocitos, inician varias ondas de actividad proliferativa, donde la duración y la extensión varía substancialmente de especie a especie. Los períodos de división de las células germinales que ocurren antes de la pubertad son llamados pre-espermatogénesis (Hislcher et al., 1974) y las células germinales que participan en estos eventos son descritas terminológicamente por su relación de la presencia o ausencia de mitosis de cada estadio.

Los gonocitos proliferan muy poco en su migración temprana dentro de la cresta gonadal. Una vez envueltos por las células de Sertoli durante la formación de los cordones, ellos cesan de dividirse por un período. Según Byskov (1986) la inclusión de los gonocitos dentro de los cordones es de sobrevivencia para los

mismos, ya que en el espacio intersticial degeneran. En la rata todos los gonocitos dentro del testículo son mitóticamente quiescentes hasta el día 12 de vida fetal (Hilscher et al., 1974), tiempo en el que ellos reinician la mitosis y continúan su división por varios días. En los últimos días de vida fetal y los primeros después del nacimiento, los gonocitos permanecen no proliferativos y se agrandan notablemente. Es en este período que substancialmente el número de gonocitos degeneran (Byskov, 1986). Esta degeneración probablemente acontece por el decremento en el diámetro de los cordones seminíferos y en número de células germinales (Clermont and Huckins, 1968).

## **2.4. CÉLULAS DE SERTOLI**

### *2.4.1. Características estructurales de las células de Sertoli*

La forma columnar inusual de la célula de Sertoli refleja una configuración tridimensional de gran complejidad, ya que continuamente debe alterar su forma para acomodar las transformaciones estructurales y la movilización de células germinales desde la base a la superficie libre del epitelio seminífero (De Kretser and Kerr, 1994).

Estudios estructurales de las células de Sertoli de la rata en los estadios II, VII, VIII, IX-XI del ciclo espermatogénico representa variaciones en la forma que parecen primero indicar configuraciones irregularmente altas y desordenadas (Kerr, 1984). Asimismo, los márgenes de las células de Sertoli son obligados a experimentar transformaciones para permanecer en asociación con: a) los volúmenes esféricos expandiéndose ejemplificados por las espermatogonias, espermatocitos y espermátides, b) espermátides maduras, c) mitosis espermatogonial y las divisiones de maduración meiotica, y d) la formación y subsiguiente resolución del exceso de residuo citoplasmático de las espermátides. La reconstrucción del perfil entero de las células de Sertoli de muchas micrografías de cada célula revela que en la mayor proporción del ciclo

espermatogénico de la rata, la forma general de la célula es mejor descrita como alta, irregularmente columnar y con numerosos procesos laterales muy delgados y huecos cilíndricos para acomodar la penetración de las espermátides elongadas.

#### *Características estructurales*

*Núcleo.* En una amplia variedad de animales, el núcleo de las células de Sertoli exhibe una morfología característica visible con facilidad dentro del área basal del epitelio seminífero. El núcleo es grande, irregular y usualmente ocupa una posición dentro del área basal de la célula, el cual descansa sobre la membrana basal del epitelio seminífero. Usualmente los núcleos forman una sola fila, aunque a veces son desplazados hacia las regiones lumbinales del túbulo seminífero. Frecuentemente la membrana nuclear está altamente plegada. En roedores, la forma y posición del núcleo de las células de Sertoli varía de acuerdo al estadio del ciclo espermatogénico. El núcleo puede ser frecuentemente triangular o poligonal en aspecto, alternativamente ellos pueden aparecer elongados, conforme las espermátides elongadas se desarrollan (Fouquet, 1974). Dentro de las porciones terminales de los túbulos seminíferos cerca de sus uniones con el túbulo recto, las células de Sertoli exclusivamente ocupan estos segmentos terminales, donde su núcleo llega a ser fuertemente empaquetado, elongado y altamente irregular en perfil (Dym, 1974).

La fina estructura del nucleoplasma de las células de Sertoli revela una distribución homogénea de eucromatina con una fina textura fibrillogranular. En la región se localizan grupos densamente teñidos y compactadas masas de heterocromatina, aunque en raras ocasiones pequeñas masas de heterocromatina pueden estar dentro del nucleoplasma o asociados con la membrana nuclear (Ramos et al., 1979).

*Citoplasma:* las regiones basales del citoplasma contienen una abundancia de organelos e inclusiones, mientras las extensiones apicales usualmente exhiben un número pequeño de tales estructuras.

En los testículos de rata y ratones, el aparato de Golgi de las células de Sertoli consiste de una red primaria, y de láminas membranosas perforadas por estrechos puentes.

Las células de Sertoli contienen cantidades limitadas de retículo endoplásmico rugoso o granular, esto es sorprendente, en vista de la gran evidencia de que las células de Sertoli producen numerosas proteínas (Lalli, et al., 1984), algunas de las cuales, tales como la proteína ligadora de andrógenos, son secretadas en el lumen de los túbulos. Otras, tales como la hormona glicoprotéica inhibina, puede ser secretada por las células de Sertoli para circular en el plasma e influenciar la secreción de FSH (Robertson et al., 1985). El retículo endoplásmico liso ha sido referido como vesicular, tubular, cisternal, fenestrado o lamelar. En células de Sertoli de ratas, el retículo endoplásmico liso experimenta cambios cíclicos en la morfología, desde tubular a vesicular, en asociación con el ciclo espermatoogénico.

#### 2.4.2. *Funciones*

Los túbulos seminíferos componen la porción proximal del continuo sistema conductual que comprende el tracto reproductivo del macho. El túbulo seminífero es un epitelio complejo compuesto de células de Sertoli y células germinales las cuales descansan sobre la lámina basal. Las uniones estrechas entre las células de Sertoli adyacentes forman la base estructural de la más importante porción de la barrera hemotesticular (De Kretser and Kerr, 1994). Parte de la evidencia que indica la existencia de la barrera hemotesticular es que la composición del fluido dentro del túbulo seminífero y la rete testis es diferente de aquella encontrada en la sangre y linfa testicular. Una consecuencia funcional de la barrera hemotesticular es mantener un gradiente de iones, moléculas pequeñas y proteínas entre la sangre y el fluido tubular.

Las células de Sertoli secretan productos que provee a las células germinales en desarrollo un ambiente único, el cual es mantenido por la barrera hemotesticular. La barrera protege a las células germinales en desarrollo de

agentes mutagénicos al excluir moléculas pequeñas. Toda vez que los espermatozoides son inmunogénicos, la barrera hemotesticular también sirve para secuestrar a esta población de las células del sistema inmune.

Las células de Sertoli producen más de 100 proteínas diferentes (Bardin et al., 1988), cerca de una tercera parte de ellas han sido caracterizadas o identificadas (Ségou, 1992, 1993). Probablemente, todas están involucradas en la comunicación células de Sertoli-células germinales, como factores que controlan la proliferación celular, diferenciación y metabolismo; transporte o proteínas de unión, proteasas, componentes de la matriz extracelular; metabolitos energéticos; y componente de los complejos de conexión o de la membrana de las células de Sertoli (Ségou et al., 1993).

Las células de Sertoli dedican un porcentaje alto de su síntesis de proteínas para la síntesis y secreción de glicoproteínas (Griswold, 1993). Las glicoproteínas secretadas por las células de Sertoli pueden ser colocadas en varias categorías de acuerdo a sus propiedades químicas. La primer categoría incluye las proteínas transportadoras tales como transferrina y ceroplasmina (Sylvestre, 1993). La segunda categoría de proteínas secretadas incluye proteasas e inhibidores de proteasas, supuestamente importantes en procesos de remodelación de tejidos que ocurren durante la espermiación y movimientos de espermatozoides dentro del compartimiento adluminal (Fritz et al., 1993). La tercer categoría de secreciones de las células de Sertoli incluye las glicoproteínas que contribuyen en la conformación de la membrana basal entre las células de Sertoli y las células peritubulares (Skinner, 1993). Finalmente, las células de Sertoli secretan un clase de glicoproteínas reguladoras, las cuales funcionan como factores de crecimiento o factores paracrinos e incluyen productos tales como la AMH e inhibina (Skinner, 1993).

#### 2.4.3. *Las células de Sertoli y la espermatogénesis*

La espermatogénesis en altos vertebrados es dependiente de las funciones de las células de Sertoli. De acuerdo a Griswold (1998), tres líneas de

investigación han enfatizado la importancia de las células de Sertoli en la espermatogénesis en mamíferos. La primera línea menciona que el desarrollo de las células germinales in vivo e in vitro depende de la presencia de las células de Sertoli. La segunda, indica que la función y eficiencia de las células de Sertoli parece ser limitante para el número de células germinales. La tercera línea, señala que la regulación endocrina de la espermatogénesis es resultado de la acción hormonal en las células de Sertoli (Fritz, 1978). Los andrógenos y la FSH ejercen sus acciones en la espermatogénesis por interacción con receptores localizados en o sobre la membrana plasmática de las células de Sertoli (Fritz, 1978).

El número de células de Sertoli establecido durante el período prepuberal determina la talla testicular final y el número de espermatozoides producidos en animales sexualmente maduros (Berndtson et al., 1987; Johnson et al., 1994). Esto es debido a que la división de las células de Sertoli ocurre antes de la pubertad, posterior a esta la población de las células permanece estable. Las células de Sertoli pueden soportar solamente un limitado número de células germinales (Franca and Russell, 1998; Russell and Peterson, 1984;). El período de proliferación postnatal de células de Sertoli está bien establecido en ratas y ratones (Joyce et al., 1993; Orth, 1984; Vergouwen et al., 1991).

Uno de los descubrimientos que soportan el requerimiento de las células de Sertoli en la espermatogénesis, es que el número de células de Sertoli parece limitar el número de células germinales (Berndtson et al., 1987, 1990; Hoehereau et al., 1987). El número máximo de células germinales soportadas por las células de Sertoli varía entre especies, pero esto es constante dentro de una especie (Russell et al., 1990).

El mantenimiento y control de la función testicular y el proceso de la espermatogénesis requiere interacciones cooperativas entre los diferentes tipos de células somáticas (Skinner, 1987). Un tipo de células críticas son de Sertoli, las cuales ayudan a formar el túbulo seminífero y proveen la citoarquitectura y soporte nutricional para el desarrollo de las células germinales. Por lo tanto, la regulación de la función y diferenciación de la célula de Sertoli indirectamente afecta el



desarrollo de la célula germinal. Las células peritubulares forman el borde exterior de los túbulos seminíferos y en conjunción con las células de Sertoli producen la membrana basal requerida para el mantenimiento morfológico del túbulo normal (Norton, 1992).

La diferenciación de las células de Sertoli primordiales empieza durante la vida fetal, seguida por un período de rápida proliferación, el cual en las ratas empieza al final de la vida fetal y continúa durante el período neonatal hasta el inicio de la espermatogénesis; período en el que las células de Sertoli detienen la proliferación y experimentan diferenciación en células adultas (Bardin et al, 1994). Aunque la población de las células de Sertoli en el adulto es determinada durante el período proliferativo en una edad temprana, algunos factores disminuyen o aumentan este proceso, el cual puede tener profundos efectos en la población de las células de Sertoli. Las cuales determinarán la talla testicular y la producción espermática.

La hemicastración de animales prepuberales induce la hipertrofia del testículo remanente, caracterizado por incremento en el número de células de Sertoli (Orth et al., 1984) y células espermáticas (Simorangkir et al., 1995), los cuales son asociados con grandes concentraciones de FSH y receptores para FSH (Orth et al., 1984; Schanbacher et al., 1987a). La magnitud de la hipertrofia es grande cuando la cirugía es realizada a una edad temprana (Cunningham et al., 1978). Lo cual sugiere favorables efectos de la FSH en la población de las células de Sertoli indiferenciadas, induciendo una gran tasa de proliferación y estimulando la espermatogénesis.

Otro interesante descubrimiento en ratas es que el hipotiroidismo inducido durante la vida postnatal temprana, incrementó la talla testicular hasta en un 80% y la producción espermática en más de 140% comparados con los testigos. Asimismo fue asociado con incrementos de 157% en las células de Sertoli, 100% en espermátocitos preleptotenes y espermátogonias y, 69% en células de Leydig (Cooke et al., 1994).

Información adicional de la importancia de las células de Sertoli en la espermatogénesis es mostrada en la especies reproductivas estacionales. En carneros, el número de células de Sertoli permanece relativamente estable a través del año, pero la actividad metabólica de estas células varía entre la estación reproductiva y la no reproductiva, en respuesta al fotoperíodo (Courrot, 1980). Sin embargo, en algunas especies estacionales, como el venado rojo (Hochereau- de- Reviere and Lincoln, 1978) y los caballos (Jonson and Thompson, 1983), existe una clara evidencia de las fluctuaciones en el número de células de Sertoli, en respuesta a los cambios estacionales, con incrementos en el número durante la estación reproductiva y decrementos en el número durante la estación no reproductiva.

## **2.5. FACTORES REGULADORES DE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE SERTOLI**

### *2.5.1. Hormona Folículo Estimulante ( FSH)*

Las células de Sertoli tienen la capacidad de unir FSH y contienen mRNA para receptores FSH (Kliesch et al. 1992). Se han reportado receptores para FSH en espermatogonia (Orth and Christensen, 1978), y es argumentado que la acción de la FSH es mediada a través de las células de Sertoli. Muchos estudios han mostrado que la FSH estimula la síntesis de mRNA y proteínas en células de Sertoli inmaduras (Means et al., 1976) e incrementa la secreción de proteínas específicas tales como proteína ligadora de andrógenos (ABP), transferrina e inhibina (Gonzalez et al., 1988).

Además de estimular la secreción de las células de Sertoli, la FSH juega un importante papel en el citoesqueleto y en las uniones célula germinal-célula de Sertoli. Esta acción puede estar relacionada a la capacidad de las células de Sertoli a unirse a espermátides, garantizando su retención dentro del epitelio del túbulo seminífero.

Varios aspectos del metabolismo de las células de Sertoli son regulados por la FSH, sugiriendo que la FSH así como testosterona influyen en el metabolismo de los lípidos en esta célula; sin embargo la naturaleza exacta del efecto no está bien establecido. La actividad colesterol esterasa de la célula de Sertoli es también modulada por la FSH. La FSH influye en el metabolismo energético de la célula de Sertoli, que incluye la estimulación de la salida de la glucosa (May and Mita, 1984), producción de lactato (Mita et al., 1982) y la actividad del glucógeno fosforilado (Slaughter and Means, 1983).

La FSH tiene un papel clave en la promoción del desarrollo y división de las células de Sertoli en el desarrollo testicular y lo mismo en la capacidad reproductiva del animal. En soporte, la hipertrofia testicular, llevada a cabo por la elevación de la FSH inducida por hemicastración, ocurre solamente si la hemicastración es hecha antes de finalice el período proliferativo de las células de Sertoli.

La FSH es considerada el principal factor responsable de la división de las células de Sertoli (Orth, 1982, 1984; Almirón and Chemes, 1988). La FSH tiene una profunda influencia sobre la proliferación de las células de Sertoli en el período pre y postnatal (Orth, 1984). La FSH tiene un efecto de estimulación dependiente de la edad en la proliferación en el testículo postnatal temprano. Observaciones de estudios in vitro en ratas, indican que la proliferación de las células de Sertoli en respuesta a FSH es alta inmediatamente después del nacimiento y cesa en el día 18, correspondiendo al modelo observado para proliferación normal de células de Sertoli en vivo (Orth, 1982). Esta hormona también regula la proliferación de las células de Sertoli en el neonato (Orth, 1984). Antes de los 20 días de edad en la rata, la FSH incrementó la síntesis de DNA y la actividad mitótica en las células de Sertoli (Griswold et al., 1976, 1977). Esta respuesta disminuye con el incremento en la edad y no está presente en el adulto.

La habilidad de la FSH para actuar en las células de Sertoli en el testículo de las ratas adultas depende del estadio del ciclo espermatogénico dentro del túbulo seminífero. Diferencias en el prolongamiento de la estimulación de FSH

entre estadios del ciclo son el resultado de las diferencias en el número de receptores de FSH presentes. El número de receptores de FSH en el testículo (número por célula de Sertoli) de carneros adultos se incrementó alrededor de un 70% durante la activación estacional testicular. Esto puede explicar el cambio brusco y el reciclaje de receptores unidos a membrana que ocurre en las células de Sertoli (Bardin et al., 1994), ya que se estimula el reflejo de unión a FSH de los receptores. En el reinicio del desarrollo estacional testicular, el número de células de Sertoli se mantuvo constante, pero el número de células germinales se incrementó significativamente. Los resultados indican que la FSH regula sus propios receptores en el carnero, además de otros factores tales como la interacción paracrina entre células germinales y células de Sertoli (Simoni et al., 1997), por eso la influencia en la secreción de inhibina y otras funciones de las células de Sertoli depende de la FSH.

### 2.5.2. *Hormonas tiroideas*

La hormona tiroidea se considera que inhibe la división de las células de Sertoli pero promueve su diferenciación. La hormona tiroidea actúan directamente sobre sus receptores, los cuales son expresados en altos niveles en la proliferación de las células de Sertoli, y declinan hacia el final del periodo proliferativo (Orth, 1984). Un novedoso papel de la hormona tiroidea en la división de las células de Sertoli ha sido demostrado en la inducción de hipotiroidismo neonatal transitorio en ratas, que conduce a una extensión en la duración de la mitosis de las células de Sertoli por 30 días, un incremento que tiene lugar en la presencia de pocos bajos de FSH (Kirby et al., 1992). Las hormonas tiroideas pueden afectar las funciones testiculares directa e indirectamente (Palmero et al., 1988), pero estos efectos varían dependiendo de la edad del animal (Meisami et al., 1994). Los testículos de animales adultos se considera que no responden a las hormonas tiroideas (Oppenheimer et al., 1974). Lo anterior soporta el concepto de un papel crítico para las hormonas tiroideas en el desarrollo testicular durante el período perinatal. El 6-propyl-2 thiouracil (PTU) un potente goitrógeno reversible,

indujo un hipotiroidismo neonatal transitorio y resultó en un incremento de la talla testicular adulta y producción espermática en ratas (Cooke and Meisami, 1991), hamsters (Kirby et al., 1993) y ratones (Joyce et al., 1993). Las concentraciones en suero de FSH y LH fueron reducidas significativamente en ratas hipotiroideas sin afectar las concentraciones de testosterona. El incremento en la talla testicular en ratas adultas tratadas con PTU fue también acompañado por un aumento en la producción espermática. La producción espermática diaria (DSP) aumentó en un 83% a los 90 días de edad y alcanzó el nivel máximo por el día 160 de edad, cuando la DSP en ratas tratadas con PTU fue de 140% más de lo observado en los testigos (Cooke, 1991).

En la rata, la máxima proliferación de las células de Sertoli ocurre al final de la gestación y en el período perinatal (Orth, 1982), coincidiendo con el inicio de la función de la tiroides fetal (Dubois and Dussault, 1977), con la máxima capacidad de unión de  $T_3$  en el testículo (Jannini et al., 1990) y con la expresión de la secreción de proteína ligadora de andrógenos (ABP) inducida por FSH, producción de cAMP y actividad aromatasa. El número de células de Sertoli dividiéndose decrece con el incremento de la edad postnatal y cesa antes de la pubertad (Collard and Griswold, 1987); por este tiempo la capacidad de unión de  $T_3$  (Jannini et al., 1990) y expresión de receptores de tiroides en células de Sertoli son disminuidos significativamente. La FSH es la principal señal para la proliferación de las células de Sertoli y esta consideración está involucrada en la hipertrofia testicular compensatoria después de la hemicastración neonatal o en la inmunización contra estradiol, inhibina o GnRH. Datos recientes sobre la acción de  $T_3$  sobre el desarrollo de los testículos indican que la misma está involucrada dramáticamente en la regulación de la talla testicular final, por afectar la diferenciación del epitelio seminífero (Janini, 1995).

En la rata, las células de Sertoli al nacimiento están diferenciadas. Estas células, como consecuencia experimentan maduración estructural de hormonas y actividad bioquímica durante la vida postnatal, transformándose a una célula de Sertoli madura que caracteriza al testículo puberal y adulto (Gondos and

Berndtson, 1993). Francavilla et al., (1991) demostraron que el hipotiroidismo postnatal inhibió la diferenciación de las células de Sertoli y causó un retraso en la aparición del lumen de los túbulos seminíferos y un rechazo en la aparición de lípidos citoplasmáticos en estas células. Además, el hipotiroidismo incrementó la degeneración de las células germinales y bloqueó la progresión de las células germinales para el desarrollo de una espermatide (Francavilla et al., 1991). Estos resultados, subsecuentemente confirmados por Van Haaster et al., (1992) usando PTU, sugirieron que las hormonas tiroideas son necesarias para la diferenciación normal de las células de Sertoli y el desarrollo de su capacidad para soportar la total espermatogénesis.

Las concentraciones de  $T_4$  son disminuidas en ratas tratadas por 5 días con PTU (Kirby et al., 1992). Durante la mayoría del periodo de tratamiento de PTU, los niveles de  $T_4$  caen hasta el límite de la detectabilidad (Kirby et al., 1992; Tamasy et al., 1986). Las concentraciones de  $T_3$  son también suprimidas durante el tratamiento de PTU, pero en un grado menos severo (Kirby et al., 1992; Tamasy et al., 1986). Siguiendo al cese del tratamiento de PTU, las concentraciones de estas dos hormonas incrementaron y retornaron a lo normal aproximadamente a los 45 y 50 días (Kirby et al., 1992; Tamasy, 1986).

Los primeros trabajos establecieron que el hipotiroidismo mas que el propio PTU es el responsable de los cambios testiculares. Sin embargo, no esta claro si el hipotiroidismo afecto el desarrollo testicular directamente, al producir otros cambios como son alteraciones en la circulación de las hormonas pituitarias o de otro tipo, las cuales pueden ser responsables del incremento en la talla testicular y la producción espermática. (Cooke et al., 1994).

La primera semana de vida postnatal ha sido identificada como el período crítico de los efectos del PTU (Cooke et al., 1992).

El número de células de Sertoli parece ser el principal regulador de la magnitud de la producción espermática en la rata (Berdtson and Thompson, 1990; Orth et al., 1988), ovino (Hochereau de Reviers et al., 1984), caballo (Jonhson y Thompson, 1983), y humano (Jonhson et al., 1984). Durante la vida neonatal, la

proliferación de las células de Sertoli en la rata es al inicio alta pero posteriormente decrece lentamente. Esta proliferación termina antes de las 3 semanas de edad (Orth, 1982), al llevarse a cabo la diferenciación de estas células (Gondos and Berndtson, 1993), permitiendo a esta edad, establecer la población de células de Sertoli adulta (Cooke et al., 1992).

El incremento en las poblaciones de las células de Sertoli por tratamientos de PTU, se debe a una mayor mitogénesis de estas células en respuesta en la presencia de algunos factores estimuladores, una disminución en un factor que fue normalmente inhibitorio, o puede también resultar de una alteración en la cinética normal de la división de las células de Sertoli adulta (Cooke et al., 1992; Naggy, 1972).

Cooke et al., (1992) establecieron que el PTU actúa por aumentar el periodo de proliferación neonatal de las células de Sertoli en la rata y, por afectar lentamente la disminución normal en la tasa de mitogénesis de las células de Sertoli durante la vida neonatal.

Según estudios previos usando PTU, se indica que el nivel de FSH, el mitógeno primario para el desarrollo de las células de Sertoli, fue menor durante el periodo de proliferación de las células de Sertoli, indicando claramente que el aumento en la mitogénesis no fue debido a la exposición de FSH aumentada. Además, datos recientes indican que los niveles de mRNA testicular para el receptor de FSH, no aumentaron durante el período postnatal temprano, sugiriendo que el incremento en la respuesta mitogénica a FSH no fue tampoco el responsable por el incremento en la proliferación de las células de Sertoli (Bunick et al., 1993). La aparente ausencia de uno u otro incremento en la estimulación de FSH en la respuesta de las células de Sertoli en las ratas tratadas con PTU, así como la presencia de receptores de hormonas tiroideas en las células de Sertoli y la habilidad de estas hormonas para afectar la actividad secretora de estas células, que el efecto de PTU resulto de efectos directos de las hormonas tiroideas sobre las células de Sertoli. Las hormonas tiroideas normalmente trabajan para inhibir la proliferación de las células de Sertoli. Estudios por Van Haaster et al.,

(1993) indican que la inducción del hipertiroidismo en ratas neonatales causó una prematura terminación de la proliferación de las células de Sertoli y una disminución en la talla testicular esperada.

En ratas recién nacidas, largamente expuestas en vivo a  $T_3$  por 16 días, aceleraron el desarrollo testicular por reducir la actividad proliferativa de las células de Sertoli y gonocitos, anticipando la formación del lumen, y reduciendo el peso final del testículo adulto (Van Haaster et al., 1993). Más que un efecto directo sobre la tasa de proliferación de las células de Sertoli, parece que la  $T_3$  acelera la diferenciación terminal de células de Sertoli inmaduras en células proliferativas funcionales (Van Haaster et al., 1993). El hipotiroidismo crónico producido por la administración de methimazole desde el nacimiento a la pubertad, induce a un retraso en la maduración de los túbulos seminíferos, en su diámetro y en el número de células germinales por túbulo, con incremento en la degeneración y arresto en la maduración, conduciendo a una talla testicular final reducida (Chowdhury et al., 1984; Francavilla et al., 1991; Van Haaster et al., 1993). Además las células de Sertoli muestran desarrollo retrasado, como se indicó por el retraso en la aparición de los lípidos citoplasmáticos y en el desarrollo del lumen tubular (Francavilla et al., 1991).

Las hormonas tiroideas estimulan a las células de Sertoli a secretar nutrientes (lactato), esencial para la sobrevivencia de las células germinales (isa) y factores de crecimiento, tales como IGF-I, el cual estimula la síntesis de DNA en células germinales mitóticas (Soder et al., 1992). De esta manera, los efectos de  $T_3$  sobre el grupo de línea germinal probablemente resultan de una señal paracrina desde las células de Sertoli (Janini, 1995). Las hormonas tiroideas parecen ser cruciales en la regulación de la mitogénesis y en el establecimiento de la función secretora de las células de Sertoli del testículo durante el período postnatal temprano, lo cual se refuerza por: a) Los receptores de la hormona tiroidea son expresados en niveles altos durante el final de la vida fetal y las primeras semanas del testículo postnatal en desarrollo, predominantemente en las células de Sertoli; b) Las deficiencias de las hormonas tiroideas retardan la



diferenciación de las células de Sertoli y las hormonas tiroideas directamente estimulan la producción de proteínas clave secretadas por las células de Sertoli de ratas juveniles in vitro; y c). Alteraciones del ambiente de las hormonas tiroideas durante el desarrollo pueden ser usadas para producir un incremento en la talla testicular, producción espermática y la proliferación neonatal y/o número de células de Sertoli adultas, células de Leydig, células peritubulares y células germinales (Cooke et al., 1994).

La producción de ciertas proteínas tales como IGF-I se disminuyeron en células de Sertoli de ratas hipotiroideas y, las hormonas tiroideas directamente afectaron in vitro la secreción de proteínas tales como ABP e IGF-I de células de Sertoli inmaduras (Fugassa et al., 1987; Palmero et al., 1989, 1990).

Cooke et al., (1993) propusieron un mecanismo por el cual las hormonas tiroideas, normalmente actúan de forma directa sobre las células de Sertoli durante la vida neonatal para causar en ellas su diferenciación de su estado mitogénico postnatal temprano al no-mitogénico. En animales tratados con PTU, las concentraciones de las hormonas tiroideas se reducen lentamente, en la transición desde un estado mitogénico a un estado secretor maduro, resultando en una mitogénesis prolongada y una población de células de Sertoli incrementada.

El mecanismo por el cual la ausencia de las hormonas tiroideas, puede de manera directa estimular la mitogénesis de las células de Sertoli permanece poco claro. Este efecto puede involucrar la modulación de la respuesta a FSH, que es también crítico para la iniciación de la actividad secretora en la maduración. Parece poco probable que el hipotiroidismo esté actuando por alteración de la cinética de la división de las células de Sertoli (Nagy, 1972), debido a que el tratamiento con PTU decreció la duración del ciclo de la célula en la proliferación de las células de Sertoli, esto pudo resultar en un aumento en la mitogénesis durante el período proliferativo normal, pero no la marcada extensión en la proliferación de las células de Sertoli actualmente observada en ratas tratadas con PTU. Mientras que el escenario más probable es que la deficiencia de hormona tiroidea inhibe la transición de las células de Sertoli desde la inmadurez, del pool

de células en proliferación dentro del pool de más diferenciadas, células no mitogénicas.

El incremento en la población de las células de Sertoli en ratas tratadas con PTU puede producir un aumento en la proliferación de las células germinales, células de Leydig y células peritubulares que caracterizan este fenómeno. Los efectos estimuladores del hipotiroidismo temprano sobre la población de las células de Sertoli, Leydig, germinales y peritubulares son inicialmente enmascarados por la inmadurez de las células de Sertoli en animales hipotiroideos. Esta inmadurez resultó en un retardo en el lumen abierto de los túbulos seminíferos y la inhabilidad de estas células de Sertoli para soportar los estadios avanzados de las células germinales en desarrollo, el cual conduce a la degeneración de las células germinales e incremento en la talla testicular observada en estos animales. El reestablecimiento del eutiroidismo permite la completa madurez de las células de Sertoli; la población de las células de Sertoli incrementada entonces interactúa con la población espermatogénica característica en adultos tratados con PTU.

Los receptores testiculares de las hormonas tiroideas fueron primero detectados en las células de Sertoli de la rata postnatal temprana, y últimamente demostrados en las células de Sertoli de cerdos jóvenes (Palmero et al., 1992). El período mitogénico de las células de Sertoli es muy corto en ratas y ratones; empieza al final de la gestación para ambas especies y continua hasta 12 días postnatales en ratones (Joyce et al., 1993; Vergouwen et al., 1991) y cerca de 16 días en la rata (Orth, 1982; Van Haaster et al., 1992). Consecuentemente, la mitogénesis de las células de Sertoli no ha sido cuantificada en otras especies, pero la proliferación neonatal de las células de Sertoli se extiende fuera de 60 días en el conejo y 40 en los ovinos (Gondos y Berntson, 1993). Además resultados preliminares de Hess y Cooke indican que en toros la proliferación de las células de Sertoli puede ser detectada después de los 5 meses de edad. Existen diferencias en la longitud del período proliferativo postnatal, la intensidad de la proliferación varía entre especies durante este período.

Cooke (1994) hipotetizó que el tratamiento de PTU sería más efectivo en especies en las cuales los intervalos proliferativos de las células de Sertoli fuesen cortos, ya que la mitogénesis de las mismas es inicialmente alta, pero tiende a caer repentinamente en un período corto. Consecuentemente, los tratamientos con PTU pudieran ser menos efectivos en especies en las cuales la tasa máxima de proliferación de las células de Sertoli es baja, pero la mitogénesis ocurre sobre un período prolongado.

### 2.5.3. *Activina e inhibina*

Las activinas son miembros de la familia de factores de crecimiento TGF $\beta$ , son formados por la dimerización de dos subunidades llamadas  $\beta_A$  y  $\beta_B$  de tres proteínas, activina A (dimerio  $\beta_A \beta_A$ ) activina B ( $\beta_B \beta_B$ ) y activina AB ( $\beta_A \beta_B$ ). La inhibina, la cual antagoniza con algunas de las acciones de activinas, resulta de la dimerización de una subunidad común  $\alpha$  con otra subunidad  $\beta$  para formar inhibina ( $\alpha \beta_A$ ). Ambas inhibina y follistatin, una activina unida a una proteína con la capacidad de antagonizar esencialmente todas las acciones conocidas de las activinas, son también producidas en el testículo. Varios estudios han demostrado que en el testículo de animales perinatales, la proteína de la subunidad  $\alpha$  de la inhibina es expresada en células de Sertoli y células de Leydig, pero no en células germinales (Cuevas et al., 1987; Jarred et al., 1999; Madjic et al., 1997). El mRNA de follistatin ha sido reportado en células de Sertoli (Kaipa et al., 1992) y en algunas células germinales del testículo adulto (Meinhardt et al., 1998; Ogawa et al., 1997). En estudios previos, donde se usaron fragmentos de cultivos, se encontraron cambios dependientes de la edad en función de la activina y la FSH como reguladores de la proliferación de las células de Sertoli en el desarrollo del testículo postnatal temprano de ratas (Boitani et al., 1995). En otros estudios, la adición de activina A a cocultivos de células de Sertoli y células germinales en el día 20 del testículo de la rata incrementó la proliferación espermática y la formación de cordón (Mather et al., 1990); solamente el último de estos procesos fue bloqueado por la adición de follistatin (Mather et al., 1993).

La activina y la FSH parecen influenciar la proliferación de las células de Sertoli y de las células germinales en el testículo de la rata, ya que sus efectos en las células de Sertoli han sido observados por cambios durante el desarrollo postnatal. Las acciones coordinadas de activinas y sus antagonistas, follistatin e inhibina, pueden determinar la progresión del desarrollo del testículo temprano en presencia de FSH (Boitani et al., 1995).

La FSH estimula a las células de Sertoli para producir la subunidad  $\alpha$  de la inhibina (Toeboosch et al., 1988; Morris et al., 1988; Bicsak et al., 1987; Bhasin et al., 1994), la cual puede causar un cambio de la producción de activina a inhibina en estas células, pero sin alterar la síntesis de FSH (Michel et al., 1993). Generalmente, la maduración de los gonocitos a espermatogonia puede resultar de los efectos combinados de follistatin e inhibina como antagonistas de activina, con FSH como estímulo para regular el factor celular y la producción de inhibina.

La concentración de inhibina en carneros es incrementada al final de la vida fetal (Miller et al., 1997) y en los primeros meses después del nacimiento (Schanbacher, 1988; Sanford et al., 2000), cuando las células de Sertoli están finalizando su proliferación (Hochereau-de Reviere et al., 1987). Existe un pequeño incremento en la inhibina en carneros maduros durante la activación testicular estacional (Sanford et al., 2000). La inhibina está involucrada en la supresión de la secreción de FSH en la vida fetal tardía (Miller et al., 1997) durante la pubertad (Al-Obaidini et al., 1987; Tilbrook et al., 1999a) y en la edad adulta (McKeown et al., 1997; Tilbrook et al., 1999b). Además, la inhibina dimérica y formas de la subunidad  $\alpha$  de inhibina pueden actuar como reguladores paracrinós y autocrinós en el testículo (Gnessis et al., 1997; Schneyer et al., 1991).

La secreción de inhibina por las células de Sertoli puede ser regulada por mecanismos paracrinós que actúan en el testículo. Las células de Sertoli en algunas especies de roedores y machos humanos tienen receptores de andrógenos, y la función de la célula normal requiere de la testosterona y de la FSH (Sanford et al., 1993). De tal manera, que la testosterona es un candidato

para regular a la inhibina. El efecto de la testosterona puede ser mediado indirectamente por otras células blanco de andrógenos tales como las células mioideas tubulares. Las células peritubulares de la rata secreta un factor paracrino no mitogénico, P-Mod-S, en respuesta a testosterona, el cual estimula la secreción de un número de proteínas de las células de Sertoli, incluyendo inhibina (Gnessi et al., 1997).

#### 2.5.4. Estrógenos

Las células de Sertoli producen cantidades considerables de estrógenos durante el período de división, lo que sugiere que los estrógenos están involucrados en este proceso. La actividad de la aromatasa es alta en las células de Sertoli de ratas prepuberales, declinando en las maduras. Hormonalmente es regulada, principalmente por FSH.

Los estrógenos también pueden estar involucrados en la maduración de las células de Sertoli durante el período post-proliferativo. Sharpe et al. (1998), compararon el efecto de la exposición neonatal a tratamientos con antagonistas de DES o GnRH. Estos estudios mostraron, que de vez en cuando los antagonistas DES y GnRH decrecieron los niveles de FSH y el número de las células de Sertoli, la DES causó un mayor retraso de la maduración de las células de Sertoli y defectos permanentes en la espermatogénesis e histología testicular en el adulto (Sharpe et al., 1998), sugiriendo que los estrógenos exógenos tienen un papel inhibitorio en la maduración de las células de Sertoli.

La teoría propuesta por Dorrington and Khan (1993), de que los estrógenos tienen un efecto estimulador en la división de las células de Sertoli, porque afectan negativamente la diferenciación y desarrollo de las células de Sertoli es soportado por varias observaciones:

- 1.- Por demostrar que la producción de estrógenos es alta en la proliferación de las células de Sertoli (Papadopoulos et al., 1986, 1993; Dorrington and Khan, 1993).

2.- Al final del período de la proliferación de las células de Sertoli, la actividad de aromatasa iniciada e inducida por FSH declina, particularmente debido a un decremento de las células de Sertoli en respuesta a FSH.

3.- Coincidentemente con la caída en la producción de estrógenos y la actividad mitótica de las células de Sertoli, el TGF $\beta$ , el cual puede estimular la mitosis de las células de Sertoli en respuesta a los estrógenos, también declina (Dorrington and Khan, 1993).

4.- La hormona tiroidea, la cual estimula la diferenciación de las células de Sertoli (Bunick et al., 1994; Cooke et al., 1994), decrece la actividad aromatasa en células de Sertoli prepuberales (Ulises et al., 1994).

5.- La capacidad de las células de Leydig para producir testosterona se incrementa aproximadamente a los 14 días posparto (Hardy et al., 1991), y los andrógenos han mostrado que inhiben la actividad aromatasa de las células de Sertoli, directamente (Verhoeven and Cailleau, 1988) o vía efectos mediados por andrógenos en las células peritubulares (Verhoeven and Cailleau, 1988), sugiriendo que los andrógenos de las células de Leydig en maduración puedan participar en la regulación de la aromatasa durante el inicio de la división o diferenciación de las células de Sertoli.

6.- Varios factores de crecimiento producidos por las células de Sertoli pueden controlar la producción de estrógenos de las células de Sertoli y responder a FSH. Regulando de esta manera la aromatasa durante el periodo de la división y la diferenciación (Dorrington and Khan, 1993).

7.- Las células germinales, las cuales están iniciando su desarrollo entre el periodo de división y diferenciación de las células de Sertoli, decrecen la actividad aromatasa de las células de Sertoli (Le Magueresse and Jegou, 1988).

En resumen, la proliferación normal, diferenciación y maduración funcional de las células de Sertoli es esencial para la iniciación de la espermatogénesis y el completo potencial espermatogénico en el adulto. Estudios en los cuales se administran estrógenos muestran que la proliferación y función de las células de Sertoli pueden ser afectadas por estrógenos exógenos y sustancias tipo

estrógenos, conduciendo a defectos permanentes en la función reproductiva en el adulto.

#### 2.5.5. *Andrógenos*

Las células de Sertoli tienen receptores (Sanborn et al., 1977; Tindall et al., 1977) de andrógenos que median los efectos de la testosterona. Algunos de estos efectos simulan a los de la FSH. Algunas de las acciones de la testosterona parecen oponerse a aquellas de FSH; por ej. los andrógenos inhiben el redondeo de las células de Sertoli en cultivo inducido por FSH, presumiblemente por activación de la organización actina (Chevalier and Dufaure, 1981). Existen también cambios morfológicos en las células de Sertoli carentes de andrógenos, estos incluyen alteración en la morfología nuclear y mitocondrial, incremento en la cantidad de gotas lípidicas, y decremento en el retículo endoplasmático liso (Dym and Raj, 1977).

Los efectos en vivo de la testosterona son dependientes del estado de diferenciación del epitelio seminífero. En animales inmaduros hipofisectomizados por un gran período, los niveles testiculares pero no epididimales de rABP se incrementaron posteriormente al tratamiento de andrógenos (Gunsalus et al., 1978). En animales maduros, existe un lento decremento en los niveles de rABP testiculares y epididimales seguido a la hipofisectomía que puede ser prevenido por la administración de andrógenos (Gunsalus et al., 1981). Si las células de Sertoli están completamente diferenciadas, sus funciones pueden ser mantenidas sólo por la testosterona, mientras que la adquisición del típico estado indiferenciado de adultos intactos ocurre en respuesta a FSH.

Finalmente, debe ser notado que parte de los efectos de la testosterona en las células de Sertoli parecen ser mediados por la acción de este esteroide sobre las células mioides testiculares (Skinner and Fritz, 1985).

#### 2.5.6. *Otras hormonas esteroideas*

La hidrocortisona y la progesterona incrementan la secreción de ABP in vitro (Rich et al., 1983). La progesterona también incrementa la RNA polimerasa II en cultivos enriquecidos de células de Sertoli; Wangle et al., sugieren que estas respuestas pueden ser mediadas a través de los receptores de estrógenos (Bardin et al., 1994).

#### 2.5.7. *Insulina y factores de crecimiento tipo insulina (IGF-I)*

Si bien otras hormonas polipeptídicas tales como la insulina no han sido tan extensamente estudiadas como la FSH, se conoce que juegan un papel importante en la regulación de la función de las células de Sertoli. La insulina es considerada como un factor esencial para el crecimiento de estas células en un medio libre de suero, donde tiene efectos sobre múltiples parámetros metabólicos (Mather and Sato, 1979; Karl and Griswold, 1980). Los efectos sobre la función específica diferenciada en las células de Sertoli de la insulina muestran que es esencial para la secreción de transferrina y rABP (Karl and Griswold, 1980).

Un receptor para IGF-I designado receptor IGF tipo I, ha sido bien caracterizado y localizado en la membrana de las células de Sertoli (Borland et al., 1984; Vanelli et al., 1988) y Leydig (Handelsman et al., 1985) y secundariamente en espermatozoides y espermátides tempranas (Tres et al., 1986; Vanelli et al., 1988). Por lo tanto, puede ser postulado que el IGF-I juega un papel autocrino en la regulación de la función de las células de Sertoli y de Leydig y puede jugar un papel paracrino en el ciclo del epitelio seminífero (Baker et al., 2001).

IGF-I puede ejercer un primer efecto en la capacidad de las células de Sertoli para responder a FSH y además estimular la mitogénesis en ambas células inmaduras, de Sertoli y de Leydig (Baker et al., 2001).

#### 2.5.8. *Glucagon*

El glucagon posee efecto sobre las células de Sertoli (Eikvar et al., 1985), incrementando los niveles de cAMP y tiene una magnitud y respuesta cinética



similar a la de FSH. Una de las consecuencias de la estimulación del glucagon es un incremento en la velocidad de la aromatización de la testosterona, una respuesta también producida por FSH (Eikvar et al., 1985).

#### 2.5.9. *Pro-Opiomelanocortina (POMC)-péptidos derivados*

Los péptidos derivados de la hormona precursor a POMC, que incluyen a ACTH,  $\alpha$ MSH y  $\beta$ -endorfina, tienen una variedad de efectos sobre las células de Sertoli (Bardin et al., 1984; Krieger et al., 1984). Para buscar un posible efecto de la  $\beta$ -endorfina sobre los testículos, se realizó una investigación sobre el crecimiento del testículo en animales jóvenes con potentes antagonistas de opioides, nalmefene o la naloxona, inyectados intratesticularmente en ratas neonatas incrementándose la hipertrofia compensatoria seguida de la castración unilateral (Gerendai et al., 1983, 1986). La naloxona y el antisuero de  $\beta$ -endorfina incrementaron la división de las células de Sertoli en cultivos de testículos neonatos (Orth, 1986).

Ratas machos hemicastrados tratadas con un antagonista opioide fueron también asociadas con un aumento en la secreción de rABP (Bardin et al., 1984; Gerendai et al., 1986). El incremento en el tamaño testicular y secreción de rABP seguido de la administración de antagonistas es consistente con la hipótesis que la  $\beta$ -endorfina y otros opioides inhiben la secreción y crecimiento de las células de Sertoli durante el desarrollo testicular temprano y son antagonistas a gonadotropinas durante este período. Recientes estudios han mostrado la presencia de receptores  $\beta$ -endorfinas en las células de Sertoli.

La  $\beta$ -endorfina inhibe la división de las células de Sertoli estimulada por la FSH y otras funciones reguladas por la FSH vía modulación de la actividad de adelinato ciclasa (Boitani et al., 1985; Gerendai et al., 1986; Fabbri et al., 1989), mientras que la ACTH y la  $\alpha$ -MSH estimulan notablemente la división celular y la función de las células de Sertoli, por producción de ABP e inhibina (Bardin et al., 1984; Boitani et al., 1986). La  $\alpha$ -MSH también estimula la producción de cAMP y actividad aromatasa pero inhibe la producción del factor plasminógeno en cultivos

de células de Sertoli de rata juvenil (Boitani et al., 1988). Los efectos de oposición de estos péptidos relacionados en la función de las células de Sertoli proveen un interesante ejemplo de la regulación local. En vivo, las concentraciones de  $\beta$ -endorfina son bajas en el testículo de la rata antes de los 20 días de edad, cuando la división de las células de Sertoli ocurre, y se elevan a valores adultos entre 20 y 60 días de edad (Adams and Cicero, 1989), así que esto soporta in vitro la evidencia de la inhibición de la división de las células de Sertoli mediada por la  $\beta$ -endorfina. De cualquier modo, no puede ser asumido que las endorfinas tienen un papel puramente pasivo en el testículo adulto inhibiendo la división de las células de Sertoli. Las endorfinas pueden estimular la producción de GnRH (Engelhardt, 1989), el cual a su vez puede regular la producción de  $\beta$ -endorfina en el testículo adulto (Fabbri et al., 1989). Las gonadotropinas y los esteroides pueden igualmente regular la producción de  $\beta$ -endorfina dentro del testículo.

La secreción y producción testicular de factores tipo LHRH por células de Sertoli es incrementado por encefalinas (Saint Pol et al., 1988) e inhiben la producción de  $\beta$ -endorfina por las células de Leydig (Fabbri et al. 1989).

## *2.6. Resumen de la revisión de literatura*

De acuerdo a la información consultada, puede notarse la importancia que tienen las células de Sertoli como parte de la formación del testículo, toda vez que la aparición de estas es el primer evento que se identifica en la diferenciación sexual, al caracterizarse por la producción de la hormona antimülleriana que origina la desaparición de los conductos de Müller; así mismo forman parte de la citoarquitectura de los túbulos seminíferos y se unen de manera firme para dar origen a la barrera hemotesticular, la cual origina un microambiente necesario para la meiosis y la espermatogénesis y el aislamiento de las células germinales de los agentes inmunogénicos.

Por otro lado la espermatogénesis es dependiente de las células de Sertoli, ya que la regulación endocrina de esta es el resultado de la acción hormonal en las células de Sertoli, así también el número, función y eficiencia de las células de

Sertoli parece ser limitantes en el número de las células germinales, toda vez que una célula de Sertoli sólo puede soportar un determinado número de células germinales, de acuerdo a la especie.

Finalmente hay que recordar que las células de Sertoli tienen un período de actividad proliferativa muy limitado, el cual regularmente se lleva a cabo en la etapa fetal y postnatal temprana, antes de que ocurra la pubertad, estableciéndose la población total de estas células y la futura talla y producción espermática del individuo.

### 3. REFERENCIAS DE LA REVISIÓN DE LITERATURA

- Adams, M.L., and Cicero, T.J. 1989. The oncogeny of immunoreactive beta-endorphin and beta-lipotropin in the rat testis *Life Sciences* 44 159-166
- Agelopoulou, R., Magre, S., Patsovoudi, E., and Jost, A. 1984. Initial phases of the rat testis differentiation in vitro. *J. Embriology. Exp. Morphol.* 83:15-31
- Al-Obaini Sar., Bindon, B.m., Hillard, M.A., and O'Shea, T. 1987. Reproduction characteristics of lambs actively immunized early in life with enriched preparations from follicular fluid of cows *Journal reproduction and fertility* 81 403-414
- Amann, R. 1983. Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 66:2606-2622
- Attal, J. 1969. Levels of testosterone, androstenedione, estrone and stradiol-17 in the testes of fetal sheep. *Endocrinol.* 280-289
- Bardin, C.W., Chen, C.Y., Mustow, N.A., and Gunsalus, G.L. 1994. The cell. In the physiology of reproduction pp 1291-1333 Eds E. JD Neill. Raven Press, New York
- Inhibin structure and functional testis. In regulation of testicular function: signaling molecular cell-cell communication pp 10-23 Eds L Ewing and B Robais New York Academy
- Bardin, C.W., Morris, P.L., Shaha, C., Feng, Z.M., Rossi, V., Vaughn, J., and Chen, C.L. 1989. Inhibin structure and functional testis. In regulation of testicular function: signaling molecular cell-cell communication pp 10-23 Eds L Ewing and B Robais New York Academy of Sciences, New York
- Bardin, C.W., Shaha, C., Mather, J., Salomon, Y., Margioris, A.N., Liotta, A.S., Gerendai, I., Chen, C.L., Krieger, D.T. 1984. Identification and possible function of pro-opiomelanocortin-derived peptides in the testis. *Ann. NY. Acad. Sci.* 438:346-364.
- Bardin, C.W., Cheng, C., Musto, N., and Gunsalus, G. 1988. The Sertoli cell, in the *Physiology of Reproduction* (Knobil, E., et al., eds) ppp 933-974, Raven Press, New York.
- Berndtson, W., Thompson, T. 1990. Changing relationship between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague-Dawley rats. *J Androl.* 11:429-435
- Berndtson, W., Igboeli, G., Pickett, B. 1987. Relationship and absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *J. Animal Sci.* 64:241-246
- Bhasin, S., Krummen, K.A., Swerdloff, R.S., Morelos, B.S., Kim, W.H., diZerega, G.S., Ling, N., Esch, F., Shimasaki, S., and Toppari, J. 1989. Stage-dependent expression of inhibin  $\alpha$  and B-subunits during the cycle of the rat seminiferous epithelium *Endocrinology* 124 169-178
- Bhasin, S., Rosenberg, L., Strathearn, M., Sod Moriah, U.A., Krummen, K.A., Burger, H., Albiston, A., and Najmabadi, H. 1994. Transcriptional regulation of inhibin alpha and beta B subunit genes by 3',5' cyclic-adenosine monophosphate. In *inhibin and inhibin-related peptides* 209-22. Ares Serono symposium, Rome
- Bicsak, T.A., Vele, W., Vaughn, J., Tucker, J., Cappel, S., and Hsuen, A.J. 1987. Hormonal regulation of inhibin production by cultured Sertolli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 49 211-218
- Blau, H., Baltimore, D. 1991. Differentiation requires continuous regulation. *J Cell Biol.* 112:781-783
- Bloch, E. 1979. Fetal gonadal endocrine activity and reproductive tract differentiation. *Contrib. Gynec. Obstet.* 5:21-37

- Boitani, C., Chen, C.L., Canipari, R., and Bardin, C.W. 1988. Expression of the opiomelanocortin (POMC) gene in rat testicular germ cells the response of Sertoli cells to POMC-derived peptides. In the Molecular and Cellular Endocrinology of the testis Eds BA Cooke and RM Sharpe. Serono Symposia Publications, Vol 50 pp 303-309. Raven Press, New York
- Boitani, C., Chen, C.L., Margioris, A.N., Gerendai, I., Morris, P.L., and Bardin, C.W. 1985. Pro-opiomelanocortin-derived peptides in the testis: evidence for a possible role in Leydig and Sertoli cell function *Medical Biology* 63 251-258
- Boitani, C., Mather, J.P., and Bardin, C.W. 1986. Stimulation of adenosine 3'5' monophosphate production in rat Sertoli cells by alpha-melanotropin-stimulating hormone (alpha MSH) and des-acetyl alpha MSH *Endocrinology* 118 1513-1518
- Borland, K., Mita, M., Oppenheimer, C.L., Blinderman, L.A., Massague, J., Hall, P.F., and Czech, M.P. 1984. The actions of insuline-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells *Endocrinology*. 114 240-246
- Bunick, D., Kirby, J., Hess, R.A., Cooke, P.S. 1994. Developmental expression of testis messenger ribonucleic acids in the rat following propylthiouracil-induced neonatal hypothyroidism. *Biol. Reprod.* 51:706-713
- Bunick, D., Kirby, J., Hess, R., Cooke, P. 1993. Effects of neonatal hypothyroidism on the development expression of testis mRNAs in the rat. Program of the XIIth North American testis Workshop, Tampa. FL. P 34 (abstract)
- Byskov, A. 1986. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological Reviews* 66:77-112
- Chowdhury, A., Gautam, A., Chatterjee, B. 1984. Thyroid-testis interrelationship during the development and sexual maturity of the rat. *Arch Androl.* 13:233-239
- Clermont, Y., Huckins, C. 1961. Microscopic anatomy of the sex cords and seminiferous tubules in growing and adult albino rats. *Am. J. Anat.* 100:79-97
- Clermont, Y., Huckins, C. 1968. Evolution of gonocytes in the rat testis during late embryonic and early postnatal life. *Arch. Anat. Hist. Embryol.* 51:3434-354
- Collard, M., Griswold, M. 1987. Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. *Biochemistry.* 26:3297-3303
- Colebrander, B., Rossum, C.M., Van Straaten, H., Van Wensing, C. 1979. The effect of fetal decapitation on the testis and other endocrine organs in the pig. *Biol. Reprod.* 20:198-204
- Cooke, P.S. and Meisami, E. 1991. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinol.* 129:237-243
- Cooke, P.S., Zhao, Y.D., Bunick, D. 1994. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biol Reprod.* 51:1000-1005
- Cooke, P., Hess, A., Porcelli, J., Meisami, E. 1991. Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. *Endocrinology.* 129:244-248
- Cooke, P., Porcelli, J., Hess, R. 1992. Induction of increased testis growth and sperm production in adult rats by neonatal administration of the goitrogen propylthiouracil (PTU): the critical period. *Biol. of Reproduction.* 46:146-154
- Cooke, P., Rex, A., Hess, R., and Kirby, D. 1994. A model system for increasing testis size and sperm production: potential application to animal science. *J Animal Science* 72:43-54

- Cooke, P., Kirby, J., Porcelli, J. 1993. Increased testis growth and sperm production in adult rats following transient neonatal goitrogen treatment: optimization of the propylthiouracil dose and effects of methimazole. *J Reprod Fertil.* 97:493-499
- Courot, M. 1967. Endocrine control of the supporting and germ cells of the impuberal testis. *Journal of Reprod. and Fertil. Supplement.* 2:89-101
- Courot, M. 1980. The regulation of testicular function by pituitary gonadotrophins. *Proc. 9<sup>th</sup> Int. Congr. On Anim. Reprod. And Artif. Insem. Madrid. España, 1980. Vol 2*
- Cuevas, P., Ying, S., Ling, N., Ueno, N., Esch, F., and Guillemin, R. 1987. Immunohistochemical detection of inhibin in the gonad. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142 23-30
- Chong, H., Pangas, S.A., Bernard, D.J., Wang, E., Gitch, J., Chen, W., Cox, E.T., and Woodruff, T.K. 2000. Structure and expression membrane component of the inhibin receptor system. *Endocrinol.* 141:2600-2607
- Dalkin, A., Bourne, G., Pieper, D., Regiani, S., and Marshall, J. 1981. Pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptors during sexual maturation in the rat. *Endocrinol.* 108:1658-1664
- Dorrington, J., Khan, S. 1993. Steroid production, metabolism and release by Sertoli cells. In: Russell LD, Griswold MD. (eds) *The Sertoli cell.* Cache Rivers Press, Clearwater, FL. 538-549
- Dubois, J., Dussault, J. 1977. Ontogenesis of thyroid hormone in neonatal rat. Thyroxine (T<sub>4</sub>) and triiodothyronine (T<sub>3</sub>) production rates. *Endocrinol.* 101:435-442
- Dym, M. 1974. The fine structure of monkey Sertoli cells in the transitional zone at the junction of the seminiferous tubules with the tubuli recti. *Am J Anat.* 140:1-6
- Dym, M., Raj, H.G. 1977. Response of adult rat Sertoli cells and Leydig cells to depletion of luteinizing hormone and testosterone. *Biol. Reprod.* 17:676-696.
- Eikvar, L., Levy, F.O., Attramadal, H., Jutte, N.H., Froyso, A., Tvermyr, S.M., Hansson, V. 1985. Glucagon-stimulate cyclic AMP production and formation of estradiol in Sertoli cell cultures from immature rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 39:107-114.
- Elkington, J.S., Sanborn, B.M., Mertin, M.W., Chowdhury, A.K., Steinberger, E. 1977. Effect of testosterone propionate on ABP levels in rats hypophysectomized at different ages using individual sampling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 203-209.
- Engelhardt, R.P. 1989. Opiodes gonadiques et fonction testiculaire *Annales d' Endocrinologie.* 50:64-72
- Fabbri, A., Jannini, E.A., Gnessi, L., Ulisse, S., Moretti, C., and Isidori, A. 1989. Neuroendocrine control of male reproductive function. The opioid system as model of control at multiple sites *Journal of steroid Biochemistry* 32 145-150
- Fouquet, J. 1974. La spermiation et la formation des corpus residuels chez la hamster: role des cellules de Sertoli. *J Microsc.* 19:161-168
- Franca, L.R., Russell, L.D. 1998. The testis of domestic animals. In: Martinez F, Regadera J (Eds). *Male reproduction: a multidisciplinary overview.* Madrid, Spain: Churchill Livingstone. P. 197-219
- Francavilla, S., Cordeschi, G. Properzi, L., Di Cicco, E., Jannini, S., Palmero, E., Fugassa, B., Loras, D'Armiento, M. 1991. Effect of thyroid hormone on the pre-and post-natal development of the rat testis. *J. Endocrinol.* 129:35-42
- Frederick, W., George, Jean, D., Wilson. 1994. Sex determination and differentiation. In: Knobil E, Neill JD (Eds). *The physiology of reproduction.* "Ed, N Raven Press. p 3-28
- Fritz, I., Tung, P., Ailenberg, M. 1993. Proteases and antiproteases in the seminiferous tubules. In: Russell LD, Griswold MD (eds). *The Sertoli Cell.* Clearwater, FL.: Cache River Press. 217-236

- Fritz, I and Solari, A. 1978. The ultrastructure of immature of immature Sertoli cells. Maturation like changes during culture and the maintenance of mitotic potenciality. *Biol. Reprod.* 18:329-345
- Fröjdman, M., Malmi, R., Pelliniemi, L. 1992. Lectin-binding carbohydrates in sexual differentiation of the rat male and female gonads. *Histochemistry.* 97:469-477
- Fröjdman, M., Pelliniemi, L. 1994. Differential distribution of the alpha 6 subunit of integrins in the development and sexual differentiation of the mouse testis. *Differentiation.* 57:21-29
- Fugassa, E., Palmero, S., Gallo, G. 1987. Triiodothyronine decrease the production of androgen-binding protein by rat Sertoli cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143:241
- Gangnerau, M., Picon, R. 1987. Onset of steroidogenesis and differentiation of functional LH receptors in rat fetal testicular cultures. *Arch Androl.* 18:215-224
- Gangnerau, M., Funkenstein, B., Picon, R. 1982. LH/hCG receptors and stimulation of testosterone biosynthesis in the rat testis: changes during foetal development in vivo and in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 28:499-512
- Gardner, R., Lyon, M., Evans, E., Burtenshaw, M. 1985. Clonal analysis of X-chromosome inactivation and the origin of the germ line in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 88:349-363
- George, F., Peterson, K. 1988. 5-Dihydrotestosterone formation is necessary for embryogenesis of the rat prostate. *Endocrinol.* 122:1159-1164
- Gerendai, I., Nemeskéri, A., Csernus, V. 1983. Naloxone has a local effect on the testis of immature rats. *Androl.* 15:398-403.
- Gerendai, I., Shaha, C., Gunsalus, G.L., Bardin, C.W. 1986. The effects of opioid receptor antagonists suggest that testicular opiates regulate Sertoli and Leydig cell function in the neonatal rat. *Endocrinol.* 118:2039-2044.
- Ginsburg, M., Snow, M., McLaren, A. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development.* 110:521-528
- Gnessis, L., Fabbri, A., and Spera, G. 1997. Gonadal peptides as med. Development and functional control of the testis: an integrated with hormones and local environment *Endocrine reviews* 18 54
- Goldman, A. 1971. Production of hypospadias in the rat by selective inhibition of fetal testicular 17 -hydroxylase and C -lyase. *Endocrinol.* 88:527-531
- Gondos, B. 1980. Development and differentiation of the testis and male reproductive tract. In Steinberg A, Steinberg E, Eds. *Testicular development, structure and function.* New York; Raven Press. 3-20
- Gondos, B., Berndson, W.E. 1993. Postnatal and pubertal development. In: Russell LD, Griswold MD (eds.), *The Sertoli Cell*, 1st ed. Clearwater, FL: Cache River Press; 115-154.
- Gonzales, G., Risbridger, G., and de Kretser, D. 1988. In vitro synthesis and release of inhibin in response to FSH stimulation by isolated segments of seminiferous tubules from normal adult male rats. *Mol cell. Endocrinol.* 59:179-185
- Griswold, M.D. 1993. Protein secretion by Sertoli cells: general considerations. In: Russell LD, Griswold MD (eds), *The Sertoli Cell.* Clearwater, FL.: Cache River Press. 195-200
- Griswold, M.D., Mably, E.R., Fritz, I.B. 1976. Follicle stimulating hormone stimulation of DNA synthesis in Sertoli cells in culture. *Mol. Cell. Endocrinol.* 4:139-149.
- Griswold, M.D., Solari, A., Tung, P.S., Fritz, I.B. 1977. Stimulation by follicle-stimulating hormone of DNA synthesis and of mitosis in cultured Sertoli cells prepared from testes of immature rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 7:151-165.

- Gunsalus, G.L., Larrea, F., Musto, N.A., Becker, R.R., Mather, J.P., Bardin, C.W. 1981. Androgen binding protein as a marker for Sertoli cell function, *J. Steroid Biochem.* 15:99-106.
- Gunsalus, G.L., Musto, N.A., Bardin, C.W. 1978. Factors affecting blood levels of androgen binding protein in the rat. *Int. J. Androl. (Suppl.)*. 2:482- 493
- Handelsman, D.J., Spaliviero, J.A., Scott, C.D., and Baxter, R.C. 1985b. Identification of insuline-like growth factor-I and its receptors in the rat testis *Acta Endocrinologica* 109:543-549
- Harbert, R., Picon, R. 1984. Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol 17- $\beta$  levels in maternal and in fetal testes in the rat. *J Steroid Biochem.* 21: 193-198
- Hardy, M.P., Gelber, S.J., Zhou, Z., Penning, T.M., Ricigliano, J.W., Ganjam, V.K., Nonneman, D., Ewing, L.L. 1991. Hormonal control of Leydig cell differentiation. *Ann NY Acad Sci* 637:152-163
- Hilscher, B., Hilscher, W., Bülthoff-Ohnolz, B, B., Krämer, U., Birke, A., Pelzer, H., and Gauss, G. 1974. Kinetics of gametogenesis. I. Comparative histological and autoradiographic studies of oocytes and transitional prospermatooonia during oogenesis and prespermatogenesis. *Cell Tissue res.* 154:443-470
- Hochereau de Reviers, M.T., Courot, M. 1978. Sertoli cells and development of seminiferous epithelium. *Annales deBiologie animale Biophysique et Biochimie.* 18:573-583
- Hochereau de Reviers, M.T., Bindon, M., Courot, M. Lafortune, R., Land, G., Lincoln and Ricordeau. 1984. Number of Sertoli cells in the ram testis. In: M. Courot (Ed) *The male in farm animal reproduction.* Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands
- Hochereau de Reviers, M.T., Monet-Kuntz, C., Courot, M. 1987. Spermatogenesis and Sertoli cells numbers and function in rams and bulls. *J of Reprod. and fertile. Suppl.* 34:101-114
- Hochereau-de Reviers, M. T., C. Perreau, C. Pisselet, A. Locatelli., and M. Bosc. 1995. Ontogenesis of somatic and germ cells in sheep fetal testis. *Journal of reproduction and fertility* 103:41-46
- Huhtaniemi, I., Pelliniemi, L. 1992. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp. Biol. Med.* 201:125-140
- Hutson, J., Donahoe, P. 1983. Is mullerian-inhibiting substance a circulating hormone in the chick-quail chimera?. *Endocrinology.* 113:1470-1475
- Iczkowski, K., Sun, E., Gondos, B. 1991. Morphometric studies of prepubertal rabbit testis: germ cell numbers and seminiferous tubule dimensions. *Am J. Anat.* 190:266-272
- Jaillard, C., Chatelain, P., and Saez, J. 1987. In vitro regulation of pig Sertoli cell growth and function: Effects of fibroblast growth factor and somatomedin-C. *Biol. Reprod.* 37:665-674
- Jannini, E.A., Olivieri, M., Francavilla, S., Gulino, A., Ziparo, E., D'Armiento, M. 1990. Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'-tri-iodothyronine receptor in the rats testis. *Endocrinol.* 126:2521-2526
- Jannini, E., Ulises, S and D' Armiento, M. 1995. Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocrine Reviews.* 16: 443-459
- Jarred, R., Cancilla, B., Richards, M., Groome, N., McNatty., and Risbridger, G. 1999. Differential localization of inhibin subunit proteins in the ovine testis during fetal gonad development. *Endocrinol.* 140:979-986
- John, N., Norton., and Michael, K., Skinner. 1992. Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PModS: Potential role of immediate-early genes. *Molecular endocrinol.* 2018-2026



- Johnson, L., Petty C., Neaves, W. 1983. Further quantification of the human spermatogenesis: germ cell loss during postprophase of meiosis and its relationship to daily sperm production. *Biol Reprod.* 25:217-226
- Johnson, L., Zane, R., Petty C., Neaves, W. 1984. Quantification of the human Sertoli cell population, its distribution, relation to germ-cell numbers, and age-related decline. *Biol. Reprod.* 31:785-795
- Johnson, L., Thompson, D. 1983. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biol. Reprod.* 29:777-789
- Josso, N., Boussin, L., Knebelmann, B., Nihoul-Fekete, C., Picard, J. 1991. Anti-mullerian hormone and intersex states. *Trends Endocrinol. Metab.* 2:227-233
- Jost, A. (1972) Preliminary data on the initial stages of testicular differentiation in the rat. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 61:415-437
- Jost, A., and Magre, S. 1984. Testicular development phases and dual hormonal control of sexual organogenesis, in sexual differentiation: Basic and Clinical aspects (Serie, M., eta., eds) pp. 1-15, Raven Press, New York
- Joyce, K.L., Porcelli, J., Cooke, P.S. 1993. Neonatal goitrogen treatment increased adult testis size and sperm production in the mouse. *J Androl.* 14:448-455.
- Karl, A.F., Griswold, M.D. 1980. Actions of insulin and vitamin A on Sertoli cells. *Biochem. J.* 186:1001-1004.
- Karl-Heiz., Wrobel. 2000. Prespermatogenesis and spermatogoniogenesis in the bovine testis. *Anat. Embryol.* 202:209-222
- Karl, J., Capel, B. 1998. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev. Biol.* 203:323-333
- Kerr, J., Knell, J. 1988. The fate of fetal Leydig cells during the development the fetal and postnatal rat testis. *Development.* 103:535-544
- Kerr, J., Sharpe, R. 1985. Follicle-stimulating hormone induction of Leydig cell maturation. *Endocrinol.* 116:2592-2604
- Kilgour, R., Pisselet, C., Dubois, M., Courot, M. 1998. Ram lambs need FSH for normal testicular growth, Sertoli numbers at onset of spermatogenesis. *Reprod. Nutr. Dev.* 38:539-550
- Kirby, J.D., Cooke, P.S., Arambepola, N., Bunick, D., Hess, R.A., and Turek, F.W. 1993. Neonatal hypothyroidism increased adult testis size and sperm production in the hamster (*Mesocricetus auratus*) Program of the 12th North American Testis Workshop, Tampa, FL P51 (Abstract)
- Kirby, J., Jetton, A., Cooke, P., Hess, R., Bunick, D., Ackland, J., Turek, F., Schwartz, N. 1992. Developmental hormonal profiles accompanying the neonatal hypothyroidism-induced increased in adult testicular size and sperm production in the rat. *Endocrinology.* 131:559-565.
- Knobil, E., Neil, D. 1994. The physiology of reproduction, Segunda ed. 3-28
- Krieger, D.T., Margioris, A.N., Liotta, A.S., Shana, C., Gerandai, I., Pintar, J., Bardin, C.W. 1984. Pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides in the rodent male reproductive tract. In: Opioid Modulation of endocrine function. 27:755-764
- Lalli, M., Tang, X., Clermont, Y. 1984. Glycoprotein synthesis in Sertoli cells during the cycle of the seminiferous epithelium of adult rats. A radioutographic study. *Biol Reprod.* 30:493-505
- Le Magueresse, B., Jegou, B. 1988. In vitro effects of germ cells on the secretory activity of Sertoli cells recovered from rats of different ages. *Endocrinol.* 122:1672-1680
- Leuan A. Hughes. 2001. Minireview: sex differentiation. *Endocrinol.* 142:3281-3287

- Lincoln, G., Clarke, I., Sweeney, T. 1996. Hamsters-like cycles in testicular size in the absence of gonadotrophin secretion in PHD rams exposed to long-term changes in photoperiod and treatment with melatonin. *J of Neuroendocrinol.* 8:855-866
- Lincoln, G., McNelly, A. 1989. Inhibin concentrations in the peripheral blood rams during a cycle in the testicular activity induced by changes in photoperiod or treatment with melatonin. *J of Endocrinol.* 120: R9-R13
- Lipsett, M., Tullner, W. 1965. Testosterone synthesis by the fetal rabbit gonad. *Endocrinol.* 77:273-277
- Lording, D., De Krester, D. 1972. Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *J Reprod fertil.* 298:261-269
- Madjic, G., McNeilly, A., Sharpe, R., Evans, L., and Groome, N. 1997. Testicular expression of inhibin and activin subunits and follistatin in the rat and human foetus and neonate and during postnatal development in the rat. *Endocrinol.* 138:2136-2147
- Magre, S., and Jost, A. 1980. The initial phases of testicular organogenesis in the rat. An electron microscopy study. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 69:297-318
- Magre, S., Jost, A. 1984. Dissociation between testicular organogenesis and endocrine cytodifferentiation of Sertoli cells. *Proc.Natl Acad. Sci. USA.* 81:7831-7834
- Magre, S., Jost, A. 1991. Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. *Journal of Electron Microscopy.* 19:172-188
- Makay, D., Hertig, A., Adams, E., Danziger, S. 1953. Histochemical observation on the germ cells of the human embryo. *Anat. Rec.* 117:201-220
- Marinos, E., Kulukussa, M., Zotos, A., Kittas, C. 1995. Retinoic acid affects basement membrane formation of the seminiferous cords in 14-day male rat gonads in vitro. *Differentiation.* 59:87-94
- Massagué J. 1998. TGF- $\beta$  signal trasduction *Annu. Rev. Biochem.* 67:753-791
- Mather J, Moore A, and Li, R. 1997. Activins, inhibins, and follistatins: Further thoughts on a growing family of regulators. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 215:209-222
- Mather, J., Roberts, P., and Krummen, L. 1993. Follistatin modulates activin activity in acell- and tissue-specific manner. *Endocrinol.* 132:2732-2734
- Mather, J., Attie, K., Rice, G., and Phillips, D. 1990. Activin stimulates spermatogonial proliferation in Sertoli-germ cell co-cultures from immature rat testis *Endocrinol.* 127:3206-3214
- Mather, J.P., Sato, G.H. 1979. The use of hormone-supplemented serumfree media in primary cultures. *Exp. Cell Res.* 124:215-222.
- McKeown, R., O'Callaghan, D., Roche, J., Boland, M. 1997. Effect of immunization of rams against bovine inhibin alpha 1-26 on semen characteristics, scrotal size, FSH, LH and testosterone concentrations. *Journal of reproduction and fertil.* 109:237-245
- Means, A., Dedman, J., Tash, D., Tindall, D., Van Sickle, M., Welsh, M. 1980. Regulation of the testis Sertoli cell by follicle stimulating hormone. *Annu Rev Physiol.* 42:59-70
- Means, A., Fakunding, J., Huckins, C., Tndall, D., Vitale, R. 1976. Follicle stimulating hormone, the Sertoli cell, and spermatogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.* 32: 477-525
- Meisami, E., Najafi., and Timiras, P.S. 1994. Enhancement of seminiferous tubular growth and spermatogenesis in testes of rats recovering from early hypothyroidism: a quantitative study. *Cell and Tissue Research.* 275:503-511.
- Michael D. Griswold. 1995. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol. Reprod.* 52:211-216

- Michel, U., Esselmann., and Nieschlag. 1993. expression of follistatin messenger ribonucleic acid in Sertoli cell-enriched cultures: regulation by epidermal growth factor protein kinase C- dependent pathway but not by follicle-stimulating hormone and protein kinase A-dependent pathway. *Acta Endocrinol.* 129:525-531
- Miller, S., Wongspratsartuk, S., Young, I., McFarlane, J., de Krester D., and Jenkin, G. 1997. Source of inhibin in bovine fetal plasma and amniotic fluid during late gestation: half life of fetal inhibin. *Biol. Reprod.* 57:347-353
- Mita, M., Price, J., Hall, P. 1982. Stimulation by FSH of synthesis of lactated by Sertoli cell from rat testis. *Endocrinol.* 110:1535-1541
- Mittwoch, U. Delhanty, J.D., Beck, F. 1969. Growth of differentiating testes and ovaries. *Nature.* 224:1323-1325
- Morris, P., Vale, W., Cappel., and Bardin, C. 1988. Inhibin production by primary Sertoli cell-enriched cultures: regulation by FSH, androgens and epidermal growth factor. *Endocrinol.* 122:717-725
- Naggy, F. 1972. Cell división kinetcis and DNA síntesis in the immature Sertoli cells of the rat testis. *J Reprod. Fertil.* 28:389
- Nakamura, T., Sugino, K., Titani, K., and Sugino, H. 1991. Follitatin, and activin-binding protein associates with heparan sulfate chains of proteoglycans on follicular granulosa cells *J. Biol. Chemm.* 266:19432-19437
- Neumann, F., Von Berswordt-Wallrabe, R., Elger, W., Steinbeck, H., Hahn, J., Kramer, M. 1970. Aspects of androgen-dependent events as studied by antiandrogens. *Recent Prog Horm Res.* 26:337-405
- Norton, J., Skinner, M. 1989. Regulation of Sertoli cell function and differentiation through the actions of a testicular paracrine factor P-Mod-S. *Endocrinol.* 124:2711-2719
- Noumura, T., Weisz, J., Lloy, C. 1966. In vitro conversión of 7-<sup>3</sup>H-progesterone to androgens by the rat testis during the second half of fetal life. *Endocrinol.* 78:245-253
- O' Shaughnessy, P.J., Dudley, K., Rajapaksha, W.R. 1996. Expression of follicle stimulating hormone-receptor mRNA during gonadal development. *Mol. Cell endocrinol.* 125:169-175
- Ogawa, K., Hashimoto, O., Kurohmaru, K., Mizutani, T., Sugino, H., and Hayashi, Y. 1997. Folistatin like immunoreactivity in the cytoplasm and nucleus of spermatogenic cells in the rat. *Eur. J. Endocrinol.* 137:523-529
- Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., and Suks, M.I. 1974. Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen and testis. *Endocrinol.* 95:897-903
- Orth, J.M., Higginbotham, C.A., and Salisbury, R.L. 1984. Hemicastration causes and testosterone prevents enhanced uptake of (H)thymidine by Sertoli cell in testis inmature rasts. *Biol. Reprod.* 30:263-270
- Orth, J. 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autorradiographic study. *Anat. Rec.* 203:485-492
- Orth, J. 1986. FSH-induced Sertoli cell proliferation in the developing rat is modified by B-endorphin produced in the testis. *Endocrinol.* 119:1876-1878
- Orth, J. 1984. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinol.* 115:1248-1255
- Orth, J., Gunsalus, G., Lamperti, A. 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rasts indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinol.* 122:787-794

- Orth, J., Weisz, J. 1980. Development of 5-3 hydroxysteroid deshydrogenase and glucose-6-phosphatase activity in Leydig cells of the fetal rat testis: a quantitative chemical study. *Biol. Reprod.* 22:1201-1209
- Palmero, S., Benahmed, M., Morera, A.M., Tricchi, P., and Fugassa, E. 1992. Identification of nuclear tri-iodothyronine receptors in Sertoli cells from immature piglet testes. *J of Molecular Endocrinol.* 9:55-59.
- Palmero, S., Maggiani, S., and Fugassa, E. 1988. Nuclear tri-iodothyronine receptors in rat Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 58:253-256.
- Palmero, S. Patri, A., Barreca, F., Minuto, F., Giordano, G., Fugassa, E. 1990. Thyroid hormone stimulates the production of insulin-like growth factor I(IGF-I) by immature rat Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 68:61
- Palmero, S., Maggiani, S., Fugassa, E. 1989. Nuclear tri-iodothyronine receptors in rat Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 58:253-256
- Papadopoulos, V., Carreau, S., Szerman-Joly, E., Drosdowsky, M.A., Dehennin, L., Scholler, R. 1986. Rat testis 17  $\alpha$ -estradiol: identification by gas chromatography-mass spectrometry and age related cellular distribution. *J Steroid Biochem* 24:1211-1216
- Ramos, A., Dym, M. 1979. Ultrastructural differentiation of rat Sertoli cells. *Biol Reprod.* 21:909-922
- Rich, K.A., Bardin, C.W., Gunsalus, G.L., and Mather, J.P. 1983. Age-dependent pattern of androgen binding protein (ABP) secretion from rat Sertoli cells in primary culture. *Endocrinol.* 113:2284-2293.
- Rigaudiere, N. 1979. The androgens in the guinea-pig foetus throughout the embryonic development. *Acta Endocrinol.* 92: 174-186
- Risbridger, G., de Kretser, D. 1989. Paracrine regulation of the testis. In the testis pp 255-268. Eds H Burger and de Kretser. Raven Press New York
- Roberts, V., Meunier, H., Sawchenko, P.E., and Vale, W. 1989. Differential production and regulation on inhibin subunits in rat testicular cell types. *Endocrinol.* 125:2350-2359
- Robertson, D., Foulds, L., Leversha, L. 1985. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun.* 126: 220-226
- Rosselli, M., Skinner, M. 1992. Development regulation of Sertoli cell aromatase activity and plasminogen activator production by hormones, retinoids and the testicular paracrine factor, PmodS. *Biol Reprod.* 46:586-594
- Russell, L., Ren, H., Sinha, H., Schulze, W., Sinha, A. (1990). A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am J Anat.* 188:21-30
- Sanborn, M., Steinberg, A., Tcholakian, R., Steinberg, E. 1977. Direct measurement of androgen receptors in cultured Sertoli cell. *Steroids.* 29:493-502
- Sanford, M., Moore, C., Voglmayr, J., Fahmy, M. 2000. Sexual maturation changes in circulatory inhibin concentration in relation to FSH concentration and testicular size in Suffolk and DLS rams. *Theriogenology.* 54:719-730
- Sanford, M., Voglmayr, J., Vale, W., Robaire, B. 1993. Photoperiod mediated increases in serum concentrations of inhibin, follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone are accentuated in adult shortened-scrotum rams without corresponding decreases in testosterone and estradiol. *Biol. Reprod.* 49:365-373
- Schanbacher, B. 1988. Radioimmunoassay of inhibin: serum responses to unilateral and bilateral orchidectomy. *Endocrinol.* 123:2323-2330

- Schneyer, A., Sluss, P., Whitcomb, R., Martin, K., Sprengel, R., Crowley, J. 1991. Precursors of alpha inhibin modulate follicle-stimulating hormone receptor binding and biological activity. *Endocrinol.* 129:1987-1990
- Schultz, F., Wilson, J. 1974. Virilization of the Wolfian duct in the rat fetus by various androgens. *Endocrinol.* 94:979-986
- Setchell, B.P., Maddocks, S. Brooks, D.E. 1994. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the reproductive tract. In: Knobil E, Neill JD (Eds) *The physiology of reproduction.* ed, N Raven Press. P 1063-1175
- Shabanowitz, R., De Philip, R., Crowell, J., Tres, L., Kierszenbaum, A. 1986. Temporal appearance and cyclic behavior of Sertoli cell-specific secretory proteins during development of the rat seminiferous tubule. *Biol. Reprod.* 35:745-760
- Shaha, C., Morris, P.L., Chen, C.L., Vale, W., and Bardin, C.W. 1989. Immunostainable inhibin subunits are in multiple types of testicular cells. *Endocrinol.* 125:1941-1950
- Sharpe, R. 1984. Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol. Reprod.* 30:29-49
- Sharpe, R., Atanassova, N., McKinnell, C., Parte, P., Turner, K., Fisher, J., Kerr, J., Groome, N. 1998. Abnormalities in functional development of the Sertoli cells in rats treated neonatally with diethylstilbestrol: a possible role for androgens in Sertoli cell development. *Biol. Reprod.* 59:1084-1094
- Simoni, M., Cromoll, J., Nielschlag, E. 1997. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. *Endocrine reviews.* 18:739-773
- Skinner, M.K. 1987. Cell-cell interactions in the testis. *Ann NY Acad Sci.* 513:158-171
- Skinner, M.K. 1993. Sertoli cell-peritubular myoid cell interactions. In: Russell LD, Griswold MD (eds). *The Sertoli Cell.* Clearwater, FL.: Cache River Press. 477-484
- Skinner, M.K. 1993. Secretion of growth factors and other regulatory factors. In: Russell LD, Griswold MD (eds). *The Sertoli Cell.* Clearwater, FL.: Cache River Press. 237-248
- Skinner, M.K., Fritz, I.B. 1985. Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA;*82:114-118.
- Skinner, M.K., McLachlan, R., Bremner, W. 1989. Stimulation of Sertoli cell inhibin secretion by the testicular paracrine factor PmodS. *Mol Endocrinol.* 66:239-249
- Slaughter, G., Means, A. 1983. FSH activation of glycogen phosphorylase in the Sertoli cell enriched rat testis. *Endocrinol.* 113:1476-1485
- Soder, O., Bang, P., Wahab, A., Parvonen, M. 1992. Insulin-like growth factors selectively stimulate spermatogonial, but not meiotic, deoxyribonucleic acid synthesis during rat spermatogenesis. *Endocrinol.* 131:2344-2350
- Steinberger, A., Steinberger, E. 1971. Replication pattern Sertoli cells in maturing rats testis in vivo and in organ culture. *Biol. Reprod.* 84:84-94
- Sylvester, S. 1993. Secretion of transport and binding proteins. In: Russell LD, Griswold MD (eds), *The Sertoli cell* Clearwater, FL.: Cache River Press. 201-216
- Taketo, T., Thau, R., Adeyemo, O., and Koide, S. 1984. Influence of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate analogues on testicular organization of fetal mouse gonads in vitro. *Biol. Reprod.* 30:189-198
- Tam, P., Snow, M. 1981. Proliferation and migration of primordial germinal cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol. Exp. Morphol.* 64: 133-147
- Tamasy, V., Meisami, A., Vallerga, A., Timiras, P. 1986. Rehabilitation from neonatal hypothyroidism: Spontaneous motor activity, exploratory behavior, avoidance

- learning and response of pituitary-thyroid axis to stress in male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 11:91
- Tilbrook, A., de Krester, D., Clarke, I. 1999a. Changes in suppressive effects of recombinant inhibin A on FSH secretion in ram lambs during sexual maturation: evidence for alterations in the clearance rate of inhibin in rams. *J of endocrinol*. 161:219-229
- Tilbrook, A., de Krester, D., Clarke, I. 1999b. Seasonal changes in the negative feedback regulation of the secretion of the gonadotrophins by testosterone and inhibin in rams. *J of endocrinol*. 160:155-167
- Tindall, D.J., Miller, D.A., Means, A.R. 1977. Characterization of androgen receptor in Sertoli cell enriched testis. *Endocrinol*. 101:13-23.
- Tres, L.L., Smith, E.P., Van, Wyck J.J., and Kierszenbaum, A.L. 1986. Immunoreactive sites and accumulation of somatomedin-C in rat Sertoli-spermatogenic cell co-cultures. *Experimental Cell Research*. 162: 33-50
- Tsonis, G.C. and Sharpe, R.M. 1986. Dual gonadal control of follicle stimulating hormone. *Nature*. 321:724-725
- Tung, P., and Fritz, I. 1986. Cell substratum and cell-cell interactions promote testicular peritubular myoid cell histotypic expression in vitro. *Dev. Biol*. 115:155-170
- Tung, P., and Fritz, I. 1987. Morphogenetic restructuring and formation of basement membranes by Sertoli cells and testis peritubular cells in co-culture: inhibition of the morphogenetic cascade by cyclic AMP derivatives and by blocking direct cell contact. *Ev. Biol*. 120:139-153
- Ulisses, S., Jannini, E.A., Carosa, E., Piersanti, D., Graziano, F.M., D'Armiento, M. 1994. Inhibition of aromatase activity in rat Sertoli cells by thyroid hormone. *J Endocrinol* 140:431-436
- Van Haaster, L., De Jong, F., Docter, R., De Rooij, D. 1992. The effect of hypothyroidism in Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinol*. 131:1574-1576
- Van Haaster, L., De Jong, F., Docter, R., De Rooij, D. 1993. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. *Endocrinol*. 133:755-760
- Vanelli, B.G., Barni, T., Orlando, C., Natali, A., Serio, M., and Balboni, G.C. 1988. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study *Fertility and Sterility*. 49:666-669
- Vergouwen, R.P., Jacobs, S.G., Huiskamp, R., Davids, J.A., de Rooij, D.G. 1991. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil*. 93:233-243.
- Verhoeven, G., Gailleau, J. 1988. Prolonged exposure to androgens suppresses follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in rat Sertoli cell cultures. *Mol Cell Endocrinol*. 57:61-67
- Warren, D., Haltmeyer, G., Eik-Nes, K. 1973. Testosterone in the fetal rat testis. *Biol. Reprod*. 8: 560-565
- Warren, D., Huhtaniemi, T., Tapanainen, J., Dufau, M., Catt, K. 1984. Ontogeny of gonadotropin receptors in the fetal and neonatal rat testis. *Endocrinol*. 114:470-476
- Wilson, J., Siiteri, P. 1973. Developmental pattern of testosterone synthesis in the fetal gonad of the rabbit. *Endocrinol*. 92:1182-1191

## **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **4.1 Hipótesis**

El mayor crecimiento testicular en los borregos Black belly se observará alrededor de los 60 a 70 días.

Durante las primeras semanas de vida, la población de las células de Sertoli se verá incrementada en relación al peso testicular total y por unidad de peso de tejido tubular y epitelio germinal, esta relación se invertirá durante las semanas subsiguientes a la etapa de mayor crecimiento testicular.

### **4.2 Objetivos**

Conocer el desarrollo testicular de los borregos Black belly, desde el nacimiento, pubertad y antes de que alcancen la madurez sexual total.

Caracterizar el desarrollo de la población de las células de Sertoli e identificar la edad a la cual el número de éstas permanece estable.

Caracterizar el desarrollo de las diferentes estructuras testiculares, incluyendo los túbulos seminíferos y el tejido intersticial.

## 5. EXPERIMENTO

### Estudio morfométrico del desarrollo testicular de ovinos Black belly

#### *Resumen*

Jesús Herrera Alarcón: **Estudio morfométrico del desarrollo testicular de ovinos Black belly.** (Bajo la dirección del Dr. Héctor Jiménez Severiano).

Los objetivos de la presente investigación fueron: conocer el desarrollo testicular de los borregos Black belly, desde el nacimiento, pubertad y antes de alcanzar la madurez sexual total y caracterizar el desarrollo de las diferentes estructuras testiculares y de la población de células de Sertoli, para identificar la edad a la cual el número de éstas permanece estable. Se utilizaron 49 borregos distribuidos en 9 grupos, de tal forma que cada grupo de corderos fue castrado cuando tuvieron 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 ó 32 semanas de edad ( $n= 4$  a 6 por grupo). Los testículos fueron fijados y procesados para inclusión en parafina mediante técnicas de rutina; se hicieron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina, para ser evaluados mediante técnicas de morfometría cuantitativa. El mayor crecimiento testicular ocurrió entre las 9 y 15 semanas de edad. El diámetro de los túbulos seminíferos entre el nacimiento y la semana 15. A las 12 semanas pudo notarse la presencia de lumen en más del 70% de los túbulos estudiados, mientras que a las 15 semanas se empezaron a observar células germinales en el estadio de espermatídes. La longitud de túbulos seminíferos aumentó entre el nacimiento y la semana 18, a partir de la cual permaneció estable. La proporción de tejido tubular se incrementó entre la semana 9 y 12 y después permaneció sin cambios, excepto por un aumento significativo en la semana 18. Los volúmenes totales de tejido tubular y germinal aumentaron entre el nacimiento y la semana 18 y después no hubo cambios significativos. Los resultados de las variables de las células de Sertoli fueron: el volumen individual por núcleo de Sertoli se vio aumentado en la semana 12 y 21 ( $p<0.05$ ); el número total de núcleos de Sertoli aumentó entre el nacimiento y la semana 15 y después permaneció estable. Los núcleos de Sertoli por gramo de epitelio germinal, por gramo de tejido tubular y por gramo de parénquima mostraron decremento significativo siendo esta disminución mayormente notada en la edades de 9 y 12 semanas ( $P<0.05$ ). En conclusión: (i) el desarrollo testicular ocurre en paralelo al aumento en el diámetro y longitud de los cordones/túbulos seminíferos; (ii) la proliferación de las células de Sertoli ocurre durante las primeras semanas postnatales y antes de las 15 semanas de edad.

Palabras claves: Células de Sertoli, Ovinos Black belly, Desarrollo Testicular.



## Introducción

Uno de los eventos poco estudiados y de gran importancia desde el punto de vista productivo es el desarrollo testicular, pues éste determina en gran medida la edad a la cual los machos pueden ser utilizados como reproductores, sin que afecten su desarrollo corporal y su vida reproductiva. Las gónadas crecen antes de y durante la pubertad, como consecuencia del aumento de los túbulos seminíferos y del tejido intersticial, indicativos del inicio y desarrollo de la espermatogénesis y la esteroidogénesis, respectivamente. Los cambios durante el desarrollo testicular pueden ser evaluados y son herramientas importantes que ayudan a identificar el potencial reproductivo de los futuros sementales. El desarrollo testicular en ovinos puede variar entre raza y es el reflejo de los procesos endocrinos y fisiológicos que están ocurriendo internamente, de tal forma que el grado de crecimiento y maduración testicular depende directamente del grado de participación de estos procesos.

El desarrollo y función de las células germinales están fuertemente determinados por las células somáticas (células de Sertoli, de Leydig y peritubulares), siendo éstas de suma importancia para el funcionamiento normal de los testículos; entre ellas, se ha considerado a las células de Sertoli como las más importantes para inducir el desarrollo y diferenciación de las células germinales. En animales de laboratorio se ha demostrado que la proliferación de las células de Sertoli ocurre después de la diferenciación sexual y antes del inicio de la espermatogénesis, con un claro crecimiento de los testículos debido a la proliferación de las células de Sertoli. El número de células de Sertoli es el principal determinante del tamaño testicular y la producción espermática, de tal forma que los factores que influyen la población de estas células tendrán un efecto importante sobre la función testicular en el animal adulto.

La capacidad de multiplicación de las células de Sertoli es alta durante la vida fetal y menor después del nacimiento (Hochereau-de Reviers et al., 1987), de tal forma que la población total de células de Sertoli presente en un animal adulto

es determinada durante etapas avanzadas del desarrollo fetal y durante etapas prepuberales de la vida postnatal (Bardin et al., 1994). Durante este período las células de Sertoli permanecen relativamente indiferenciadas y sin desarrollar completamente sus características funcionales, al hacerlo pierden su capacidad de multiplicarse y forman una población estable dentro del túbulo seminífero (de Krester y Kerr, 1994; Wrobel, 2000).

En las ratas, las células de Sertoli pierden la capacidad de proliferación aproximadamente a los 20 días de edad (Meachem et al., 1996); en humanos y otros primates, existe una etapa de multiplicación neonatal y otra durante el período peripuberal (Sharpe, 1994). En rumiantes domésticos (carnero y toro) se ha sugerido que esta diferenciación sucede entre 6 y 10 semanas de edad (Sharpe, 1994); en ovinos, aparentemente después de los 60 a 70 días de edad el número de células de Sertoli permanece relativamente estable (Hochereau-de-Reviers et al., 1987). En este último estudio, los rangos de edad utilizados son muy amplios y en algunas razas se reportan aumentos entre los 100 y 200 días de edad, por lo que difícilmente puede llegarse a una conclusión con relación a la edad en que las células de Sertoli dejan de proliferar.

Con base en los antecedentes presentados, se percibe la posibilidad de incrementar la producción espermática en los rumiantes domésticos, lo cual podría tener un impacto económico importante. Sin embargo, es necesario adquirir un mejor conocimiento del desarrollo de los diferentes componentes del tejido testicular y de los mecanismos involucrados en la evolución de las poblaciones celulares, especialmente de los períodos de mayor proliferación de las células de Sertoli y de la interacción de éstas con las células germinales.

La finalidad del presente trabajo es conocer y determinar el desarrollo testicular en corderos, así como caracterizar el desarrollo de la población de las células de Sertoli, por su importancia en la futura capacidad espermatogénica del individuo.

## Material Y Métodos

El presente experimento fue realizado en la Posta Zootécnica de la Universidad Autónoma de Querétaro, ubicada en la localidad de Amazcala, Municipio El Marqués, Querétaro, México; situada en una latitud norte de 20° 43' y una latitud oeste de 100° 15', con una altitud de 1850 metros sobre el nivel del mar (COTECOCA, 1989). El clima es BSw (semi-seco estepario con lluvias en verano) y una vegetación compuesta de matorral espinoso con plantas carnosas y pastizal. La temperatura promedio es de 16.7 °C, y una precipitación pluvial anual promedio de 485.4 mm, presentándose la mayor precipitación de junio a agosto y la menor de diciembre a marzo (INEGI, 1993).

### *Manejo General y Alimentación de los Animales*

Se utilizaron 49 corderos de la raza Blackbelly, nacidos entre julio y septiembre (grupos 0 a 21 semanas) o en marzo (grupo 32 semanas), los cuales fueron pesados y registrados al nacimiento. Los corderos siempre estuvieron en estabulación, alojados en corrales de 100 m<sup>2</sup> por cada 25 hembras con sus crías; durante la lactancia tuvieron acceso libre a agua y a un concentrado con 14% de P.C (78% de sorgo, 20% pasta de canola y 2% de sales minerales), el cual se encontraba en un "creep feeding" o trampa para corderos. Los corderos fueron destetados a los 75 días de edad en promedio, vacunados contra clostridiasis (*Clostridium chauvoei*, *Cl. septicum*, *Cl. novyi*, *Cl. sordelli*, *Cl. perfringens* tipos C y D), desparasitados y se les aplicó subcutáneamente vitamina E y selenio. En este momento se separaron los machos y se alojaron en corrales, con un espacio individual de 2.5 m<sup>2</sup>. Después del destete la alimentación estuvo basada en alfalfa, concentrado (el mismo recibido durante la lactancia) y agua a libre acceso. Los animales fueron distribuidos en 9 grupos, de tal forma que cada grupo de corderos fuera castrado cuando tuvieran 0 (antes de los 3 días de edad), 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 ó 32 semanas de edad (n= 4 a 6 por grupo); dentro de cada grupo, la diferencia en edades no era mayor de 3 días. Al llegar a la edad

correspondiente los borregos pertenecientes a cada grupo de edad fueron pesados y castrados quirúrgicamente, bajo anestesia local con xilocaina al 2%. Antes de la castración, a cada animal se le tomó una muestra de sangre de la vena yugular, para la determinación de las concentraciones de las hormonas tiroideas T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>. Todas las muestras se colectaron de septiembre a diciembre.

#### *Preparación y Procesamiento de los Tejidos*

Después de la castración, los testículos fueron separados del epidídimo y del tejido conectivo y se les tomó el peso de manera individual (izquierdo y derecho). En muchos animales, principalmente en los más pequeños no fue posible separar la túnica albugínea, por lo que para estimar el peso del parénquima testicular se consideró que éste representa el 93.6% del peso testicular (valor obtenido de las mediciones hechas en animales postpuberales procedentes del mismo rebaño). En los animales mayores a seis semanas, el testículo derecho fue cortado longitudinalmente y se obtuvo una muestra de la parte superior, de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>, evitando la "rete testis"; en los animales de seis semanas o menos, el testículo derecho fue fijado entero, pero los cortes evaluados fueron tomados de la parte superior.

Las muestras fueron procesadas de acuerdo al método descrito por McCoard et al. (2001), llevándose a cabo primero la fijación del tejido con paraformaldehído al 4% en solución salina amortiguadora de fosfatos de Dulbecco 0.15 M (PBS, pH 7.4), con agitación suave. Después de 4 horas de fijación, la solución fijadora se cambió por una cantidad similar, pero más fresca y se dejó en agitación durante toda la noche bajo refrigeración. Después de la fijación, el fijador fue desechado realizándose un lavado de las muestras con PBS (2x1 hora), las cuales posteriormente fueron deshidratadas gradualmente en soluciones de diferentes concentraciones de etanol (50, 70, 80, 95 y 100%; 2x 1 hora cada una), y aclaradas en xileno (2x1 hora). Para facilitar la infiltración con parafina, las muestras fueron pre-infiltradas con una solución saturada de parafina (Paraplast plus, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, MA) en xileno durante toda la noche y

finalmente infiltradas y embebidas en parafina. De cada muestra se obtuvieron dos cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  de grosor, los cuales fueron montados en portaobjetos previamente gelatinizados y se dejaron secar a 37 °C toda la noche. Posteriormente, los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina, mediante el método de hematoxilina de Mayer, procedimiento progresivo que tiñe los núcleos, y almacenados a temperatura ambiente hasta su análisis por morfometría cuantitativa.

#### *Morfometría Testicular y Conteo de las Células de Sertoli*

Las secciones teñidas con hematoxilina fueron observadas bajo un microscopio (Nikon E600) en campo claro a 200x, con una cámara digital Cool SNAP fx conectada a una computadora. Para el conteo y las mediciones de los túbulos seminíferos (alrededor de 100 túbulos por borrego), se dividió cada sección en cuatro cuadrantes y se eligió al azar un campo dentro de cada cuadrante. La adquisición y procesamiento de las imágenes para llevar a cabo las diversas mediciones fue realizada con el programa IPLab Scientific Imaging Software (las imágenes fueron de tamaño 1024 x 1024 píxeles, cada píxel está formado de 16 bits), estimándose en micrómetros los siguientes parámetros: área, perímetro, diámetro mayor y diámetro menor de los túbulos seminíferos. Se consideró por separado la medición de los túbulos con lumen y sin lumen y se realizó la medición del lumen de cada túbulo. El porcentaje del volumen ocupado por el intersticio fue obtenido por sustracción del volumen tubular del total del volumen del parénquima. Algunas muestras presentaron algún grado de deformación y encogimiento, por lo cual se hizo una corrección por el grado de encogimiento del tejido; el área trazada de cada túbulo encogido fue dividido por el área trazada por la huella aparente alrededor de cada túbulo (borde de la curva del intersticio); el área del túbulo encogido fue dividida por este factor antes de que los porcentajes de tejido intersticial y tubular fueran calculados (Jiménez-Severiano et al., 2005). Todos los cálculos morfométricos de volumen se hicieron con base en el peso del parénquima; se consideró una relación de 1:1 entre el

peso de los testículos (g) y su volumen ( $\text{cm}^3$ ), debido a que la densidad específica del tejido testicular es muy cercana a 1 (Russell et al., 1990).

El conteo y medición de los núcleos de las células de Sertoli se hicieron en imágenes tomadas bajo un microscopio de campo claro, a un aumento de 1000x, utilizando el programa Sigma Scan Pro (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Para esto se seleccionaron cuatro túbulos seminíferos de cada cuadrante, cortados transversalmente, cuantificándose en cada uno de ellos el número de las células de Sertoli, definidas por sus núcleos. En los mamíferos, los núcleos de las células de Sertoli son localizados cerca de la periferia del túbulo seminífero, cerca de la lámina basal del túbulo, presentan una forma alargada u ovoide, el interior del núcleo muestra una indistinta textura granular fina y típicamente exhibe nucleolos que contienen la región centromérica de la mayoría de los cromosomas (heterocromatina) de la célula. El número de núcleos contados en cada campo fue corregido por el diámetro nuclear y el grosor del corte, de acuerdo a la fórmula de Abercrombie (1946) y los cálculos posteriores y datos son presentados como el número corregido de núcleos celulares. Así mismo se midió la periferia de cada núcleo celular y el diámetro nuclear fue obtenido como el promedio de sus diámetros mayor y menor. Para determinar el número de células de Sertoli por gramo de tejido y por testículo, se usaron las fórmulas de Wreford (1995), donde el número total de núcleos de Sertoli por testículo fue el producto del volumen testicular y la densidad del volumen nuclear en el testículo (ej. masa total de los núcleos por testículo, dividido entre volumen nuclear individual promedio). El contorno de los núcleos dentro del epitelio fue trazado para determinar el porcentaje de volumen ocupado por los núcleos y el área promedio de cada núcleo (se midieron alrededor de 210 núcleos por cordero). El volumen promedio de cada núcleo fue calculado usando la fórmula para una esfera alargada, es decir:  $4/3\pi \times a \times b^2$ , donde  $a$ =radio mayor y  $b$ =radio menor. El número de células por gramo de túbulo, por gramo de epitelio y por gramo de parénquima fue calculado al dividir el número total de núcleos entre el peso tubular total, entre el peso del epitelio germinal y entre el peso del parénquima, respectivamente.

### *Análisis de Hormonas Tiroideas ( $T_3$ y $T_4$ )*

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 1600 rpm durante 5 min, a 4 °C; el suero fue separado y almacenado a -20°C hasta su análisis. Las concentraciones de  $T_3$  y  $T_4$  fueron determinadas por un radioinmunoanálisis de fase sólida usando estuches comerciales (Coat-A-Count, Diagnostic Products Company, Los Angeles CA). El coeficiente de variación intraensayo fue de 4.6 % para  $T_3$  y 3.8 % para  $T_4$ .

### *Análisis Estadístico*

Para el análisis de los datos, los valores fueron previamente transformados a su logaritmo natural para homogenizar las varianzas, debido a que éstas presentaban una tendencia proporcional a la magnitud de los valores; después del análisis, los datos logarítmicos fueron convertidos a valores reales para presentarlos en los cuadros y gráficas. Para todas las variables, los datos fueron analizados como un diseño completamente al azar, mediante el procedimiento GLM de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC), incluyendo en el modelo la edad de los corderos. Los promedios de cada grupo de edad fueron comparados entre sí mediante la opción PDIF de SAS. Adicionalmente, los datos de volumen nuclear individual y número total de células de Sertoli se sometieron a un análisis de regresión lineal usando el procedimiento REG de SAS para encontrar la ecuación que explicara mejor el desarrollo de estas variables a través de la edad. Además, se hizo un análisis de correlación entre las principales variables de estudio (PROC CORR, SAS).

## Resultados

### ***Peso corporal y crecimiento testicular***

La Fig. 1 muestra que el peso corporal incrementó conforme avanza la edad, con un mayor incremento de aproximadamente un 100% de la semana 9 a la 12, posteriormente la tasa de crecimiento disminuye. Existió una correlación altamente significativa ( $r=0.89$ ,  $P < 0.0001$ ), entre el peso corporal con el testicular (datos no presentados).

Como se observa en la Fig. 2, la masa testicular se incrementó de manera paulatina desde el nacimiento hasta la 9a semana, posteriormente existieron dos aumentos considerables, el primero de  $11.57 \pm 1.99$  g a las 9 semanas hasta  $71.39 \pm 10.02$  g a las 12 semanas de edad y el segundo a las 15 semanas ( $145.28 \pm 20.4$  g); después de la semana 15 el peso testicular mostró una menor tasa de crecimiento, hasta alcanzar  $260 \pm 19$  g a las 32 semanas de edad.

### ***Morfometría testicular***

La Fig. 3 describe el desarrollo histológico de los testículos a través de las diferentes edades de los borregos Black belly. En la misma puede apreciarse la estructura sólida de los túbulos seminíferos durante las primeras semanas, para posteriormente adquirir un lumen y contar con diferentes tipos celulares de la línea espermatogénica.

*Proporción del Tejido Tubular y Epitelio Germinal.* Los túbulos seminíferos ocuparon 31 a 40% del parénquima testicular desde el nacimiento a las 9 semanas edad (Cuadro 1); esta proporción aumentó en la semana 12 hasta alcanzar un pico de 69% en la semana 18 ( $P < 0.05$ ), después de esta edad el tejido tubular representó entre 52 y 56 % del parénquima testicular. Una



correlación positiva fue encontrada entre la proporción de tejido tubular y la edad ( $r=0.60$ ,  $P<0.0001$ ).

El porcentaje de tejido germinal tiene un desarrollo muy parecido al porcentaje de tejido tubular (Cuadro 1); entre la semana 6 y 32 hay pocas diferencias (36 a 44% del parénquima testicular), excepto en la semana 18, donde se observa un pico de 58 % ( $P < 0.001$ ).

*Volumen Absoluto del Tejido Tubular y Epitelio Germinal.* El volumen absoluto de tejido tubular incrementó lentamente del nacimiento a las 9 semanas de edad (Cuadro 1), entre la semana 9 y 12 se observó un aumento de 8 veces (de  $4.26 \pm 0.08$  a  $36.53 \pm 5.58 \text{ cm}^3$ ), manteniéndose el incremento hasta la semana 18, edad a la cual ya no se observó mayor aumento hasta la semana 32. El volumen total de los túbulos seminíferos por testículos fue alta y positivamente correlacionado con la edad ( $P < 0.001$ ) y con el volumen absoluto del epitelio germinal ( $P < 0.001$ ) (Cuadro 2).

El volumen absoluto del epitelio germinal aumentó en forma parecida al tejido tubular (Cuadro 1), con aumentos significativos entre el nacimiento y la semana 18 ( $P < 0.05$ ), sin observarse mayor incremento después de esta edad. Por lo tanto la correlación entre el volumen absoluto del epitelio germinal y la edad fue alta ( $P < 0.0001$ ), de igual manera con la longitud de los túbulos seminíferos ( $P < 0.0001$ ) (Cuadro 2).

*Diámetro de los Túbulos Seminíferos.* El diámetro de los túbulos seminíferos incrementó lentamente desde el nacimiento hasta las 9 semanas de edad (Cuadro 1); posteriormente presentó dos períodos importantes de crecimiento, el primero de aproximadamente 100% entre las semanas 9 y 12 ( $P < 0.001$ ) y el segundo de 50%, entre las semanas 12 y 21. El diámetro de los túbulos se mantuvo relativamente sin cambios entre la semana 15 y la 32. El diámetro tubular se correlacionó alta y positivamente con la presencia de espermátides ( $P < 0.0001$ ) y con la edad ( $P < 0.0001$ ) (Cuadro 2).

*Longitud Total de los Túbulos Seminíferos.* El Cuadro 1 también muestra que la longitud de los túbulos seminíferos por testículo incrementó en forma constante más de 12 veces entre el nacimiento y las 18 semanas de edad. Observándose la mayor tasa de crecimiento entre las 9 y 18 semanas de edad. Después de ésta, la longitud se mantuvo constante. La longitud total de los túbulos seminíferos se correlacionó significativamente con el peso testicular ( $r = 0.88$ ;  $P < 0.0001$ ; datos no presentados), y con la proporción de tejido de tejido tubular en el testículo ( $P < 0.0001$ ) (Cuadro 2).

*Presencia de Lumen y Espermátides en los Túbulos Seminíferos.* La proporción de túbulos con lumen se correlacionó de forma significativa con la edad ( $r=0.83$ ) y en mayor grado con el diámetro tubular ( $r=0.95$ ) (Cuadro 2). Es interesante notar que la presencia de lumen en los túbulos se hace aparente apenas tres semanas antes de la presencia de espermátides, o sea en la semana 12, en una proporción que rebasa el 78%, aunque en algunos animales el 100% de los túbulos evaluados tenían lumen desde ésta fecha. El porcentaje promedio de túbulos con lumen continuó aumentando hasta llegar al 100% en la semana 32 de edad. (Fig. 3 y Fig. 4A).

La aparición de espermátides alargadas en los túbulos seminíferos fue nula desde el nacimiento hasta las 12 semanas de edad; en la semana 15 se empiezan a ver las primeras espermátides alargadas, incrementándose su presencia hacia la semana 18 (Fig. 4B). De las principales correlaciones referidas a la presencia de espermátides, se detectó alta relación con la edad ( $r=0.83$ ,  $P < 0.001$ ), con el diámetro ( $r=0.78$ ,  $P < 0.001$ ) y el volumen tubular ( $r=0.89$ ,  $P < 0.001$ ) (Cuadro 2).

### ***Células de Sertoli.***

Del nacimiento a las 9 semanas de edad, en borregos Black belly los núcleos de las células de Sertoli se sitúan en la periferia de túbulo, siendo estas las únicas células aparentes dentro del túbulo seminífero (Fig. 5). Posterior a estas

edades y con la aparición del lumen, diferentes células pueden ser notadas, así mismo los núcleos de Sertoli son situados más interiormente (Fig. 6).

*Volumen Individual y Total de los Núcleos de las Células de Sertoli.* El núcleo fue variable en tamaño y forma y, siempre fue localizado cerca de la periferia de los túbulos. El promedio del volumen individual por núcleo al nacimiento fue de  $78.4 \pm 6.3 \mu\text{m}^3$  (Fig. 7), no hubo diferencias significativas entre las semanas 6 y 32 ( $92.8 \pm 10.5$  a  $107.3 \pm 8.6 \mu\text{m}^3$ ), excepto por dos aumentos ( $P < 0.05$ ), observados en las semanas 12 ( $139.7 \pm 11.2 \mu\text{m}^3$ ) y 21 ( $154 \pm 17.4 \mu\text{m}^3$ ). El volumen total ocupado por los núcleos de Sertoli aumento constantemente conforme avanzó la edad de los corderos hasta la semana 15 de edad (Cuadro 3), momento en el cual empezó a estabilizarse, de tal forma que entre las semanas 18 y 32 no hubo cambios significativos.

*Número Total de Células de Sertoli.* El número de células de Sertoli por testículo se correlacionó altamente con el peso testicular ( $r=0.91$ ,  $P < 0.0001$ ). El número total de núcleos de células de Sertoli por ambos testículos mostró diferencias significativas desde el nacimiento hasta las 15 semanas de edad (Fig. 8A), incrementándose aproximadamente 22 veces en este lapso. Posterior a esta fecha, el número de células de Sertoli mostró una tendencia a estabilizarse. Al parecer se presentaron dos períodos que marcan el mayor crecimiento en cuanto a la población de núcleos de Sertoli, el primero de las 0 a las 9 semanas y un segundo de la 12 a la 15. El desarrollo de la población de células de Sertoli fue mejor descrito mediante una ecuación de regresión cuadrática, considerando el logaritmo natural del número de células contra la edad de los animales (Fig. 8B).

*Número de Núcleos de Células de Sertoli por Gramo Tejido Testicular.* El número de células de Sertoli por gramo de tejido disminuyó conforme avanzó la edad (Cuadro 3). El número de células de Sertoli por gramo de epitelio germinal y por gramo de tejido tubular fue alto al nacimiento y a las 3 semanas de edad,

posteriormente fue disminuyendo hasta la semana 12, la disminución más drástica fue observada entre las semanas 9 y 12, lo cual coincidió con otros eventos, como la mayor tasa de crecimiento testicular, el mayor aumento en el volumen del tejido tubular y epitelio germinal y el mayor aumento en el diámetro de los túbulos seminíferos. El valor observado a las 12 semanas de edad representó sólo entre 18 y 23% del valor observado en la semana 9 y entre 11 y 14% del observado al nacimiento. Entre el nacimiento y las 9 semanas de edad no hubo diferencias en el número de células de Sertoli por gramo de parénquima testicular (Cuadro 3); la disminución más importante se observó entre la semana 9 y 12, pues hubo una reducción de 75%. Después de las 12 semanas de edad no se observaron mayores cambios.

*Concentraciones Séricas de Hormonas Tiroideas.* La Fig. 9 muestra que la concentración sérica de  $T_3$  decreció de  $368 \pm 93$  ng/ml al nacimiento, a  $196 \pm 49$  ng/ml a las 3 semanas de edad ( $P < 0.001$ ); posteriormente disminuyó paulatinamente, aunque sin cambios ( $P > 0.05$ ) significativos hasta la semana 15 ( $144 \pm 36$  ng/ml). En la semana 18 ( $101 \pm 25$  ng/ml) disminuyó ( $P < 0.05$ ) con relación a las semanas 0 a 9 y hacia la semana 32 se observó otra disminución ( $52 \pm 13$  ng/ml;  $P < 0.05$ ). La concentración de  $T_4$  fue alta al nacimiento ( $12.9 \pm 2.4$  ng/ml) y decreció a  $6.6 \pm 1.2$  ng/ml a las 3 semanas de edad ( $P < 0.05$ ); posteriormente se mantuvo relativamente sin cambios hasta la semana 21 ( $P > 0.05$ ) y volvió a decrecer en la semana 32 ( $3.8 \pm 0.7$  ng/ml), aunque la diferencia fue significativa sólo con relación a la semanas 0 a 15 ( $P < 0.05$ ).

## Discusión

El tamaño y peso testiculares aumentaron con la edad, generando una curva de crecimiento de forma sigmoidea, similar a lo reportado previamente (Skinner, 1968a), siendo lento en las primeras semanas, con un rápido incremento entre las semanas 9 y 15, lo cual concuerda con datos presentados para otras razas (Dyrmundsson, 1973; Hochereau-de-Reviere et al., 1987); después de la semana 15, el crecimiento continúa de una manera gradual hasta la madurez sexual (Crim and Geschwind, 1972a, b). El aumento mantenido del crecimiento testicular, es indicativo del desarrollo de los túbulos seminíferos en longitud y diámetro (Kilgour et al., 1998) y del inicio de la espermatogénesis, proporcionando espacio para la producción espermática, además del aumento del tejido intersticial.

Las correlaciones observadas en el presente estudio entre el peso testicular y el peso corporal decrecieron con la edad, de tal forma que no fueron significativas a las 21 semanas. Otros estudios han mostrado correlaciones entre el tamaño testicular y el peso corporal en ovinos pre y postpuberales ( $r= 0.69$ ; Yarney et al., 1990) y en bovinos ( $r=0.30$  a  $0.55$ ; Amann, 1970). Además Lunstra et al. (1978) encontraron que el peso corporal se correlacionó con la circunferencia escrotal ( $r=0.73$ ) en toros al año de edad; de hecho parece haber un cierto grado de asociación entre peso corporal y tamaño testicular en toros jóvenes.

En el presente estudio, el número de células de Sertoli en los primeros días de edad coincide con datos presentados previamente en corderos neonatos por Courot (1971). Se sabe que la actividad mitótica de las células de Sertoli es máxima durante la vida fetal tardía y postnatal temprana en ratas (Steinberger, et al., 1971; Orth, J., 1982), ratones (Kluin, et.al., 1984) y conejos (Sun, et al., 1981), declinando constantemente durante el período postnatal, hasta cesar definitivamente después del inicio de la espermatogénesis (Wang, et al., 1989). En el testículo fetal de ovinos, las células de Sertoli experimentan hasta 8 divisiones mitóticas, 6 de las cuales se llevan a cabo antes de los 110 días de gestación;

entre el día 110 de la gestación y el nacimiento, la proliferación de las células de Sertoli es reducida y después del nacimiento ésta incrementa otra vez (Courrot, 1962).

En el presente estudio, la actividad proliferativa de las células de Sertoli se estableció durante las primeras semanas de vida y al parecer se detuvo después de las 12 semanas de edad, coincidiendo con los estudios realizados por Gondos y Berndtson (1993), quienes establecen que la proliferación de las células de Sertoli se extiende más allá de los 40 días. Nuestros datos indican que el número de células de Sertoli del nacimiento hasta las 15 semanas de edad, incrementó aproximadamente 22 veces, lo cual representó aproximadamente 4.5 ciclos de duplicación; en términos relativos, este aumento es menor a los ocho ciclos de duplicación que ocurren durante la vida fetal, entre la diferenciación sexual y el nacimiento. Por lo tanto se puede resumir, que en el cordero existen dos períodos de máxima actividad mitótica de las células de Sertoli, la primera posterior a la diferenciación sexual y antes de los 110 días de gestación y, la segunda durante las primeras semanas después del nacimiento.

La importancia de conocer el desarrollo de la población de células de Sertoli, radica en que el número de estas células en el testículo adulto determina el tamaño testicular y la producción espermática diaria (Berndtson et al., 1987; Hochereau-de Reviers et al., 1987). Esta relación ocurre ya que cada célula de Sertoli tiene la capacidad para soportar un número limitado de células germinales (Orth et al., 1988), la cual varía entre especies, pero es relativamente constante dentro de una misma especie (Sharpe, 1994). Solamente las células de Sertoli inmaduras proliferan, así que el número de células de Sertoli final es determinado antes de la pubertad. En otras palabras el número de células de Sertoli establecido durante el desarrollo testicular determina la capacidad de producción espermática en animales sexualmente maduros (Orth et al., 1988; Hess et al., 1993). De acuerdo a los resultados encontrados en la presente investigación, se puede asumir que la población final de las células de Sertoli se estableció después de las 12 semanas de edad, ya que a partir de la semana 15 no se detectaron

diferencias entre edades. Después de estabilizarse el número de estas células, el desarrollo testicular puede continuar hasta que todas las células de Sertoli han alcanzado su máxima capacidad funcional y puedan mantener la integridad de la barrera hemo-testicular, evitando contacto físico entre el sistema inmune del organismo y las células germinales y proporcionando un medio bioquímico favorable para el desarrollo las células germinales (Steinberger and Steinberger, 1971; Berndtson, 1987).

Durante las primeras seis semanas de vida no hubo cambios en el número de células de Sertoli por unidad de volumen de tejido tubular o epitelio germinal, a pesar de que la población de células de Sertoli iba en aumento, lo cual indica que otros componentes del epitelio seminífero, iban aumentando en paralelo. Es muy probable que estos componentes hayan sido espermatogonias, las cuales podrían haber estado en proceso de mitosis, en preparación para el inicio de la espermatogénesis, lo cual, sumado al aumento del número de células de Sertoli, contribuyó al aumento observado en el volumen absoluto de epitelio germinal. La drástica disminución del número de células de Sertoli por unidad de peso de tejido testicular, observada a partir de las semanas 9 y 12, indica un mayor aumento de la tasa de crecimiento de otros componentes testiculares, tanto dentro de los túbulos seminíferos (diferentes tipos de células germinales resultado del inicio y establecimiento de la espermatogénesis) como en el intersticio (células de Leydig, tejido conjuntivo y vasos sanguíneos).

La espermatogénesis es un proceso complejo en los testículos que involucra la producción de espermatogonias tipo A y la conversión de éstas en espermatozoides maduros (Hochereau-de Reviers, 1976; Ammann, 1983). El inicio de la espermatogénesis requiere del soporte de las células de Sertoli y las de Leydig (Setchell, 1978; Steinberger, 1981; Skinner, 1991). La espermatogénesis inicia con la proliferación de las espermatogonias tipo A (Hochereau-de Reviers, 1981). Tanto en bovinos como en ovinos, las espermatogonias experimentan por lo menos 6 divisiones mitóticas (3 de tipo A, 1 intermedia y 2 de tipo B), antes de diferenciarse hacia a espermatoцитos primarios,

(Berndtson and Desjardins, 1974; Hochereau-de Reviers et al., 1976). En corderos, el inicio de la espermatogénesis ocurre posterior al pico postnatal temprano de FSH (Walton, et al., 1980) y a la secreción de LH (Courot and Ortavan, 1981). En corderos Suffolk, el inicio de la espermatogénesis fue relacionada a la secreción postnatal de LH, alrededor de las 3 semanas de edad (Wilson and Lapwood, 1979a; Echternkamp and Lunstra, 1984).

En el presente estudio, las espermátides alargadas empezaron a observarse tres semanas después de la aparición del lumen tubular, es decir, a partir de las 15 semanas de edad y aparecieron en la mayoría de los túbulos evaluados hacia la semana 18, lo cual indica que se habían alcanzado etapas avanzadas de la espermatogénesis. En ovinos adultos se ha observado que la espermatogénesis tiene una duración de 49 días (Sharpe, 1994) y cada una de las tres etapas en que se divide (espermaticitogénesis, meiosis y espermiogénesis) tiene una duración aproximadamente similar entre ellas; considerando que las espermátides alargadas aparecen hacia el final de la espermiogénesis y que ésta es la última etapa de la espermatogénesis, entonces cuando son observadas las primeras espermátides alargadas ya han transcurrido por lo menos 6 a 7 semanas del inicio del proceso que les dieron origen, y por lo menos 4 a 5 semanas de la aparición de los primeros espermaticitos primarios; por lo tanto, es muy probable que la espermatogénesis haya tenido inicio alrededor de las 8 ó 9 semanas de edad, pero debió haber empezado en la mayoría de los túbulos seminíferos entre las semanas 11 y 12, lo cual concuerda con el aumento acelerado del tejido tubular y del epitelio germinal y con la mayor etapa de crecimiento testicular observados entre las semanas 9 y 12 de edad. Similares observaciones han sido descritas en corderos cruzados de Suffolk, cuyo inicio de la espermatogénesis fue detectado entre 10 y 15 semanas de edad, independientemente de la estación de nacimiento (Courot et al., 1975). Bajo este contexto, la aparición de los primeros espermaticitos primarios debió haber sucedido en un periodo comprendido entre las semanas 10 y 14, lo cual concuerda con datos previamente reportados (Skinner, 1968a; Crim and Geschwind, 1972).



Considerando que una de las principales funciones de las células de Sertoli adultas (completamente funcionales y sin capacidad de mitosis) es la conformación de la barrera hemo-testicular (Gondos and Berndston, 1993) y que ésta debe estar funcionando cuando empiezan a aparecer los espermatoцитos primarios, la edad a la cual se estabilizó el número de células de Sertoli (15 semanas) parece ser un poco alta, sin embargo, deben hacerse dos consideraciones: en primer lugar, como no hubo muestreos intermedios entre las semanas 12 y 15, no se descarta la posibilidad de que el número de células de Sertoli se haya establecido antes de la semana 15; en segundo lugar, los corderos evaluados en cada grupo de edad fueron diferentes, por lo que pudieron haber diferencias individuales, con lo cual en algunos corderos el número de células de Sertoli pudo haberse estabilizado antes de o después de la semana 15, sin que se pudiera detectar, debido a la naturaleza misma del esquema de muestreo utilizado.

Los túbulos seminíferos comprenden el principal compartimiento del testículo y ocupan entre 70 y 90% del parénquima testicular en la mayoría de los mamíferos investigados (Franca and Rusell, 1998). La mayor proporción de tejido tubular encontrada en los borregos de este estudio, se observó en la semana 18 (69 %), después de esta edad el tejido tubular representó entre 52 y 56 % del parénquima testicular, valor que se considera bajo, comparado con lo reportado para otras especies.

En el presente estudio se estableció que el crecimiento de los testículos es una consecuencia del incremento en los compartimentos tubular e intersticial, debido a que existe un incremento en la longitud de los túbulos seminíferos, y colateralmente la aparición del lumen con un incremento del diámetro de los mismos. El desarrollo de los túbulos seminíferos después del nacimiento ha sido analizado en corderos (Courot, 1962) y en toros (Attal y Courot, 1963) y se ha observado que el aumento en la longitud de los túbulos es dependiente de las gonadotropinas (Courot, 1967).

El promedio de 11 metros de túbulo seminífero por gramo de parénquima testicular, observado en el presente estudio, concuerda con lo reportado en otras especies, donde el rango oscila entre 10 y 15 metros (Setchell et al., 1994; Franca and Rusell, 1998). El mayor aumento en la longitud de los túbulos seminíferos ocurrió desde el nacimiento hasta las 12 semanas de edad, lo cual concuerda con el supuesto período de proliferación de las células de Sertoli establecido en esta investigación. En conclusión el incremento en la proporción de tejido tubular es una consecuencia de un incremento de la longitud de los túbulos (600%) más que del diámetro (300%).

En la presente investigación el aumento del diámetro tubular fue lento durante las primeras 9 semanas de edad (diámetro de 41 a 65  $\mu\text{m}$ ); durante este periodo, la mayoría de los túbulos seminíferos fueron cordones sólidos, sin un lumen central visible, debido a que las células germinales (probablemente solo espermatogonias) y células de Sertoli proliferan, ambas originando un crecimiento de los túbulos de manera longitudinal; posterior a esta fecha y hacia la semana 12 se observa un mayor crecimiento en el diámetro, lo cual estuvo relacionado temporalmente con la aparición del lumen en los túbulos (diámetro tubular entre 127 y 189  $\mu\text{m}$ ), con el aumento del epitelio seminífero y con el establecimiento de la espermatogénesis, según consta por la presencia de espermátides a partir de las 15 semanas de edad. El principal factor responsable para el crecimiento de los túbulos seminíferos después de la semana 12 ó 15 es la proliferación de las células germinales, debido a que durante este período las células de Sertoli ya han perdido la capacidad de multiplicarse.

La presencia de túbulos con lumen a partir de la semana 12, es considerado por algunos autores como el inicio de la pubertad y la espermatogénesis (Courrot, 1967); sin embargo la espermatogénesis debió haber iniciado algunas semanas antes, considerando que la luz tubular aparece después de que el epitelio germinal aumenta en volumen, como consecuencia del desarrollo y diferenciación de las diferentes etapas de las células germinales. Ruth et al. (1998), mencionan que corderos machos nacidos en primavera empiezan su

desarrollo reproductivo a la mitad del verano, alrededor de las 10 semanas de edad, ya que dan inicio los ciclos espermatogénicos. Lo anterior explica en este trabajo, el acelerado crecimiento del tamaño testicular y la existencia de las primeras espermátides a partir de la semana 15.

Debido al daño que presentó el tejido por el encogimiento no fue posible llevar a cabo una evaluación del desarrollo de las estructuras y células del tejido intersticial, básicamente células de Leydig, tejido conectivo o estructuras vasculares.

En estudios anteriores hechos en roedores, se ha observado que las hormonas tiroideas tienen un efecto negativo sobre la capacidad de multiplicación de las células de Sertoli (Van Haaster et al, 1993), de tal forma que cuando se induce un estado temporal de hipotiroidismo el periodo de proliferación celular puede alargarse (Cooke et al., 1992). En el presente estudio, las concentraciones de hormonas tiroideas fueron disminuyendo conforme avanzó la edad y se mantuvieron relativamente sin cambios alrededor de las 15 semanas de edad; es decir, no se observó algún cambio significativo relacionado con el crecimiento de la población de células de Sertoli o ligado a la estabilización del número de éstas. Con estos datos no es posible concluir que haya una falta de efecto de las hormonas tiroideas sobre la capacidad de proliferación de las células de Sertoli, pues quizá este efecto pudo haber sido enmascarado por otros factores como la variación individual o el bajo número de observaciones por grupo de edad. Otra posible explicación es que conforme avanza la edad los testículos sean más responsivos a las hormonas tiroideas, pues se sabe que el número de receptores para estas hormonas presentes en las células de Sertoli aumentan conforme se desarrollan los testículos (Cooke et al., 1994; Palmero et al., 1988), de tal forma que aún bajo un ambiente similar en cuanto a concentraciones hormonales, el efecto sobre la respuesta celular puede ser diferente. Otros factores que influyen en la maduración de las células de Sertoli, pero que no fueron evaluados en el presente estudio, son el aumento de las concentraciones de FSH, testosterona y

el número de receptores para andrógenos, los cuales pueden ser inducidos conjuntamente por FSH y T<sub>3</sub> (Jeremy et al., 2003).

## Referencias

- Abercrombie, M. 1946. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat. Rec.* 94:238-248
- Amann, R. 1970. Sperm production rates. In: A.D. Johnson, W. Gomes and N. VanDemark (Ed). *The testis*. Vol 1. p4333. Academic Press, NY.
- Attal, J., Courot, M. 1963. Developpement testiculaire et etablissement de la spermatogeneses chez le taureau. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biopys.* 3:219-241
- Berndtson, W., Igboeli, G., Pickett, B. 1987. Relationship and absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *J. Animal Sci.* 64:241-246
- Cooke, P.S., Zhao, Y.D., Bunick, D. 1994. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induce by neonatal goitrogen treatment. *Biol Reprod.* 51:1000-1005
- Cortes, D., Muller, J., Skakebaek, N. 1987. Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J. Androl.* 10:589-596
- COTECOCA. 1989. Comisión técnica consultiva para la determinación regional de los coeficientes de agostadero. En: *Memorias técnicas de los Estados de Querétaro e Hidalgo*. p 24 - 33.
- Courot, M. 1962. Développement du testicule chez l'agneu. Etablissement de la spermatogenése. *Annales de Biologie Animale, Biophysique et Biochimie.* 2:25-42
- Courot, M. 1967. Endocrine control of the supporting and germ cells of the impuberal testis. *Journal of Reprod. and Fertil. Supplement.* 2:89-101
- Courot, M. 1971. Etablissement de la spermatogenése chez l'agneau (*Ovis aries*). Etude expérimentale de son contrôle gonadotrope; mportance des cellules de la Ignée Sertolienne Thèse Doctorat d'Etat es Sciences naturelles Paris Ao 6317
- Courot, M., de Revers, M.M., and Pelletier, J. 1975. Variations in pituitary and blood Lh during puberty in the male lambs: relation to the time of birth. *Annales de Biologie, Biochemie et Biophysique.* 15:509-516
- Curtis, S., Aman, R. 1981. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. *J of Animal Science.* 53:1645-157
- De Krester, D. 1967. The fine structure of the testicular interstitial cells in men of normal androgenic status. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 80: 79-97
- Fawcett, D., Burgos, M. 1960. Studies on the fine structure of the mammalian testis. II. The human interstitial tissue. *Am. J. Anat.* 107:245-269
- Franca, L.R., Rusell, L.D. 1998. The testis of domestic animals. In: Martínez F, Regadera J (Eds). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid, Spain: Churchill Livingstone. P. 197-219
- Gondos, B., Berndston, W.E. 1993. Postnatal and pubertal development. In: Russell LD, Griswold MD (eds.), *The Sertoli Cell*, 1st ed. Clearwater, FL: Cache River Press; 115-154.
- Hardy, M., Zirkin, B., Ewing, L. 1989. Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in the testes of the puberal rats. *Endocrinol.* 124:762-770
- Hess, R.A., Cooke, P.S., Bunick, D., Kirby, J. 1993. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increase Sertoli cell and germ cell number. *Endocrinology.* 132:2607-2613

- Hochereau de Reviere, M., Lincoln, G. 1978. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *J. Reprod. Fertil.* 54: 209-213
- Hochereau de Reviere, M.T., Monet-Kuntz, C., Courrot, M. 1978. Spermatogenesis and Sertoli cells numbers and function in rams. *J. Reprod. fertil. (Suppl)*. 34:101-114
- Iczkowski, K., Sun, E., Gondos, B. 1991. Morphometric studies of prepubertal rabbit testis: germ cell numbers and seminiferous tubule dimensions. *Am. J. Anat.* 190:266-272
- INEGI. 1993id. El Marques, estado de Querétaro. En: Cuaderno Estadístico Municipal. p 71-78
- Buzzard, J., Wreford, N and Morrison, J. 2003. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat Sertoli cells. *Endocrinol.* 144:3722-3731
- Jiménez-Severiano H, Mussard, ML, Fitzpatrick LA, D'Occhio MJ, Ford JJ, Lunstra DD, Kinder JE. 2005. Testicular development of Zebu bulls after chronic treatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *J. Anim. Sci. (En prensa)*
- Johnson, L., Thompson, D. 1983. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentration of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biol. Reprod.* 35:777-789
- Kilgour, R., Pisselet, C., Dubois, M., Courrot, M. 1998. Ram lambs need FSH for normal testicular growth, Sertoli numbers at onset of spermatogenesis. *Reprod. Nutr. Dev.* 38:539-550
- Kluin, P., Kramer, M., de Rooij, D. 1984. Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. *Anat. Embryol.* 169:73-78
- Kosco, M., Loseth, K., Crabo, G. 1989. Developmental of the seminiferous tubules after neonatal hemicastration in boar. *J. Reprod. Fertil.* 87:1-11
- Lunstra, D., Ford, J., Echtenkamp, S. 1978. Puberty in beef bulls: hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. *J. Anim. Science.* 46:1054-1062
- McCoard, S., Lunstra, D., Wise, T., Ford, J. 2001. Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and White composite boars during the neonatal period. 689-695
- Mancini, R., Vilar, O., Lavieri, J., Andrada, J., Heinrich, J. 1963. Development of Leydig cell in the normal human testis. A cytological, cytochemical and quantitative study. *Am. J. Anat.* 112:203-212
- Meachem, S., McLachlan, R., de Kretser, D., Robertson, D., Wreford, N. 1996. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. *Biol. Reprod.* 54:36-44
- Oke, B.O., Ogwuegbu, S.O., Akusu, M.O. 1984. Morphometric study of the testis of the West African goat. *Bull. Anim. Health Prod. S. Afr.* 32:57-60
- Orth, J. 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.* 203:485-492
- Orth, J., Gunsalus, G., Lamperti, A. 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinol.* 122:787-794
- Russell, L.D., Etlin, R.A., Sinha Hikim, A.P., Clegg, E.D. 1990. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. 5<sup>th</sup> ed. Cache River Press, St Louis, MO.
- SAS. *SAS User's Guide: statistics*, 7<sup>th</sup> ed. Cary, NC: SAS Institute Inc.; 2000
- Setchell, B.P., Maddocks, S. Brooks, D.E. 1994. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the reproductive tract. In: Knobil E, Neill JD (Eds) *The physiology of reproduction*. 2<sup>nd</sup> ed, N Raven Press. P 1063-1175

- Sharpe, R. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD (eds.). The physiology of Reproduction, 2<sup>nd</sup> Edition. Ew York: Raven Press. 1363-1434
- Steinberger, A., Steinberger, E. 1971. Replication pattern Sertoli cells in maturing rats testis in vivo and in organ culture. *Biol. Reprod.* 84:84-94
- Sun, E., Gondos, B. 1981. Proliferative activity in the rabbit testis during postnatal development. In: Byskov AG, Peters H (eds), Development and function of reproductive organs. Amsterdam: Excerpta Medica. 140-148
- Waites, G., Speight, A., Jenkins, N. 1985. The functional maturation of the Sertoli cell and Leydig cell in the mammalian testis. *J Reprod Fertil.* 75: 317-326
- Wang, Z., Wreford, N., de Kretser, D. 1989. Determination of Sertoli cell numbers in the developing rat testis by stereological methods. *Int J. Androl.* 12:58-64
- Wing, T., Christensen, A. 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am. J. Anat.* 165: 13-25nd practice of stereological techniques applied to the estimation of cell number and nuclear volume of the testis. *Microsc Research Techniques.* 32:423-436
- Wreford, N. 1995. Theory and practice of stereological techniques applied to the estimation of cell number and nuclear volume in teh testis. *Microsc Res Tech.* 32:423-436
- Yarney, T., Sanford, L., Palmer, W. 1990. Pubertal development of ram lambs: body weight and testicular measurements as ndices of postpubertal reproductive function. *Canadian J Ani Science.* 70:139-147

Cuadro 1. Características del tejido tubular, túbulos seminíferos y epitelio germinal, entre el nacimiento y las 32 semanas de edad, en corderos Blackbelly nacidos en verano<sup>1</sup>.

Edad, semanas	Tejido tubular		Túbulos seminíferos		Epitelio germinal	
	Porcentaje	Volumen, cm <sup>3</sup>	Diámetro, μm	Longitud, m	Porcentaje	Volumen, cm <sup>3</sup>
0 (n=6)	33.3 ± 3.1 <sup>c</sup>	0.37 ± 0.06 <sup>a</sup>	41.3 ± 2.4 <sup>f</sup>	171.7 ± 16.1 <sup>f</sup>	33.3 ± 3.1 <sup>d</sup>	0.37 ± 0.06 <sup>g</sup>
3 (n=6)	31.3 ± 3.1 <sup>c</sup>	0.65 ± 0.10 <sup>f</sup>	39.7 ± 2.3 <sup>f</sup>	303.6 ± 28.5 <sup>e</sup>	31.3 ± 3.1 <sup>d</sup>	0.65 ± 0.10 <sup>f</sup>
6 (n=5)	38.35 ± 3.4 <sup>c</sup>	1.91 ± 0.32 <sup>e</sup>	49.0 ± 3.1 <sup>e</sup>	606.3 ± 62.3 <sup>d</sup>	38.4 ± 3.4 <sup>bcd</sup>	1.91 ± 0.31 <sup>e</sup>
9 (n=4)	39.9 ± 3.8 <sup>c</sup>	4.26 ± 0.80 <sup>d</sup>	64.3 ± 4.6 <sup>d</sup>	749.6 ± 86.1 <sup>d</sup>	39.9 ± 3.8 <sup>bcd</sup>	4.26 ± 0.78 <sup>d</sup>
12 (n=6)	55.1 ± 3.1 <sup>b</sup>	36.53 ± 5.58 <sup>c</sup>	126.4 ± 7.3 <sup>c</sup>	1094.3 ± 102.6 <sup>c</sup>	44.5 ± 3.1 <sup>b</sup>	29.44 ± 4.40 <sup>c</sup>
15 (n=6)	56.8 ± 3.1 <sup>b</sup>	76.41 ± 11.66 <sup>b</sup>	163.4 ± 9.4 <sup>ab</sup>	1572.3 ± 147.4 <sup>b</sup>	43.7 ± 3.1 <sup>bc</sup>	58.31 ± 8.72 <sup>b</sup>
18 (n=6)	69.3 ± 3.1 <sup>a</sup>	110.12 ± 16.81 <sup>a</sup>	142.3 ± 8.2 <sup>bc</sup>	2177.5 ± 204.2 <sup>a</sup>	58.2 ± 3.1 <sup>a</sup>	91.89 ± 13.74 <sup>a</sup>
21 (n=4)	56.4 ± 3.8 <sup>b</sup>	115.06 ± 21.51 <sup>a</sup>	187.3 ± 13.3 <sup>a</sup>	1796.5 ± 206.3 <sup>ab</sup>	44.0 ± 3.8 <sup>bc</sup>	89.30 ± 16.36 <sup>a</sup>
32 (n=6)	51.6 ± 3.1 <sup>b</sup>	123.76 ± 18.89 <sup>a</sup>	188.5 ± 10.9 <sup>a</sup>	1845.9 ± 173.1 <sup>ab</sup>	35.8 ± 3.1 <sup>cd</sup>	85.49 ± 12.78 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Los datos son presentados como el promedio ± error estándar. Los datos fueron convertidos a su logaritmo natural para los análisis estadísticos y reconvertidos a su valor real para su presentación.

<sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> Promedios con distinta literal dentro de la misma columna indica diferencia ( $P < 0.05$ ).



Cuadro 2. Correlaciones entre las variables de la morfometría testicular mas importantes.

	Túbulos seminíferos						Epitelio germinal	
	con lumen %	con espermátides %	Diámetro	proporción	volumen	longitud	proporción	volumen
edad	0.83***	0.83***	0.88***	0.6***	0.88***	0.83***	0.27	0.84***
con lumen %	-	0.73***	0.95***	0.73***	0.86***	0.83***	0.36**	0.85***
con espermátides %	-	-	0.78***	0.58***	0.89***	0.82***	0.32*	0.87***
Diámetro	-	-	-	0.67***	0.92***	0.86***	0.31*	0.89***
proporción %	-	-	-	-	0.69***	0.79***	0.87***	0.73***
volumen cc3	-	-	-	-	-	0.93***	0.37**	0.98***
longitud m	-	-	-	-	-	-	0.53***	0.94***
proporción %	-	-	-	-	-	-	-	0.47***
volumen cc3	-	-	-	-	-	-	-	-

a Las observaciones fueron hechas desde el nacimiento y hasta las 32 semanas de edad

\*P<0.05, \*\*P<0.01, P<0.001.

Cuadro 3. Promedios ( $\pm$  EE) del volumen nuclear total y del número de células de Sertoli, entre el nacimiento y las 32 semanas de edad, en corderos Blackbelly nacidos en verano<sup>a</sup>.

Edad, semanas	Núcleos de Sertoli, volumen total, cm <sup>3</sup>	Número de células (núcleos) de Sertoli, millones			
		Por ambos testículos	Por gramo de epitelio germinal	Por gramo de túbulo seminífero	Por gramo de parénquima
0 (n=6)	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>g</sup>	531 $\pm$ 73 <sup>e</sup>	1,424 $\pm$ 190 <sup>a</sup>	1,424 $\pm$ 215 <sup>a</sup>	469 $\pm$ 69 <sup>a</sup>
3 (n=6)	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	1,014 $\pm$ 140 <sup>d</sup>	1,562 $\pm$ 208 <sup>a</sup>	1,562 $\pm$ 236 <sup>a</sup>	485 $\pm$ 72 <sup>a</sup>
6 (n=5)	0.21 $\pm$ 0.04 <sup>e</sup>	2,311 $\pm$ 350 <sup>c</sup>	1,206 $\pm$ 176 <sup>ab</sup>	1,206 $\pm$ 200 <sup>ab</sup>	462 $\pm$ 75 <sup>a</sup>
9 (n=4)	0.39 $\pm$ 0.10 <sup>d</sup>	4,191 $\pm$ 820 <sup>b</sup>	879 $\pm$ 166 <sup>b</sup>	879 $\pm$ 188 <sup>b</sup>	354 $\pm$ 74 <sup>a</sup>
12 (n=6)	0.73 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>	6,007 $\pm$ 831 <sup>b</sup>	201 $\pm$ 27 <sup>c</sup>	159 $\pm$ 24 <sup>c</sup>	90 $\pm$ 13 <sup>b</sup>
15 (n=6)	1.21 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	12,008 $\pm$ 1,661 <sup>a</sup>	205 $\pm$ 27 <sup>c</sup>	157 $\pm$ 24 <sup>c</sup>	88 $\pm$ 13 <sup>b</sup>
18 (n=6)	1.48 $\pm$ 0.27 <sup>ab</sup>	14,110 $\pm$ 1,952 <sup>a</sup>	156 $\pm$ 21 <sup>c</sup>	129 $\pm$ 20 <sup>c</sup>	87 $\pm$ 13 <sup>b</sup>
21 (n=4)	2.08 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	13,517 $\pm$ 2,645 <sup>a</sup>	155 $\pm$ 29 <sup>c</sup>	118 $\pm$ 25 <sup>c</sup>	68 $\pm$ 14 <sup>b</sup>
32 (n=6)	1.55 $\pm$ 0.31 <sup>ab</sup>	15,640 $\pm$ 2,370 <sup>a</sup>	184 $\pm$ 27 <sup>c</sup>	129 $\pm$ 21 <sup>c</sup>	65 $\pm$ 11 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Los datos fueron convertidos a su logaritmo natural para los análisis estadísticos y reconvertidos a su valor real para su presentación.

<sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> Promedios con distinta literal dentro de la misma columna indica diferencia ( $P < 0.05$ ).

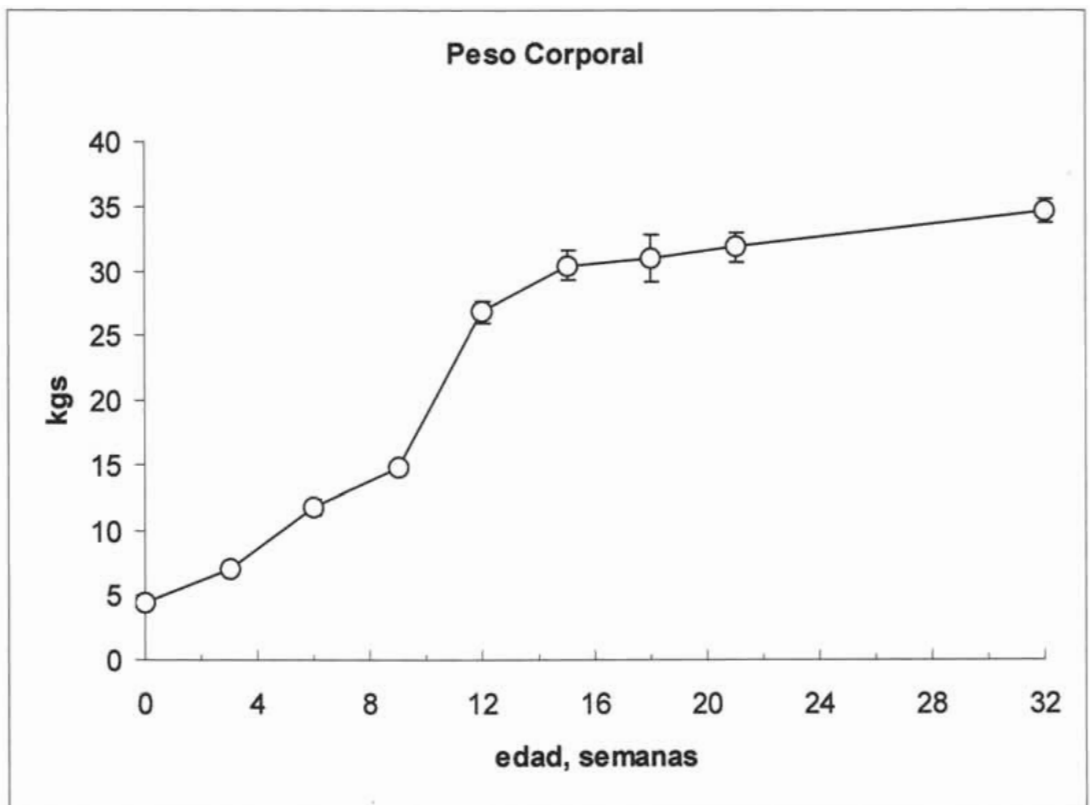


Fig. 1. Peso corporal (promedio  $\pm$  EE) de corderos Blackbelly entre el nacimiento y 32 semanas de edad.

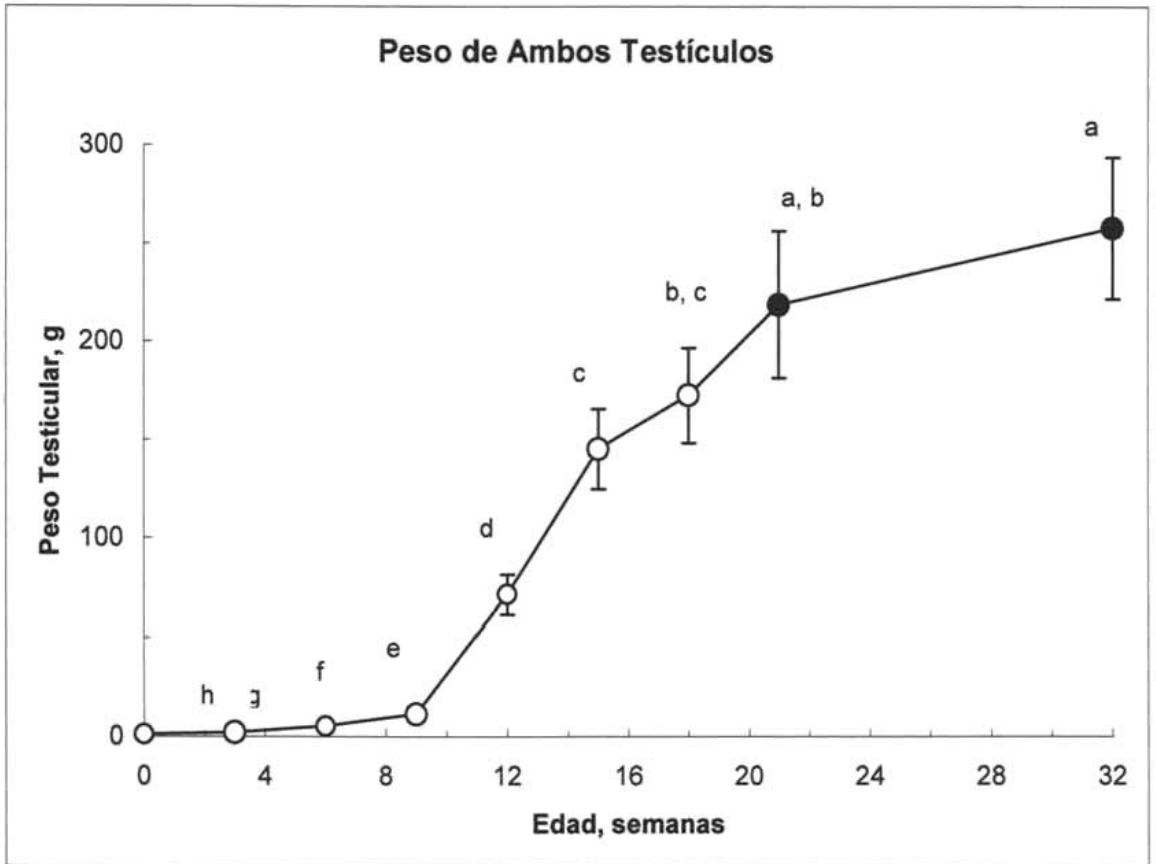
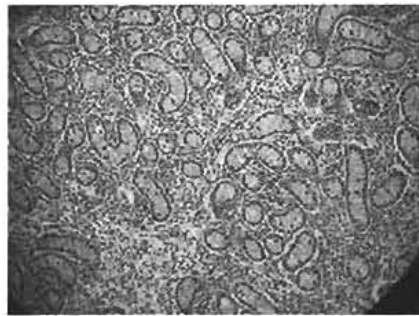
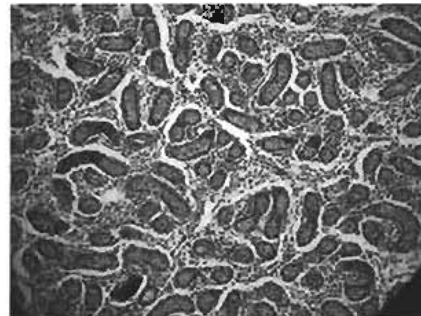


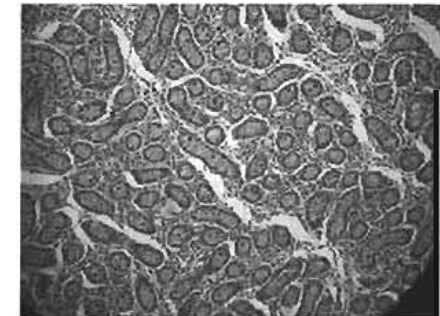
Fig. 2. Peso testicular (promedio  $\pm$  EE) de corderos Blackbelly entre el nacimiento y 32 semanas de edad. Peso Los promedios con la misma letra son similares entre si.



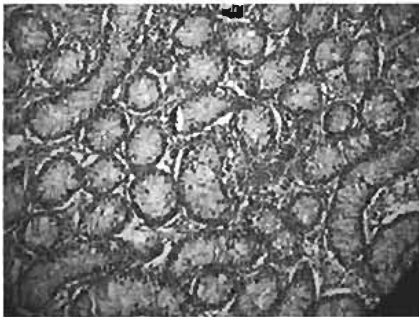
0 semanas



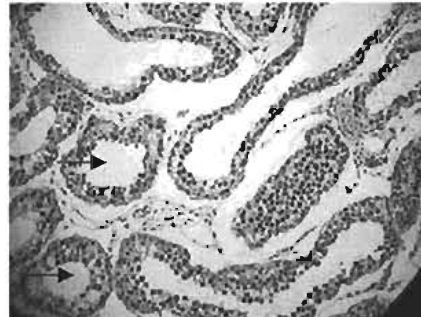
3 semanas



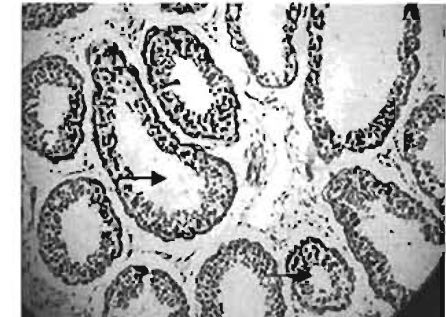
6 semanas



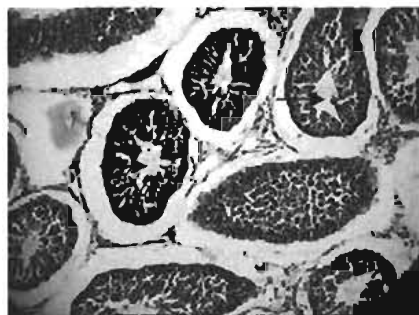
9 semanas



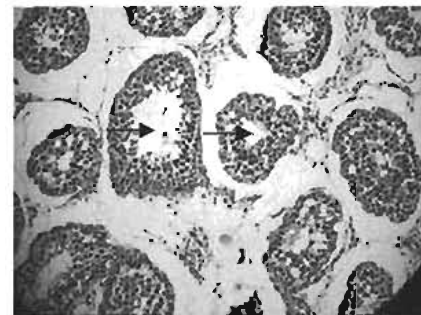
12 semanas



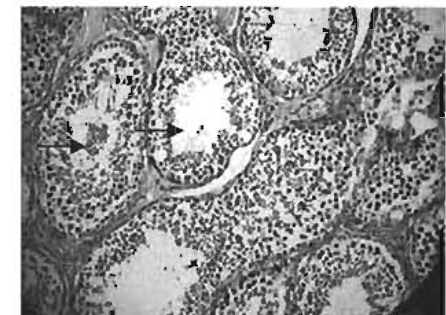
15 semanas



18 semanas



21 semanas



32 semanas

Fig. 6. Los túbulos seminíferos ocuparon una pequeña porción del parénquima testicular del nacimiento hasta las 6 semanas. Los túbulos seminíferos incrementaron en longitud y diámetro mostrando el desarrollo y aparición del lumen (flecha) a las 12 semanas. Las primeras espermátides hacen su aparición a las 15 semanas. A las 18 semanas de edad, un túbulo seminífero es completamente desarrollado y diferentes tipos celulares de la línea espermatogénica pueden ser observados, incluyendo espermátogonias, espermátocitos y espermátides. A las 32 semanas se puede ver espermátocitos completamente desarrollados.

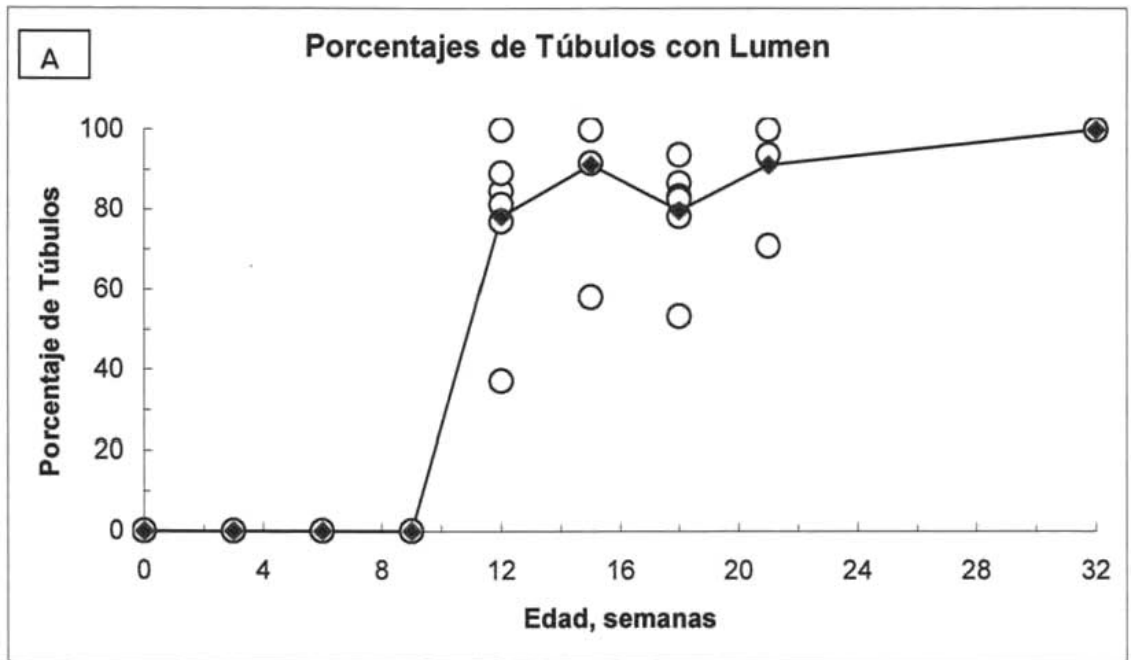


Fig. 4. (A)

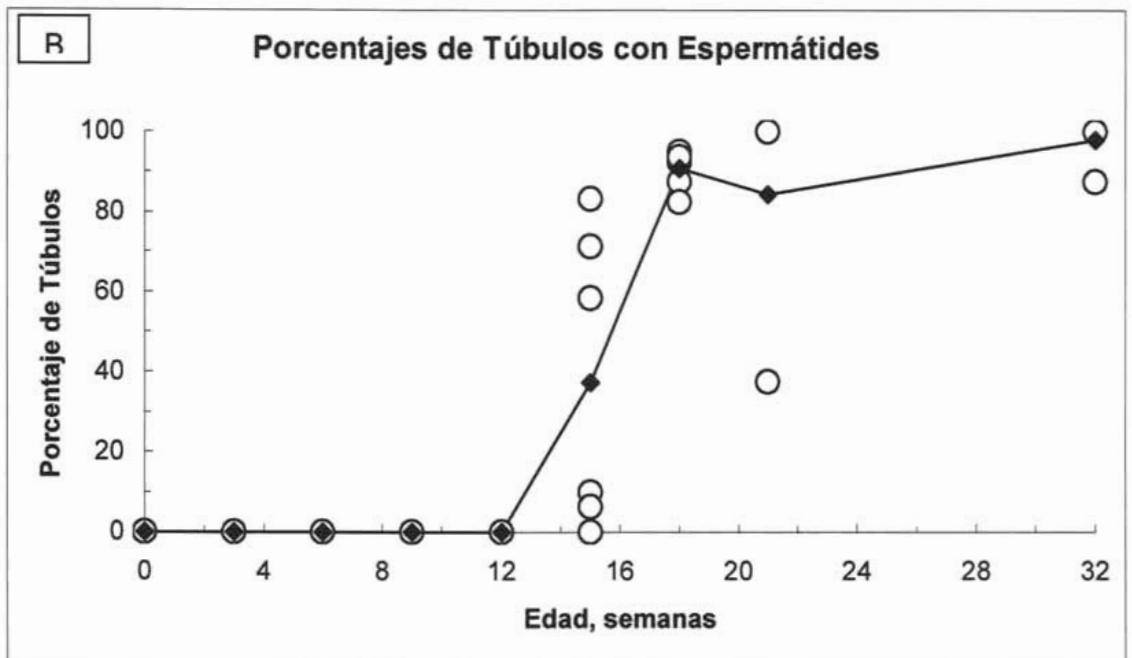


Fig. 4. (A) La presencia de lumen dentro de los túbulos a través de las diferentes edades, es expresada en forma de proporción. (B) La aparición de espermátides dentro de los túbulos expresada en porcentajes. Los diamantes (♦) representan el promedio en proporción por grupo de edad y los círculos (O) la proporción por individuo.

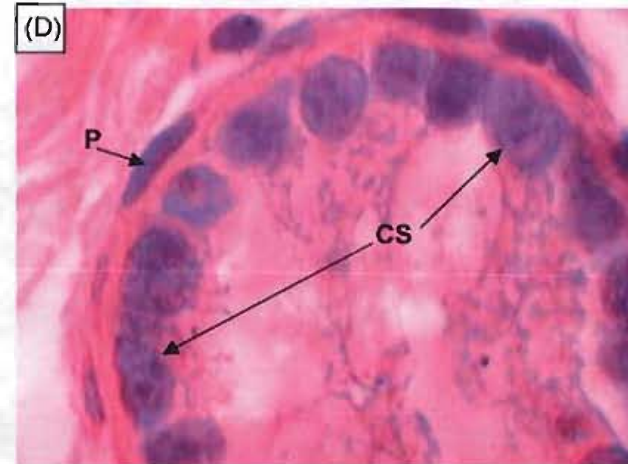
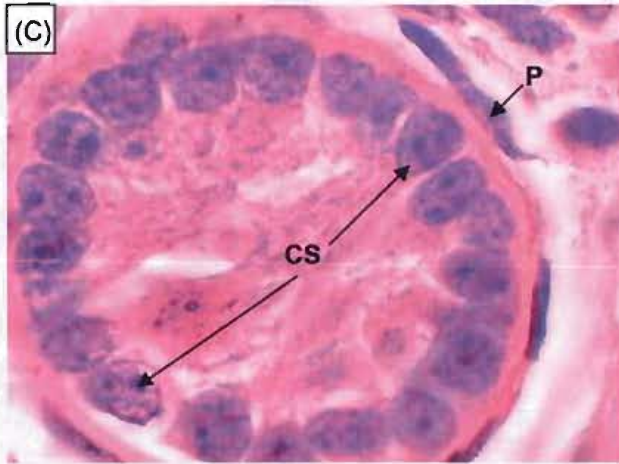
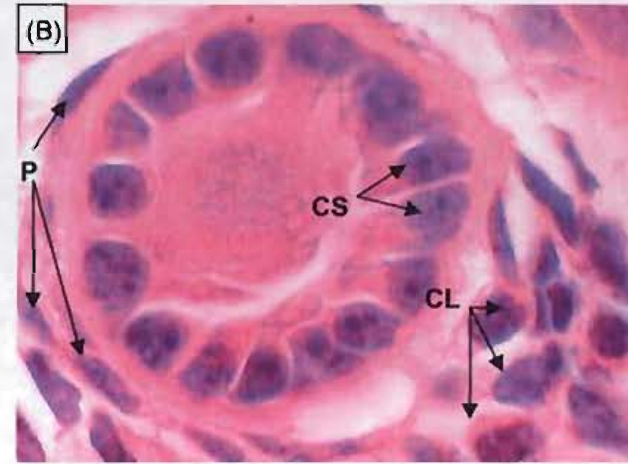
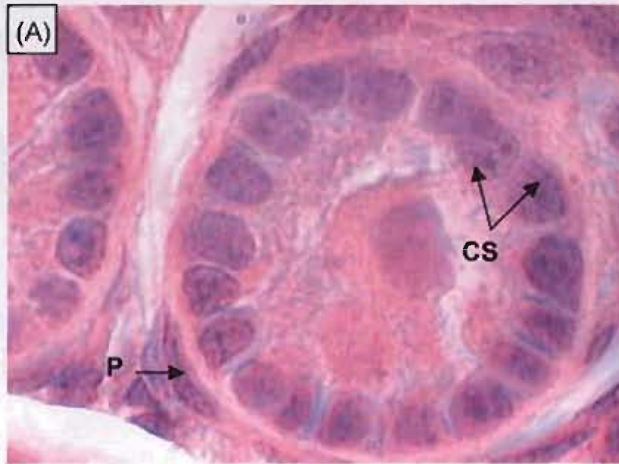


Fig. 7 . Microfotografías de tejido testicular de corderos de diferentes edades teñidos con hematoxilina-eosina. (A) Cordero al nacimiento; (B) cordero de 3 semanas; (C) cordero de 6 semanas; (D) cordero de 9 semanas. Células de Sertoli (CS), células peritubulares (P), células de Leydig (CL).



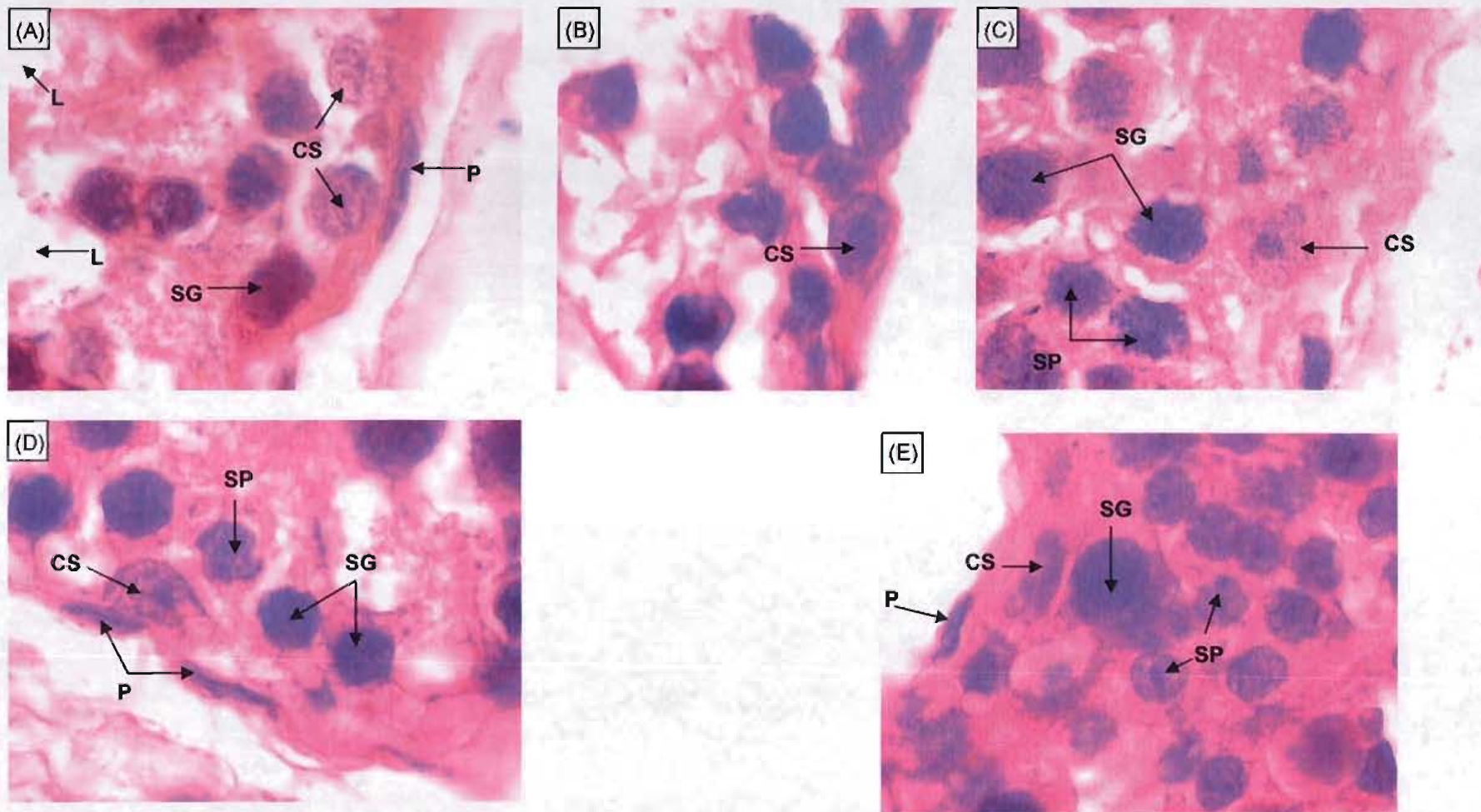


Fig. 8. Microfotografías de tejido testicular de corderos de diferentes edades teñidos con hematoxilina-eosina. (A) cordero de 12 semanas; (B) cordero de 15 semanas; (C) cordero de 18 semanas; (D) cordero de 21 semanas, (E) cordero de 32 semanas. Células de Sertoli (CS), células peritubulares (P), espermatogonia (SG), espermatocitos primarios (SP), lumen (L).

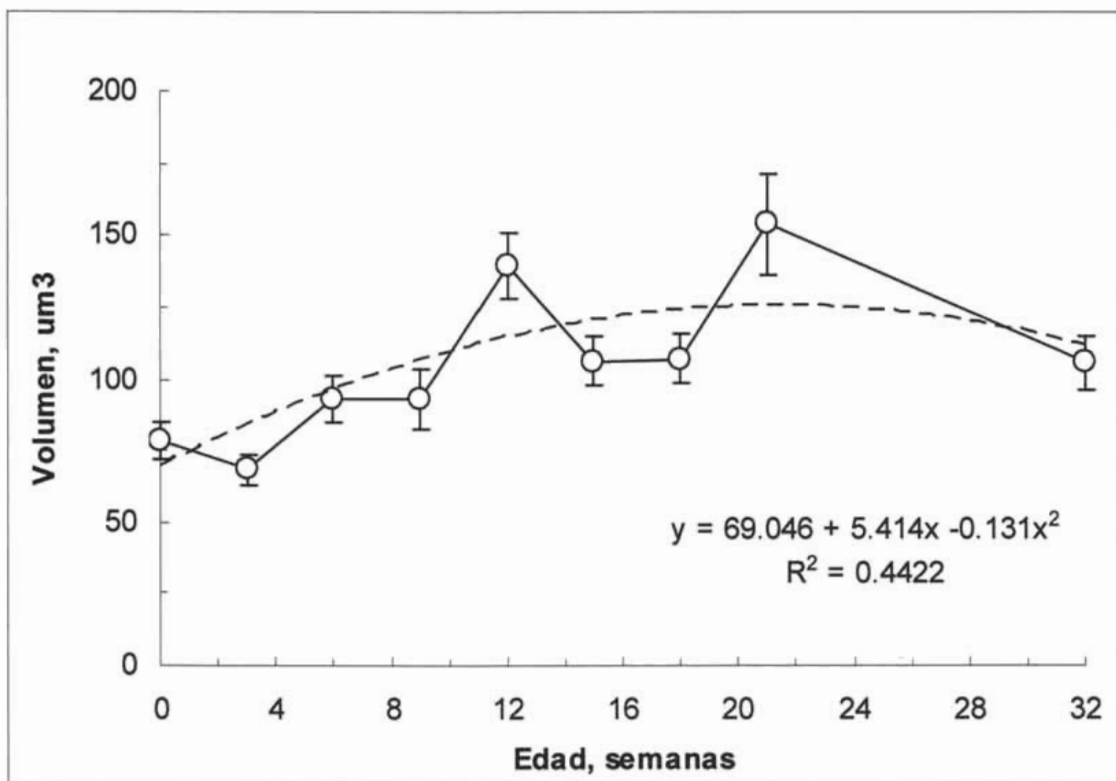


Figura 7. Volumen individual de los núcleos de células de Sertoli (promedio  $\pm$  EE) de corderos Blackbelly entre el nacimiento y 32 semanas de edad. La línea discontinua indica la regresión del volumen en  $\mu\text{m}^3$  sobre la edad en semanas.

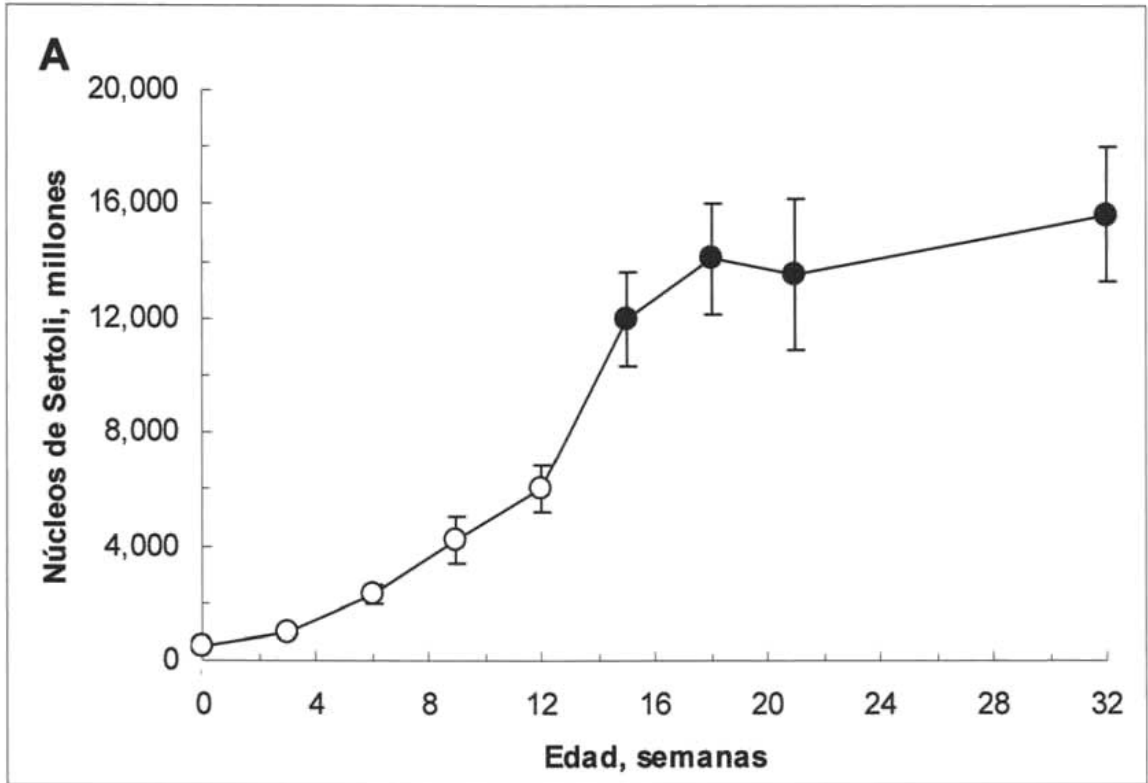


Figura 8 A.

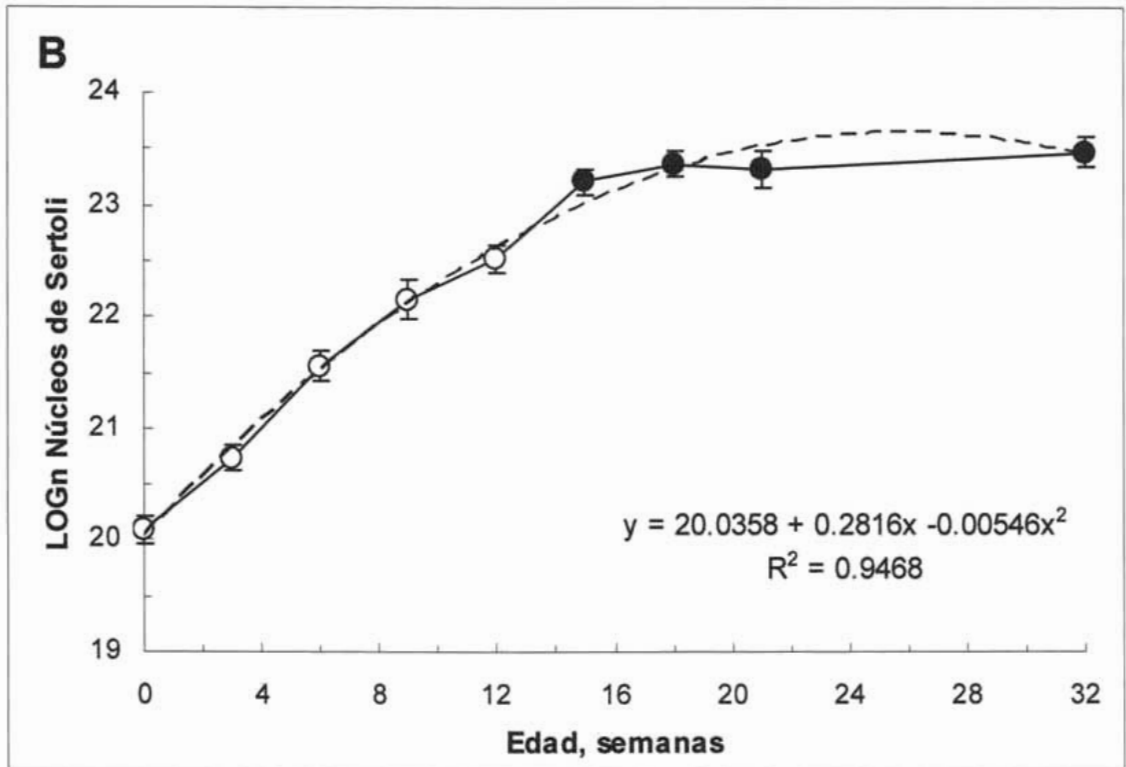


Fig. 8. Desarrollo de la población total de las células de Sertoli (promedio  $\pm$  EE) en corderos Blackbelly, entre el nacimiento y 32 semanas de edad. Los datos fueron convertidos a su logaritmo natural para los análisis estadísticos y reconvertidos a su valor real para su presentación (panel A). En el panel B se presentan los promedios transformados a su logaritmo natural, además de la línea (discontinua) y la ecuación de regresión que describe el desarrollo del número de células de Sertoli. En ambos paneles, los círculos rellenos indican que en esas edades ya no hubo cambios en el número de células de Sertoli.

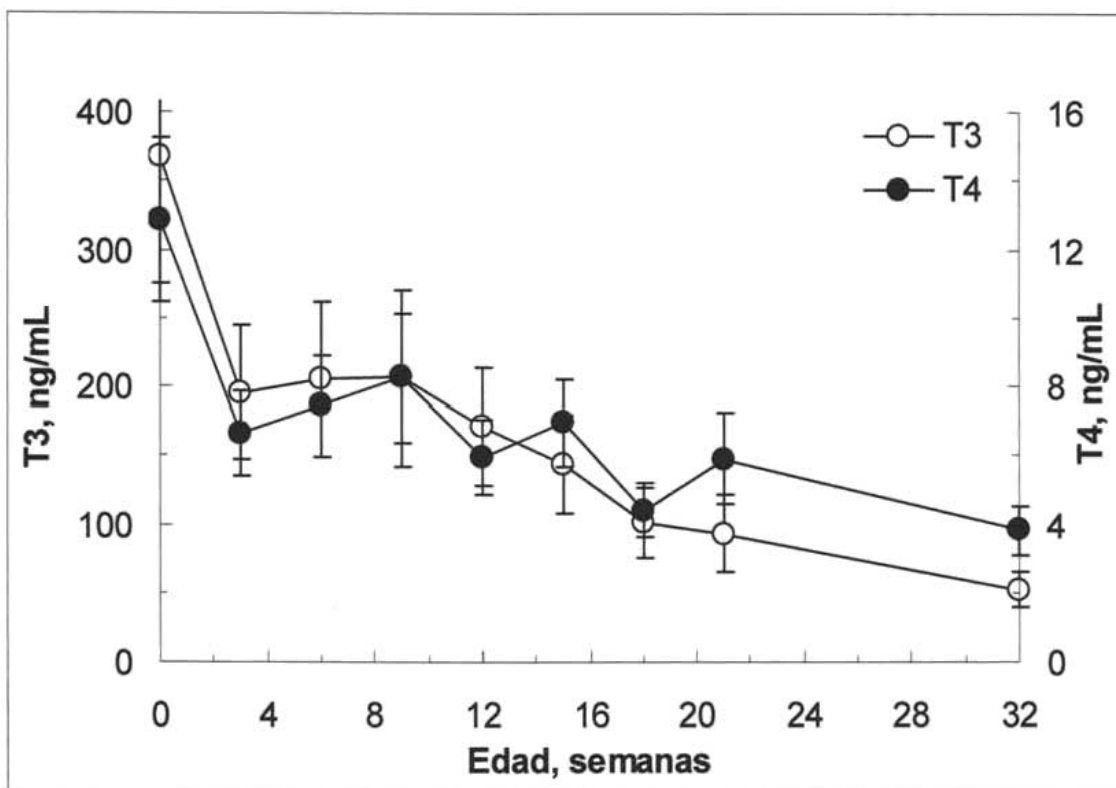


Fig. 9. Concentraciones séricas (promedio  $\pm$  EE) de triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) en corderos Blackbelly entre el nacimiento y 32 semanas de edad.

## 6. CONCLUSIONES

1. El desarrollo testicular en corderos Blackbelly tiene una forma similar a lo observado en otras especies y en otras razas de ovinos, con tres fase de crecimiento bien delimitadas; una fase inicial de crecimiento lento, seguida de una fase de crecimiento rápido, la cual sucede en un período relativamente corto y una fase final, durante la cual la tasa de crecimiento disminuye, tendiendo a estabilizarse. En el grupo de corderos estudiados, el desarrollo testicular fue más rápido que lo que se reporta en la literatura para otras razas de pelo.

2. El aumento del peso testicular estuvo ligado a los incrementos del diámetro y longitud de los túbulos y a la aparición del lumen tubular. Durante las primeras semanas de edad, el aumento en el volumen absoluto del tejido tubular y del epitelio germinal estuvo asociado principalmente a la proliferación de las células de Sertoli y probablemente también de las espermatogonias, pero a partir de la semana 9 la proliferación y desarrollo de las células germinales, asociadas al inicio y establecimiento de la espermatogénesis fue el factor más importante para el crecimiento testicular.

3. El número de células de Sertoli se estabilizó a partir de las 15 semanas de edad, después de 4.5 ciclos de duplicación después del nacimiento, sin que se observara una relación clara entre las concentraciones de hormonas tiroideas y el desarrollo o estabilización de la población de las células de Sertoli.