



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización ultraestructural e inmunohistoquímica de
la muerte de espermatoцитos en ratas de 18, 25, 27 y 32
días de nacidas**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Héctor Gerardo Márquez Reyes



DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez

2016

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de datos

1.- Datos del alumno

Márquez
Reyes
Héctor Gerardo
Tel. 5557850197
Correo: gerrymarquez@ciencias.unam.mx
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias, Biología
306301768

2.- Datos del tutor

Dra.
Olga Margarita
Echeverría
Martínez

3.- Datos del sinodal 1

Dra.
Patricia
Rivas
Manzano

4.-Datos del sinodal 2

Dra.
Tatiana
Fiordelisio
Coll

5.-Datos del sinodal 3

Dra.
María Sandra
Cabrera
Benítez

6.-Datos del sinodal 4

Dra.
María Luisa
Escobar
Sánchez

7.-Datos de trabajo escrito

Caracterización ultraestructural e inmunohistoquímica de la muerte de espermatozoides en ratas de 18, 25, 27 y 32 días de nacidas.

78p
2016

ÍNDICE

RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	12
1.-TESTÍCULO.....	12
1.2.- Origen, formación y desarrollo de los testículos.....	13
1.3.- Túbulos seminíferos, espermatogénesis y ciclo del epitelio seminífero.....	14
1.3.1.- Túbulos seminíferos.....	14
1.3.1.1.- Células de Sertoli.....	15
1.3.1.2.- Espermatogénesis.....	16
1.3.2.- Ciclo y onda del epitelio espermatogénico.....	20
1.4.- Histofisiología y esteroidogénesis testicular.....	21
2.- MUERTE CELULAR.....	23
2.1.- Apoptosis.....	23
2.1.1.- Las caspasas.....	23
2.1.2.- Las rutas de la apoptosis.....	26
a).- <i>La ruta extrínseca</i>	27
b).- <i>La ruta intrínseca</i>	27
2.2.- Autofagia.....	29
2.3.- Necrosis.....	32
ANTECEDENTES	33
1.- MUERTE CELULAR EN TESTÍCULO.....	33
2.-MUERTE CELULAR DURANTE LOS PRIMEROS CICLOS ESPERMATOGÉNICOS.....	35
JUSTIFICACIÓN	36
HIPÓTESIS	36
OBJETIVOS	37
1.- OBJETIVOS GENERALES.....	37
2.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	37
MATERIAL Y MÉTODOS	38
1.- MATERIAL BIOLÓGICO.....	38
2.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	38

3.- MICROSCOPIA ÓPTICA.....	39
3.1.- Inmunolocalizaciones de las proteínas caspasa 3 activa, LAMP-1 y LC3.....	39
3.2.- Técnica de TUNEL (<i>TDT-mediated dUTP-biotin Nick end-labeling</i>).....	40
4.- ANÁLISIS DE DATOS.....	40
4.1.- Clasificación características morfológicas e inmunohistoquímicas.....	40
4.2.- Cuantificación de marcas inmunohistoquímicas.....	40
RESULTADOS.....	41
18 DÍAS.....	41
Características generales del túbulo.....	41
Características morfológicas iniciales del proceso de eliminación celular.....	41
Características morfológicas tardías del proceso de eliminación celular.....	42
Características inmunohistoquímicas.....	42
25 DÍAS.....	50
Características generales del túbulo.....	50
Características morfológicas del proceso de eliminación celular.....	50
Características inmunohistoquímicas.....	50
27 DÍAS.....	55
Características generales del túbulo.....	55
Características morfológicas del proceso de eliminación celular.....	55
Características inmunohistoquímicas.....	55
32 DÍAS.....	60
Características generales del túbulo.....	60
Características morfológicas del proceso de eliminación celular.....	60
Características inmunohistoquímicas.....	60
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	65
Clasificación de las características morfológicas e inmunohistoquímicas.....	65
Cuantificación de las marcas inmunohistoquímicas.....	66
DISCUSIÓN.....	69
CONCLUSIONES.....	73
REFERENCIAS.....	74

Resumen

Durante los primeros ciclos espermatogénicos las células que no tienen las condiciones necesarias para desarrollarse hasta la etapa de espermatozoide, y son descartadas. La presencia de cuerpos apoptóticos y DNA fragmentado, indican que la apoptosis es la ruta de eliminación celular que mantiene la homeostasis dentro de los tubos seminíferos.

Se sabe que existen otros tipos de muerte celular como la autofagia y la necrosis, que poseen características morfológicas y bioquímicas diferentes a los de la apoptosis.

En el presente trabajo se evaluaron los aspectos morfológicos, ultraestructurales e inmunohistoquímicos de los espermatocitos durante la muerte en ratas prepúberes. Se utilizaron testículos de organismos de 18, 25, 27 y 32 días de nacidos. El tejido se procesó con las técnicas estándar para microscopía óptica y para microscopía electrónica. A nivel de microscopía óptica se realizaron inmunolocalizaciones para identificar el proceso de apoptosis, así como al de autofagia. Se detectó a la caspasa-3 activa y se desarrolló la técnica de TUNEL para apoptosis; para autofagia se inmunodetectaron las proteínas LC3 y Lamp-1. El material procesado para microscopía electrónica se cortó y se contrastó con acetato de uranilo (4%) y citrato de plomo (0.035%), lo que permitió describir las características ultraestructurales de las células de los cordones y túbulos seminíferos de las diferentes edades estudiadas. Finalmente, se hizo un análisis cuantitativo de la incidencia de muerte celular por edad considerando el cociente obtenido de las células marcadas en cada una de las inmunolocalizaciones, entre el número total de células presentes en un corte transversal de cordón o túbulo seminífero.

Los resultados del análisis inmunohistoquímico del presente trabajo, evidenciaron que los espermatocitos primarios en etapas de cigoteno-paquiteno, presentaron características iniciales (activación de caspasa-3) y tardías del proceso de apoptosis (fragmentación de DNA). Las observaciones ultraestructurales permitieron identificar de forma específica que los espermatocitos presentan alteraciones iniciales del proceso de eliminación desde la etapa de cigoteno, característica que no había sido descrita para ratas Wistar. Las alteraciones iniciales incluyen una separación entre las células, mitocondrias con dilatación de las crestas mitocondriales y pérdida de la membrana interna de la envoltura nuclear; las fases finales del proceso de eliminación se caracterizan por una fuerte compactación de la cromatina y la presencia de cuerpos apoptóticos. Otro aspecto importante observado a nivel ultraestructural, fue una gran cantidad de vesículas autofágicas presentes en las células de Sertoli, producto de la fagocitosis de los restos celulares de los espermatocitos eliminados.

La evaluación morfológica e inmunohistoquímica de la muerte celular en los espermatocitos de los túbulos seminíferos de ratas prepúberes, indican que durante los primeros ciclos espermatogénicos del epitelio seminífero la muerte celular se lleva a cabo por apoptosis y la muerte por autofagia ocurre como un proceso fisiológico basal en estas células.

ABSTRACT

In the course of the first spermatogenic cycles the cells that are not capable to reach the mature phase are eliminated. The presence of apoptotic bodies as well as fragmented DNA, are revealing that apoptosis is the cell death route responsible by means the cellular homeostasis inside of the seminiferous tubules is preserved.

Recent studies indicate that there is other type of cell death process besides the known apoptosis and necrosis; this is autophagy which has morphological and biochemical characteristics different to the apoptosis process.

In this work, the morphological, ultrastructural and immunohistochemical aspects of sperm death in pre-pubertal rats were evaluated. Rat testis of 18, 25, 27 and 32 days old were studied. The biological material was processed by means of electron microscopy and light microscopy standard techniques. The identification of both processes apoptosis and autophagy was made to the light microscopy level. To identify apoptosis we performed IHC against active caspase-3 and TUNEL techniques were development. To identify autophagy, LC3 and Lamp-1 proteins were immunodetected. The processed electron microscopy material was cut, and contrasted with uranyl acetate (4%) and lead citrate (0.035%); this technique allowed identifying the ultrastructural features of the cells from both seminiferous cords and tubules, of the different studied stages. Finally, a quantitative analysis of cell death incidence was made to each age by means of the ratio between the cells positive to the cell death labels and the total cells presents in a seminiferous cord/tubule transversal cut.

The immunohistochemical results showed primary spermatocytes in zygotene-pachytene stages with initial apoptotic characteristics (activation of caspase-3) and late apoptotic characteristics (DNA fragmentation). The ultrastructural observations allowed identifying in a detailed manner that the spermatocytes have initial alterations since the zygotene stage; this feature had not been described in Wistar rats. Initial alterations include a separation between cells, mitochondrial cisterns dilated, and loss of portions of the inner nuclear envelope; the final stage of the removal process is characterized by chromatin highly compacted, and the presence of apoptotic bodies. Another important aspect observed at the ultrastructural level, was the presence of several autophagic vesicles in Sertoli cells, as a consequence of the phagocytosis to clearance the cell debris of the eliminated spermatocytes.

The morphological and immunohistochemical evaluation of the cell death in spermatocytes in the seminiferous cords/tubules of pre-pubertal rats, indicate that during the first cycle spermatogenic of seminiferous epithelium, the cell death is carried out by apoptosis, and the autophagy is performed as a basal physiological process in these cells.

INTRODUCCIÓN

1.- Testículo

En los mamíferos, los testículos son órganos ovoides pares que están dentro del escroto fuera de la cavidad abdominal, suspendidos de los cordones espermáticos y adheridos al escroto por los ligamentos escrotales. Las dos funciones primarias de los testículos son la producción de gametos masculinos o espermatozoides (espermatogénesis) y la síntesis de hormonas sexuales masculinas o andrógenos (esteroidogénesis).

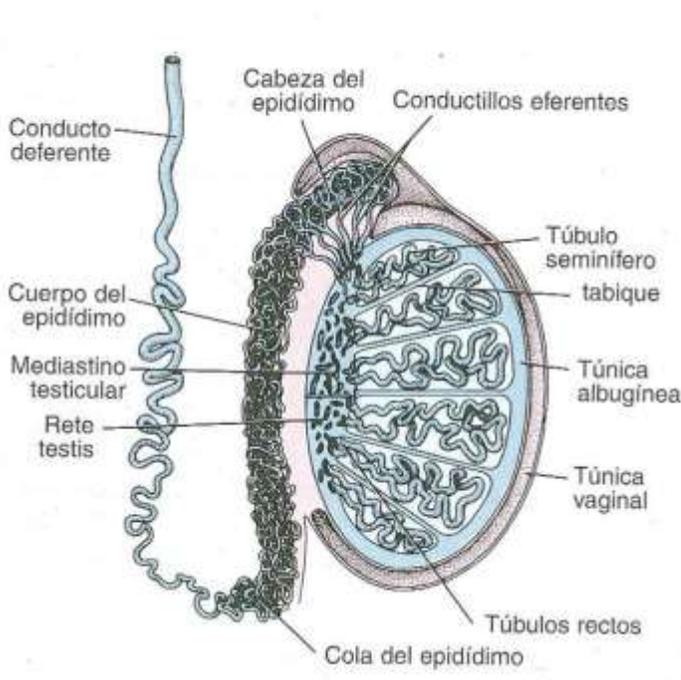


Figura 1.- Estructura de testículo. En el esquema se muestran la estructura testicular, los conductos eferentes, el epidídimo y el conducto eferente (Tomado de Dym et al., 1995).

Cada testículo está rodeado por una cápsula de tejido conectivo denso, irregular, fibroso, con alta cantidad de colágeno, conocido como túnica albugínea, profunda a esta capa se encuentra la túnica vascular, un tejido laxo que forma la cápsula del testículo. La superficie posterior de la túnica albugínea está un poco engrosada y forma el mediastino testicular, del cual irradian tabiques de tejido conectivo que subdividen cada testículo, formando compartimentos intercomunicados que se conocen como lóbulos testiculares. Cada lóbulo testicular está formado por túbulos seminíferos con terminación ciega, rodeados por un tejido conectivo muy vascularizado y con una innervación abundante. En este tejido conectivo se encuentran dispersas pequeñas aglomeraciones de células endocrinas, las células intersticiales o de Leydig, las cuales son células grandes poliédricas que contienen inclusiones lipídicas, encargadas principalmente de la secreción de esteroides (Figura1).

Los espermatozoides se producen en el epitelio seminífero de los túbulos seminíferos, y pasan a través del extremo abierto de cada túbulo seminífero, a los túbulos rectos y posteriormente a la red testicular o *rete testis*. Los espermatozoides salen de la red testicular a través de los conductos eferentes que se fusionan con el epidídimo.

La vascularización de cada testículo deriva de la arteria testicular, la cual es una rama directa que desciende de la aorta abdominal al escroto en compañía del conducto deferente para constituir los elementos vasculares intratesticulares. Los lechos capilares de los testículos se reúnen en varias venas que forman el plexo venoso pampiniforme, que envuelven la arteria testicular y transportan la sangre desde los testículos hacia las venas abdominales. Esta distribución permite el intercambio de calor entre los vasos sanguíneos y contribuye a mantener a los testículos a una temperatura más baja con respecto a la temperatura sistémica (Gartner & Hiatt, 2002; Ross et al., 2005).

1.2.- Origen, formación y desarrollo de los testículos

El sexo gonadal está determinado por el gen *SRY* en mamíferos que se haya situado en la región determinante sexual en el brazo corto del cromosoma Y, este gen codifica una proteína específica que se une al ADN, llamada TDF (*testicular determinant factor*) que es la causa directa del desarrollo y la diferenciación testicular.

Los andrógenos, sobre todo la testosterona, son indispensables para adquirir el fenotipo masculino y son la causa del dimorfismo sexual (Ross et al., 2005).

Durante la embriogénesis, los testículos se desarrollan retroperitonealmente en la pared posterior de la cavidad abdominal. Conforme descienden al escroto llevan consigo una porción del peritoneo. Ésta evaginación peritoneal, forma una cavidad serosa que rodea de manera parcial la superficie antero-externa de cada testículo y ello le permite cierto grado de movilidad dentro de su compartimiento en el escroto (Gartner & Hiatt, 2002).

Los testículos derivan del mesoderma intermedio que forma las crestas urogenitales en la pared abdominal posterior, del epitelio celómico que tapiza las crestas urogenitales y de las células germinales primordiales que migran desde el saco vitelino hacia las gónadas en desarrollo, donde se dividen y diferencian en espermatogonias.

La migración de las células germinales primordiales hasta el sitio de formación de las gónadas, induce la proliferación de las células mesodérmicas de las crestas urogenitales y las células del mesotelio celómico, para que se desarrollen los cordones sexuales primitivos, que más tarde se diferencian en los cordones testiculares que dan origen a los túbulos seminíferos, los túbulos rectos y la *rete de testis*.

En la primera etapa del desarrollo, los testículos aparecen en la pared abdominal posterior como primordios indiferenciados que son idénticos en ambos sexos. Al

principio de la embriogénesis masculina, el mesénquima que separa los cordones testiculares da origen a células de Leydig, las cuales producen testosterona para estimular el desarrollo del primordio indiferente en un testículo.

El desarrollo y la diferenciación de los genitales externos ocurren al mismo tiempo y son causados por la acción de la dihidrotestosterona (DHT). La aparición de la testosterona, el factor inhibidor Mülleriano (MIF) y de la dihidrotestosterona (DHT) en el embrión masculino durante el desarrollo determinan su sexo por inducción hormonal (Figura 2).

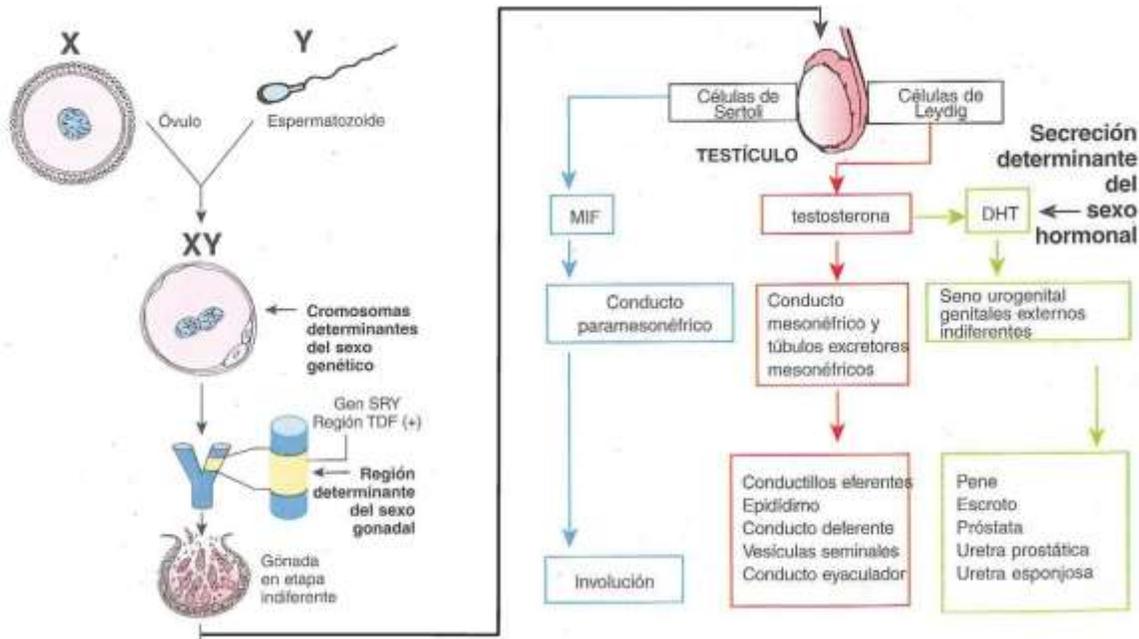


Figura 2. Desarrollo del testículo y su influencia hormonal (Modificado de Ross et al. 2005).

Los testículos descienden desde el abdomen hacia el escroto, esta migración está dada por el crecimiento diferencial de la cavidad abdominal combinado con la acción de la testosterona que causa el acortamiento del *gubernaculum testis*, que es un ligamento sensible a la testosterona que conecta el polo inferior de cada testículo con los pliegues escrotales. Los testículos descienden hacia el escroto a través del conducto inguinal, una estrecha comunicación entre la cavidad abdominal y el interior de las bolsas. El descenso testicular a veces está obstruido y conduce a una patología conocida como criptorquidia, la cual puede inducir alteraciones histológicas irreversibles en el testículo y aumenta el riesgo de padecer cáncer testicular (Ross et al., 2005).

1.3.- Túbulos seminíferos, espermatogénesis y ciclo del epitelio seminífero.

1.3.1.- Túbulos seminíferos

Los túbulos seminíferos son túbulos huecos contorneados, rodeados por lechos capilares. Están compuestos por una capa de tejido conectivo delgado y un epitelio seminífero, y se encuentran separados por una membrana basal bien desarrollada.

En los roedores, la capa de tejido conjuntivo consiste en una sola capa de células mioideas pavimentadas que adoptan una disposición epitelioide. A nivel ultraestructural estas células presentan características asociadas con las células musculares lisas.

El epitelio seminífero es un epitelio estratificado complejo y poco habitual que tiene varias capas celulares de grosor y está compuesto por dos poblaciones celulares: las células espermatogénicas y las células de Sertoli, las primeras se encuentran en diversas etapas de maduración (Gartner & Hiatt, 2002; Ross et al., 2005).

1.3.1.1.- Células de Sertoli.

Las células de Sertoli, actúan como células de sostén de los espermatozoides en desarrollo, se adhieren directamente a su superficie y actúan como células “nodrizas”, es decir, intervienen en el intercambio de sustratos y desechos metabólicos entre las células espermatogénicas en desarrollo y el sistema circulatorio. Además, se encargan de fagocitar y degradar los cuerpos residuales que se forman en la última etapa de la espermiogénesis y las células en proceso de muerte.

Las células de Sertoli son células cilíndricas, cuyas membranas celulares poseen plegamientos complejos. Estas células tienen prolongaciones apicales y laterales extensas que rodean las células espermatogénicas contiguas y ocupan los espacios entre ellas y se proyectan hasta la luz de los túbulos seminíferos. Estas células no se dividen hasta después de la pubertad y están apoyadas sobre la membrana basal del epitelio seminífero multiestratificado.

Las células de Sertoli contienen un retículo endoplásmico (RE) liso extenso, un retículo endoplásmico (RE) rugoso bien desarrollado y pilas o dímeros de laminillas anulares. Poseen muchas mitocondrias esféricas y alargadas, un aparato de Golgi bien desarrollado, inclusiones lipídicas, numerosas vesículas y lisosomas que pertenecen al complejo endolisosómico, y cantidades variables de microtúbulos y filamentos que rodean el núcleo, lo separan de los organelos citoplasmáticos, y proporcionan apoyo estructural para los gametos en desarrollo. Estas células presentan en su citoplasma productos de inclusión conocidos como cristales de Charcot- Böttcher, cuya composición y función se desconocen.

La célula de Sertoli tiene un núcleo ovoide, cuya ubicación dentro de la célula varía dependiendo de la especie. En algunas especies, el núcleo contiene un nucleolo formado por una estructura tripartita, una estructura central y cariosomas en los flancos.

Las células de Sertoli forman complejos de uniones celulares que se pueden dar entre Sertoli- Sertoli, uniones estrechas, entre Sertoli- célula espermatogénica, desmosomas, y entre Sertoli y lámina basal, hemidesmosomas.

Los complejos de unión que forman las células de Sertoli entre sí, estructuran la barrera hematotesticular, que se caracteriza por formar uniones herméticas (zona *occludens*) que divide al epitelio seminífero en dos compartimientos, el compartimiento basal y el compartimiento adluminal. Las espermatogonias y espermatocitos primarios iniciales están restringidos al compartimiento basal; los espermatocitos en desarrollo, espermátidas y espermatozoides están restringidos al compartimiento adluminal, donde ocurren los procesos de meiosis y espermiogénesis. (Gartner & Hiatt, 2002; Ross et al., 2005; Russel et al., 1990).

1.3.1.2- Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso dinámico altamente sincronizado que implica una serie de pasos de división y diferenciación eficientes con altas tasas de recuperación (Royere et al., 2004).

La mayoría de las células que componen el epitelio seminífero son células espermatogénicas en diversas etapas de maduración. Estas células derivan de las células germinales primordiales, las cuales se originan en el saco vitelino y migran a las crestas gonadales durante la etapa inicial del desarrollo de los testículos.

Los procesos de división mitótica y meiótica de las células espermatogénicas se organizan e intercalan en capas celulares entre las células de Sertoli contiguas. Al proceso en el cual una espermatogonia forma un espermatozoide es conocido como espermatogénesis, y puede ser dividido en tres fases: la fase proliferativa, la fase meiótica, y la fase de diferenciación o fase espermiogénica.

La fase proliferativa está representada por células espermatogénicas inmaduras, las cuales son llamadas espermatogonias y son pequeñas células germinales diploides, localizadas en el compartimiento basal de los túbulos, apoyadas sobre la lámina basal. Las espermatogonias sufren múltiples divisiones mitóticas y generan una progenie espermatogónica que muestra diferencias en el aspecto nuclear. Dependiendo de la apariencia del núcleo se clasifican en espermatogonias tipo A, espermatogonias intermedias y espermatogonias tipo B.

Las espermatogonias tipo A tienen dos principales funciones, las de reserva y de proliferación celular. Muchas de éstas espermatogonias tipo A funcionan como “células madre”, células de reserva en el túbulo seminífero, cuya función es generar y regenerar células espermatógenas dentro del túbulo seminífero. Las espermatogonias durante la proliferación, muestran una tasa mitótica alta. Sus divisiones son altamente sincronizadas, debido a que las células espermatógenas tienen una división nuclear (cariocinesis) acompañada de una citocinesis modificada durante la mitosis y

la meiosis de los espermatoцитos. A medida que cada célula se divide para formar dos células, va formando un puente citoplasmático que las conserva unidas entre sí hasta el final del desarrollo.

Las espermatogonias A dan origen a las espermatogonias intermedias por división mitótica, y posteriormente se dividen para dar origen a las espermatogonias tipo B. Las principales diferencias entre los tres tipos de espermatogonias son la ubicación de la cromatina dentro del núcleo y la ubicación dentro del epitelio seminífero. Al final de la etapa proliferativa, las espermatogonias tipo B se dividen por mitosis para originar espermatoцитos primarios jóvenes (Figura 3).

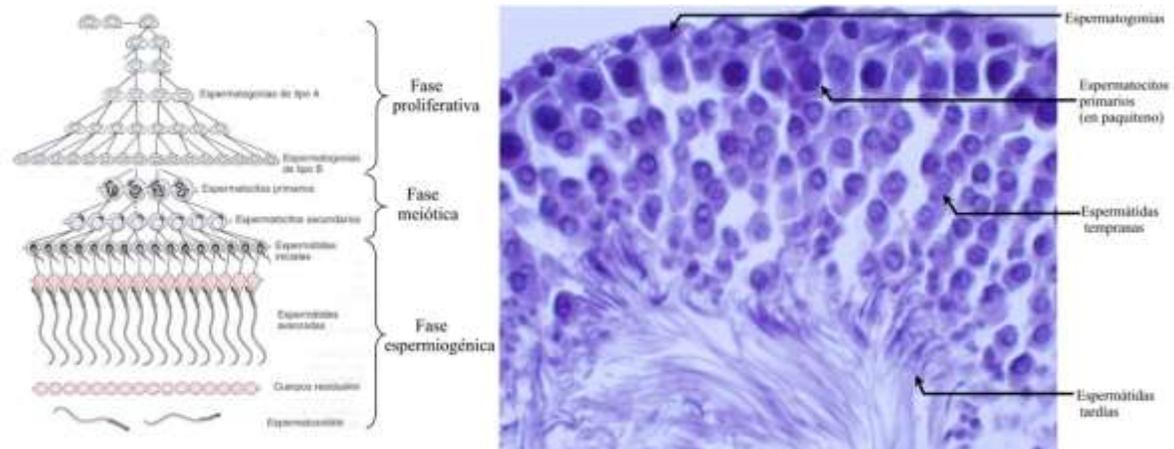


Figura 3.- Espermatogénesis. En el esquema se muestran las fases de la espermatogénesis y los tipos celulares que las conforman (Modificado de Bloom & Fawcett, 1995), y en la fotomicrografía se observa la distribución celular en el túbulo seminífero.

Los espermatoцитos primarios son las células más grandes del epitelio seminífero y migran del compartimiento basal al adluminal tan pronto como se forman. Estas células migran entre las células de Sertoli adyacentes y forman zonas ocluyentes con las células de Sertoli, en consecuencia ayudan a conservar la integridad de la barrera hematotesticular. Estas células duplican su ADN poco después de formarse y antes de que comience la meiosis, de modo que cada espermatoцитo primario contiene el doble de la cantidad normal de cromosomas ($4n$) y el doble de la cantidad de ADN.

A partir de la meiosis se obtiene una reducción en la cantidad de cromosomas, generando células haploides. La división meiótica está constituida por dos etapas, meiosis I y meiosis II; y en cada etapa pueden distinguirse 4 fases: Profase, metafase, anafase y telofase. La profase meiótica I es la etapa más larga y compleja, y es en la que ocurre el apareamiento de los cromosomas homólogos. Esta etapa se subdivide en las etapas de leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno, y diacinesis. Estas etapas tienen una fase de preparación posterior a la división de la espermatogonia B que es conocida como preleptoteno.

Las células en preleptoteno son morfológicamente similares a las espermatogonias B, excepto que son ligeramente más pequeñas y tienen menos cromatina adosada a la envoltura nuclear. Estas células entran en la profase meiótica I, y progresivamente van aumentando de tamaño. Los cambios en la condensación de la cromatina y otros cambios nucleares son la base para la diferenciación y subdivisión de los espermatocitos durante la profase meiótica (Gartner & Hiatt, 2002; Ross et al., 2005; Russel et al., 1990).

En la primera fase de la profase meiótica I, el leptoteno, el núcleo pierde gradualmente su cromatina periférica y forma finos hilos de cromatina que pueden ser vistos a través del microscopio. Estas estructuras en forma de hilos son los cromosomas condensados que permanecen desapareados.

En las células en cigoteno, los cromosomas homólogos comienzan el apareamiento. El aparato de apareamiento en el núcleo es llamado complejo sinaptonémico, el cual es una estructura tripartita elongada que sólo es reconocible en el microscopio electrónico, compuesta por dos elementos laterales y un elemento central. En esta etapa los filamentos de los cromosomas aparecen más gruesos en el núcleo están vinculados a lo largo del complejo sinaptonémico.

Cuando los cromosomas se han apareado completamente, las células han pasado del estadio de cigoteno a paquitenio. Este estadio es el de mayor duración en la profase meiótica. En éste periodo ocurre la recombinación genética y el entrecruzamiento, permitiendo una diferente combinación del material genético. Estas células son de mayor tamaño, son alargadas, presentan complejos sinaptonémicos y un complejo XY desarrollado cerca del nucleolo celular.

La fase de diploteno de la meiosis en el macho es breve. Durante ésta fase el complejo sinaptonémico desaparece, permitiendo que los cromosomas apareados se separen, excepto en las regiones de los quiasmas. El diploteno se reconoce por sus separaciones cromosómicas en diferentes fases, es difícil de reconocer en cortes histológicos. El diploteno es la culminación de la profase meiótica I. Al acabar esta etapa, se comienzan a desarrollar las demás fases del proceso meiótico I: Metafase, anafase y telofase.

Durante la metafase los cromosomas son alineados en la placa ecuatorial, en la anafase son divididos y en la telofase los cromosomas homólogos son enviados hacia polos opuestos del huso meiótico. Las tétradas que fueron modificadas por la recombinación génica son separadas para convertirse en diadas de nuevo. Este proceso ocurre muy rápidamente para completar la primera división meiótica. Las células derivadas de la primera división meiótica reciben el nombre de espermatocitos secundarios, son células pequeñas que entran en un segundo proceso de división muy rápidamente, por lo que permanecen poco tiempo en este estadio. Estas células se encuentran en una pequeña fracción del túbulo y se caracterizan por un núcleo

redondo y por ser 40 % más grandes que las espermatidas, con quienes comparten un gran parecido morfológico y nuclear en las primeras etapas del desarrollo de las espermatidas. Los espermátocitos secundarios que entran en meiosis II pueden ser distinguidos de los espermátocitos que entran en Meiosis I principalmente por su tamaño, ya que los que entran en meiosis II son relativamente más pequeños. Estas células entran de inmediato en la profase de la segunda división meiótica sin pasar por una fase de síntesis (fase S).

Durante la metafase de la segunda división meiótica, los cromosomas se alinean sobre la placa ecuatorial y las cromátidas hermanas se separan y avanzan hacia los polos del huso meiótico. Todas las fases de la meiosis II (profase II, metafase II, anafase II y telofase II) son breves y dan como resultado la producción de dos células haploides, por cada espermátocito secundario. Estas células son llamadas espermatidas.

Las espermatidas resultantes no experimentan divisiones adicionales y comienzan un proceso de diferenciación que produce espermatozoides maduros. A este proceso de remodelación y diferenciación celular de las espermatidas se le conoce como espermiogénesis. Los cambios morfológicos que ocurren durante la espermiogénesis se pueden dividir en cuatro fases: De Golgi, de casquete, de acrosoma y de maduración.

La fase de Golgi se caracteriza por la presencia de gránulos proacrosómicos, con una gran cantidad de glucoproteínas que confluyen en una vesícula limitada por una membrana contigua a la envoltura nuclear, llamada vesícula acrosómica. La vesícula aumenta de tamaño durante esta fase, y su posición de la vesícula determina el polo anterior del espermatozoide en desarrollo. Durante esta fase los centriolos migran desde la región yuxtannuclear hacia el polo posterior de la espermatida, donde el centriolo maduro se alinea perpendicularmente a la membrana plasmática. El centriolo inicia el armado de los nueve dobletes de microtubulares periféricos y de los dos microtúbulos centrales que forman el axonema de la cola del espermatozoide (Gartner & Hiatt, 2002; Ross et al., 2005; Russel et al., 1990).

En la fase de casquete, la vesícula acrosómica se extiende sobre toda la mitad anterior del núcleo, cambiando su nombre a casquete. La porción de la envoltura nuclear que está debajo del casquete acrosómico pierde sus poros y sufre un engrosamiento, mientras el contenido nuclear se condensa.

En la fase de acrosoma, la espermatida se reorienta de modo que la cabeza hunde profundamente en la célula de Sertoli y se orienta hacia la lámina basal, y el flagelo en desarrollo se extiende hacia la luz del túbulo seminífero. El núcleo condensado de la espermatida se aplanan, se alarga, y desplaza el citoplasma hacia la parte posterior. Los microtúbulos se organizan en una vaina cilíndrica y se extienden desde el borde posterior del acrosoma hacia el polo posterior de la espermatida. Los centriolos que habían iniciado el desarrollo del flagelo, retornan a la superficie posterior del núcleo, donde el centriolo inmaduro se adhiere a un surco poco profundo del núcleo. Después

son modificados para formar la pieza de conexión o región del cuello del espermatozoide en desarrollo. Mientras, la membrana plasmática se mueve hacia la parte posterior para cubrir el flagelo en crecimiento, las mitocondrias migran desde el resto del citoplasma para formar una vaina helicoidal que rodea las fibras gruesas en la región del cuello.

En la fase de maduración (la última fase de la espermiogénesis) la espermátida reduce el exceso de citoplasma en una estructura llamada cuerpo residual, en donde quedan los puentes intercelulares. Este exceso de citoplasma es fagocitado por las células de Sertoli, y los espermatozoides se separan y se liberan de las células de Sertoli hacia la luz del túbulo seminífero.

Los espermatozoides recién formados son inmóviles y no pueden fecundar un ovocito, hasta que adquieran movilidad tras su paso por el epidídimo (Gartner & Hiatt, 2002; Ross et al., 2005; Russel et al., 1990).

1.3.2.-Ciclo y onda del epitelio espermatogénico

El ciclo espermatogénico se define como el tiempo necesario para el desarrollo completo de una espermatogonia hasta la formación de un espermatozoide. Asimismo, las células espermatogénicas en diferenciación no están distribuidas al azar en el epitelio seminífero; están asociadas en grupos celulares específicos que forman diferentes estadios cíclicos a lo largo del túbulo seminífero. Durante el proceso de diferenciación estas fases ocurren en forma secuencial y sincrónica en cualquier sitio del túbulo.

A cada asociación celular se le considera un estadio, y cada serie de estadios que hay entre dos apariciones sucesivas del mismo patrón de asociación celular se le considera un ciclo del epitelio seminífero. Por otro lado, la onda del epitelio seminífero describe la distribución de los patrones de asociaciones celulares en toda la longitud del túbulo (Gartner & Hiatt, 2002; Ross et al., 2005; Russel et al., 1990).

El ciclo espermatogénico de la rata se ha clasificado en 14 estadios, cada estadio basado principalmente en los cambios del acrosoma y la morfología de la cabeza de las espermátidas jóvenes. Los límites entre cada estadio no son claros (Figura 4). Estas asociaciones celulares se observan claramente hasta la etapa adulta de la rata, ya que en etapas anteriores no se encuentran todos los tipos celulares, ni se encuentra completamente desarrollado el epitelio seminífero.

Durante las primeras 6 semanas de nacimiento ocurre la primera onda espermatogénica en la rata. Durante los primeros días los cordones seminíferos solamente tienen espermatogonias A primitivas con células de Sertoli irregulares. Estas espermatogonias se van desarrollando y dividiendo durante los primeros 12 días, donde aparecen los primeros espermatoцитos primarios, los cuales se encuentran en la etapa de cigoteno hasta el día 14 y no se observan en paquiteno temprano hasta

después del día 15. Los espermatoцитos secundarios y las espermátidas no aparecen hasta después del día 27. En cuanto a la formación de la luz del túbulo ocurre hasta el día 16 después de haber nacido. Posteriormente termina la primera onda espermatogénica alrededor de los 32 días y empieza la madurez sexual (Russel et al., 1990; Roosen-Runge, 1950; Clermont, 1957; Leblond, 1952, Rodriguez et al., 1997).

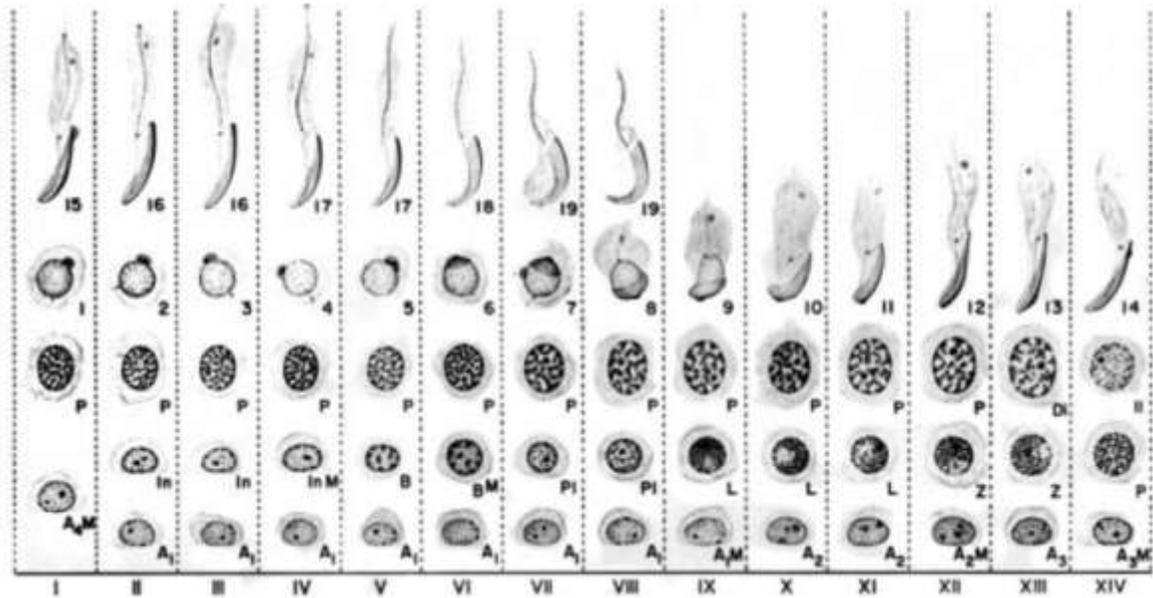


Figura 4.- Ciclo del epitelio seminífero en rata. Cada columna corresponde a un estadio de los 14 que tiene la rata adulta (Tomado de Russel et al., 1990).

1.4.- Histofisiología y esteroidogénesis testicular

La principal función esteroidogénica del testículo es la síntesis y secreción de testosterona, la cual está regulada por la interacción hormonal del hipotálamo, el lóbulo anterior de la hipófisis y las células gonadales, en específico células de Sertoli y células de Leydig. La hipófisis, bajo la estimulación del hipotálamo, produce dos hormonas glucoprotéicas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH), que modulan la síntesis de testosterona.

La primera etapa en la vía de síntesis de testosterona es sensible a LH, la cual se une a los receptores de las células de Leydig, que interactúan con proteínas G y activan la adenilil-ciclase para formar e incrementar la cantidad de adenosín monofosfato cíclico (AMPC). El aumento de AMPC induce la activación de esterasas, las cuales segmentan colesterol libre de las gotitas lipídicas intracelulares. Posteriormente, la desmolasa de colesterol convierte el colesterol libre en pregnenolona, la cual puede entrar en dos posibles rutas de síntesis de testosterona que utilizan las células de Leydig, la ruta depende de la especie. La vía de la $\Delta 4$ es la ruta en la que se forma colesterol – pregnenolona – progesterona - androstenediona y por último testosterona, la cual es la ruta más encontrada en roedores, incluyendo la rata y el ratón. La vía de la $\Delta 5$ en la

que se forma colesterol – pregnenolona - 17 α -hidroxipregnenolona – dehidroepiandrosterona – androstenediona - testosterona, que es una ruta encontrada mayormente en perros, humanos, cerdos, y primates superiores. Los diversos productos de la vía de síntesis son lanzados entre el retículo endoplásmico liso y las mitocondrias hasta que es formada y liberada la testosterona al medio.

La testosterona por sí misma tiene poca acción biológica directa, primero requiere la conversión por la 5 α -reductasa en dihidrotestosterona. Casi toda la testosterona es producida por el testículo; menos el 5% que proviene de las glándulas suprarrenales. La testosterona abandona las células de Leydig y se incorpora a los capilares sanguíneos y linfáticos o atraviesa el tejido peritubular para llegar al epitelio seminífero (Gartner & Hiatt, 2002; Ross et al., 2005; Russel et al., 1990; Stocco & Mc Phaul, 2006).

Para la proliferación y diferenciación de las células espermatogénicas son necesarias concentraciones locales elevadas de testosterona y puesto que las concentraciones sanguíneas de testosterona no son suficientes para iniciar y conservar la espermatogénesis, La FSH induce a las células de Sertoli para que sintetizen y liberen proteína fijadora de andrógeno (ABP), que se une a la testosterona e impide que la hormona salga de la región del túbulo seminífero e incrementa sus concentraciones locales lo suficiente para sostener la espermatogénesis. Si las concentraciones de testosterona aumentan, inhiben la liberación de LH, en tanto que las concentraciones de FSH pueden suprimirse por la hormona inhibina que producen las células de Sertoli.

La concentración periférica de testosterona, que es mucho menor influye sobre los siguientes fenómenos:

- Diferenciación del sistema nervioso central y del aparato genital (gónadas y vías espermáticas).
- Desarrollo y mantenimiento de las características sexuales secundarias.
- Desarrollo y mantenimiento de las glándulas sexuales anexas (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbo uretrales), vías espermáticas y genitales externos.
- Procesos anabólicos y metabólicos generales, incluidos el crecimiento del esqueleto, el desarrollo del músculo esquelético, la distribución del tejido adiposo subcutáneo y la función renal.
- Conducta, incluido el deseo sexual.

Para el mantenimiento y desarrollo del testículo, las células de Sertoli no solamente están a cargo de la síntesis de ABP y de la inhibina, también llevan a cabo diversas

funciones fisiológicas, entre las que se encuentran la síntesis de una serie de macromoléculas vitales para el desarrollo y mantenimiento del testículo, como la hormona anti-Mülleriana, que suprime la formación del conducto Mülleriano y establece la masculinidad en el embrión en desarrollo; la producción de un medio rico en fructosa y transferrina testicular, las cuales son necesarias para nutrir y transportar los espermatozoides recién formados de la luz del túbulo seminífero a los conductos genitales extratesticulares (Gartner & Hiatt, 2002; Ross et al., 2005; Russel et al., 1990; Stocco & Mc Phaul, 2006).

2.- Muerte celular

La muerte celular es un proceso de eliminación de células fisiológico fundamental involucrado en el balance y control entre la proliferación y la diferenciación durante el desarrollo embrionario y para la regulación de la homeostasis celular en diferentes tejidos en la fase adulta. Es un proceso que se lleva a cabo durante cualquier etapa del ciclo celular y puede ser desencadenada por señales internas o externas (Kerr et al., 1972; Escobar et al., 2011).

Se han descrito 3 tipos principales de muerte celular: Apoptosis o muerte celular tipo I, autofagia o muerte celular tipo II y necrosis o muerte celular tipo III. Muchos estudios han demostrado que estos tres tipos diferentes de muerte celular están bioquímicamente interconectados, y que la activación o inhibición de uno de ellos, puede conducir a una activación sinérgica o diferencial (Bustamante et al., 2012).

2.1.-Apoptosis

La apoptosis, o muerte celular programada tipo I es un proceso caracterizado morfológicamente por el encogimiento general del volumen celular, la pérdida de adhesión a las células contiguas, la condensación y la fragmentación de la cromatina evidenciada por un núcleo picnótico, y la formación de fragmentos denominados cuerpos apoptóticos. En este proceso, el ADN se corta en fragmentos, el cual es un proceso dependiente de la activación de ADNasas activadas por caspasa (CADs), que son activadas al separarse de su proteína inhibidora, el cual es un paso fundamental para iniciar la muerte celular por apoptosis. Se caracteriza bioquímicamente por la pérdida de la simetría de la membrana plasmática, la cual provoca la externalización de la fosfatidilserina, y la permeabilización de la mitocondria, la cual es un organelo importante en la ejecución de la apoptosis (Kerr et al., 1972; Escobar et al., 2011).

2.1.1.- Las caspasas

Las caspasas son un grupo distintivo de cisteínproteasas (proteasas con un residuo de cisteína con capacidad catalítica) que se activan en una etapa temprana de la apoptosis y desencadenan la mayoría o todos los cambios observados durante la muerte celular. Estas cisteínproteasas son tetrámeras que se caracterizan por presentar un residuo de cisteína que regula la ruptura de otras proteínas, a través de

la realización de un corte después de un ácido aspártico (Thornberry et al., 1998; Stennicke et al., 1998; Kumar, 2007).

Las caspasas son reguladas a nivel postraducciona para una activación más eficiente, por lo que son sintetizadas como proenzimas inactivas o zimógenos, denominadas procaspasas, que una vez activadas por proteólisis limitada y asociación de subunidades, adquieren su actividad catalítica. Las caspasas inactivas pueden ser sustrato a su vez de las activas, de manera que unas caspasas activan a otras siguiendo un orden jerárquico y en forma de cascada (Thornberry et al., 1998; Salvensen et al., 1997).

Las caspasas tienen 3 regiones que consisten en un prodominio amino terminal, una subunidad grande (p20) con un centro activo (Cys 285), y un extremo carboxilo pequeño de 177 residuos (p10). El prodominio y la subunidad larga están separados por un lugar de corte con Asp y la subunidad grande está separada de la pequeña por uno o dos sitios de corte Asp. La presencia de Asp en los sitios de corte induce su maduración, lo cual es consistente con la capacidad que tienen las caspasas de autoactivarse o de ser activadas por otras caspasas como parte de un sistema de amplificación.

Cada caspasa con un prodominio largo contiene un módulo de interacción proteína-proteína que permite la unión y asociación de sus reguladores. Por ejemplo, las caspasas-8 y -10 contienen un dominio efector de muerte (*death effector domain*, DED), mientras que las caspasas-2 y -9 contienen un dominio de reclutamiento y activación de caspasas (*caspase activation and recruitment*, CARD). Estos dos dominios tienen secuencias distintas, pero se pliegan en una disposición espacial similar que consiste en 6 hélices α antiparalelas (Degterev et al., 2003).

Las caspasas se pueden clasificar de diferentes maneras, según su estructura, su función, o sustrato. Según su función en mamíferos se pueden clasificar en: caspasas proinflamatorias (caspasa-1,-4,-5,-11 y -12); caspasas ejecutoras de muerte (caspasa-3, -6, y -7) y caspasas iniciadoras de muerte (caspasa-2, -8, -9 y -10) y la caspasa-14 está relacionada con la maduración de queratinocitos. De acuerdo a su estructura general se clasifican en caspasas con prodominio largo con CARD (caspasa-1, -2, -4, -5, -9, -11 y -12), caspasas con prodominio corto con DED (caspasa-8 y -10) y caspasas con prodominio corto (caspasa-3, -6, -7 y -14). De acuerdo a la especificidad del sustrato se clasifican en clase I, que son P4 con secuencia óptima: Trp, Glu, His, Asp (caspasa-1, -4 y -5), clase II, que son P4 con secuencia óptima: Leu /Val, Glu, X, Asp, (caspasa-6, -8, -9 y -11), clase III que son P4 con secuencia óptima: Asp, Glu, X, Asp, Val/His, (caspasa -2, -3 y -7) (Figura 5) (Thornberry et al., 1998; Stennicke et al., 1998; Salvensen et al. 1997).

Las caspasas actúan a través de la división de un grupo selecto de proteínas esenciales. Entre los blancos de las caspasas figuran más de una docena de cinasas,

entre las que se encuentra incluida la cinasa de adhesión focal o FAK, la cual interrumpe la adhesión celular, y provoca un desprendimiento de la célula apoptótica de sus vecinas; o pueden inactivar algunas cinasas como la proteín-cinasa B (PKB), la proteín-cinasa C (PKC) y Raf 1 que activadas fosforilan proteínas proapoptóticas como Bax y Bad (Baccarini, 2002; Reyland 2010).

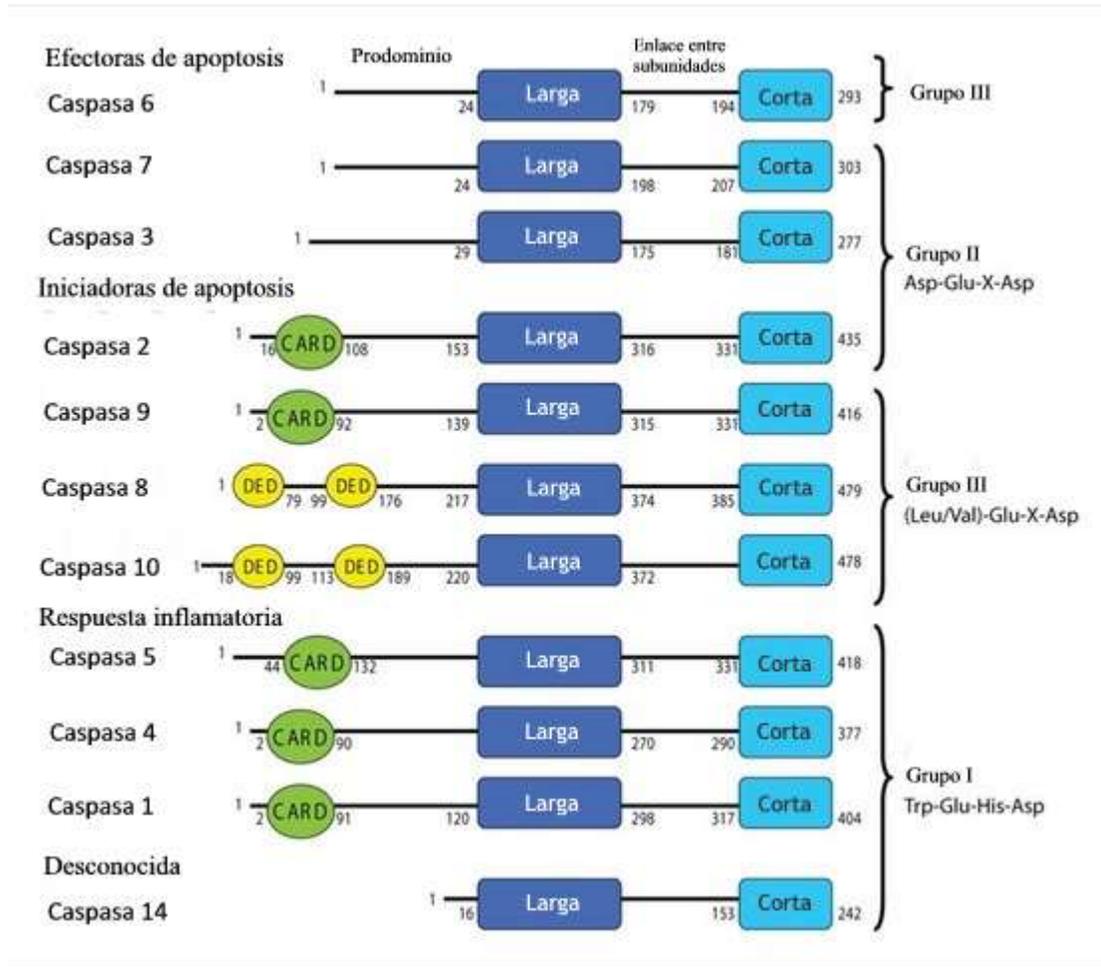


Figura 5.- Clasificación de las caspasas (Modificado de MacKenzie & Clark, 2012).

Otro blanco de las caspasas es la lámina nuclear, la cual está conformada por filamentos intermedios que constituyen el recubrimiento interno de la envoltura nuclear. La lámina organiza el nucleoesqueleto y proporciona la estructura para la unión de la cromatina a la envoltura nuclear. Las caspasas cortan las láminas en un sitio único, desensamblando la polimerización de los filamentos intermedios y las láminas A, B y C, provocando el encogimiento del núcleo (Roseto, 1999).

Las estructuras del citoesqueleto como los microfilamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios también son blancos de las caspasas. En este caso las caspasas se encargan de la degradación de proteínas estructurales como α -actinas,

tubulinas, queratinas y gelsolinas; y proteínas asociadas como Tau, espectrinas, dineínas por ejemplo (Rojas, 2009).

2.1.2.- Las rutas de la apoptosis

La muerte celular puede iniciarse a través de diferentes vías de señalización, que activan la cascada de las caspasas en las células. Actualmente se han descrito varias rutas de señalización que convergen en dos rutas principales: La vía extrínseca y la vía intrínseca. La extrínseca es mediada por receptores de membrana, y la intrínseca involucra la liberación de citocromo C y otros factores de la mitocondria al citoplasma (Figura 6) (Budihardjo, 1999; Creagh et al., 2003; Escobar et al., 2011).

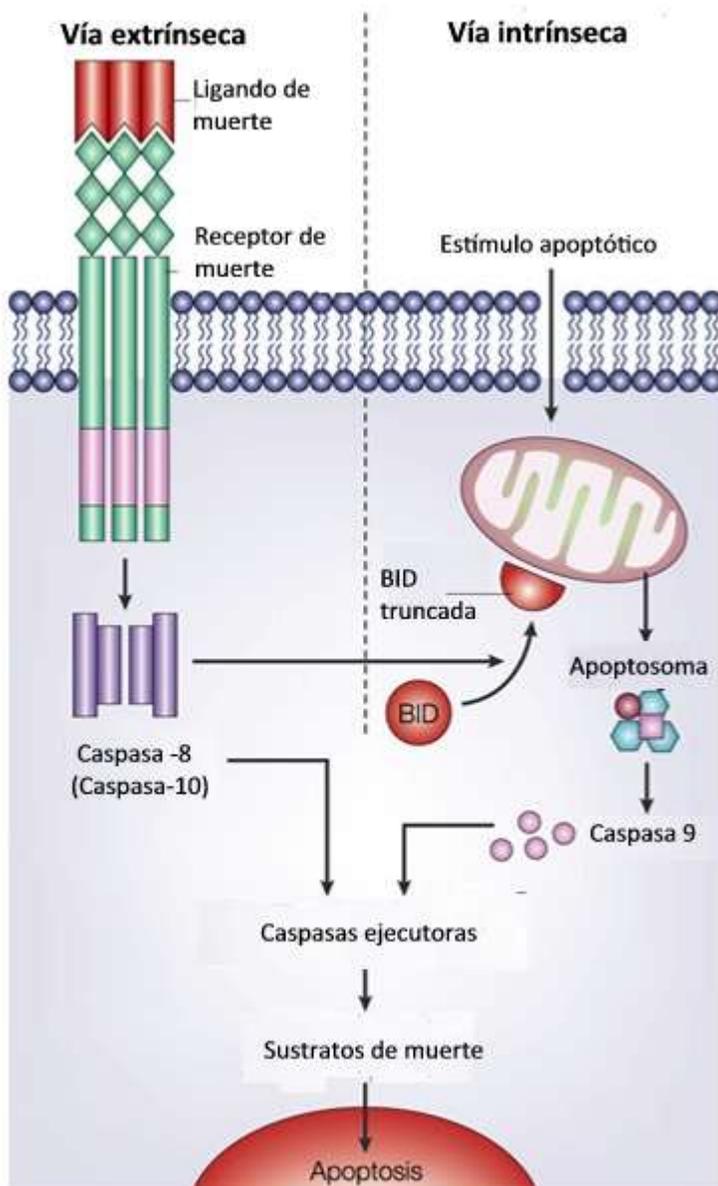


Figura 6.- Rutas de muerte por apoptosis. En el esquema se muestra la activación y desarrollo de las vías intrínseca y extrínseca que llevan a la apoptosis (Modificado de Igney y Krammer, 2002).

a) La ruta extrínseca

La ruta extrínseca es mediada por receptores de membrana y se inicia por la unión de un ligando a su receptor transmembranal que promueve el reclutamiento de proteínas adaptadoras. Los receptores se caracterizan por la presencia de repeticiones múltiples ricas en cisteína en la porción extracelular, y en la región citoplasmática por sitios de interacción conocido como DD (*death domain*) que pueden ser inducidos por un ligando. Los principales dominios de muerte son llamados Fas, también conocidos como Apo1 o CD95 que son dominios principalmente asociados con la superfamilia de receptores de los TNF (*tumor necrosis factor*). Son receptores con un rol central en la regulación fisiológica de la muerte celular y están relacionados en la patogénesis de varios tumores malignos y deficiencias del sistema inmune (Budihardjo, 1999; Creagh et al., 2003).

Una vez inducido el ligando, el receptor genera la formación de un complejo inductor de señalización de muerte o DISC (*death inducing signaling complex*) que contiene múltiples moléculas en las que se incluyen a FADD (*Fas associated death domain*) y a las caspasas-8 o -10. FADD es reclutado al DISC a través de su DD que tiene en su región carboxilo terminal que interactúa con su ligando, y a través de su DED (*death effector domain*) en su región amino terminal con el DED de la caspasa-8 o -10. Las caspasas-8 y -10 son las caspasas iniciadoras en la ruta extrínseca, y una vez activadas pueden disparar la activación de caspasas efectoras, como la caspasa-3 (Escobar et al., 2011; Muzio et al., 1998; Wajant, 2002).

Por otro lado, la ruta extrínseca puede activar la vía mitocondrial. Una vez activadas las caspasas-8 o -10, además de activar otras caspasas, pueden truncar a Bid, una proteína citoplásmica que al activarse provoca la permeación de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo C (Budihardjo, 1999; Creagh et al., 2003; Escobar et al., 2011).

b) La ruta intrínseca

La ruta intrínseca es independiente de receptores de muerte y es inducida por agentes quimioterapéuticos, radiación ultravioleta o especies reactivas de oxígeno. Implica la permeación de la membrana mitocondrial (en la que juegan un papel de regulación importante la familia de proteínas Bcl-2) para liberar proteínas mitocondriales como citocromo C, Omi/Htr2 (serina/proteasa), Smac/diablo, y Aif (*apoptosis inducing factor*). Una vez liberado al citosol, el citocromo C se puede unir con la Apaf-1 (*apoptotic peptidase activating factor-1*) y la caspasa-9 para formar el apoptosoma. Para formar el apoptosoma, el citocromo C se une a la región carboxilo terminal de

Apaf-1, facilitando la asociación de dATP con Apaf-1, exponiendo su amino terminal y su prodominio CARD (*caspase recruitment domain*). Se oligomerizan y se convierten en una plataforma que recluta y activa a la caspasa-9 a través de una interacción CARD-CARD. El apoptosoma amplifica las señales de muerte y hace más eficiente la activación de las caspasas, tanto activadoras como efectoras, además de encargarse de la inhibición de las IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*). Por último, la caspasa-9 se libera del apoptosoma y activa a las caspasas-3, -6 y -7, las cuales provocan la ruptura de diversos sustratos (Adrain et al., 1999; Baliga & Kumar, 2003; Bao & Shi, 2007; Fulda & Debatin, 2006; Gross et al., 1999; Hu et al., 1998; Hu et al., 1999; Creagh et al., 2003; Escobar et al., 2011; Zou et al., 1997).

Algunas proteínas importantes en la vía intrínseca de la apoptosis, además de las caspasas, son las proteínas de la familia Bcl-2 (*B-cell lymphoma/leukemia*), las cuales son proteínas reguladoras de la activación de la apoptosis por la permeación de la membrana mitocondrial. La familia Bcl-2 está constituida por más de 30 miembros y está dividido en tres grupos con base en sus funciones y en su composición, principalmente en sus dominios BH. Todos los miembros de la familia Bcl-2 tienen al menos un miembro conservado de los dominios BH. Las proteínas de la familia Bcl-2 han sido clasificadas en proapoptóticas, antiapoptóticas y BH3 *only* (las cuales por su único dominio BH3 pertenecen a otra clasificación, aunque por su función, sean proapoptóticas).

Los miembros de la familia Bcl-2 proapoptóticas promueven la formación de poros en la membrana mitocondrial externa, que permiten la liberación de las proteínas mitocondriales como el citocromo C y la Smac/diablo. Entre las proteínas que se encuentran en esta clasificación se encuentran Bax (*Bcl-2-associated X protein*), Bak (*Bcl-2 antagonist killer*), Bok (*Bcl-2 ovarian killer*), las cuáles comparten tres dominios BH1, BH2 y BH3).

Los miembros de la familia BH3-*only*, comprenden 12 miembros, los cuales se encargan de promover la activación de las proteínas pro-apoptóticas como Bax o Bad y de secuestrar o neutralizar proteínas anti-apoptóticas. Entre los miembros de esta familia se encuentran Bad (*Bcl-2 associated death promoter*), Bim (*Bcl-2 interacting mediator of the cell death*), Bid (*BH3-interacting domain death agonist*), Bmf (*Bcl-2 modifying factor*) y Puma (*p53 upregulated modulator death agonist*) (Adams & Cory, 1998; Giam et al., 2008; Gross et al., 1999).

Los miembros de la familia Bcl-2 antiapoptóticas promueven la supervivencia celular y son capaces de prevenir la liberación de factores que promuevan los procesos apoptóticos, ya que estas proteínas contienen un sitio hidrofóbico capaz de unirse a miembros de la familia Bcl-2 pro-apoptóticas y algunos de la familia BH3 *only* impidiendo su activación. Estas proteínas pueden contener en su estructura hasta cuatro dominios BH. Entre los principales miembros de este grupo se encuentran las

proteínas Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w, (Figura 7) (Adams & Cory, 1998; Giam et al., 2008; Gross et al., 1999; Youle et al., 2008).

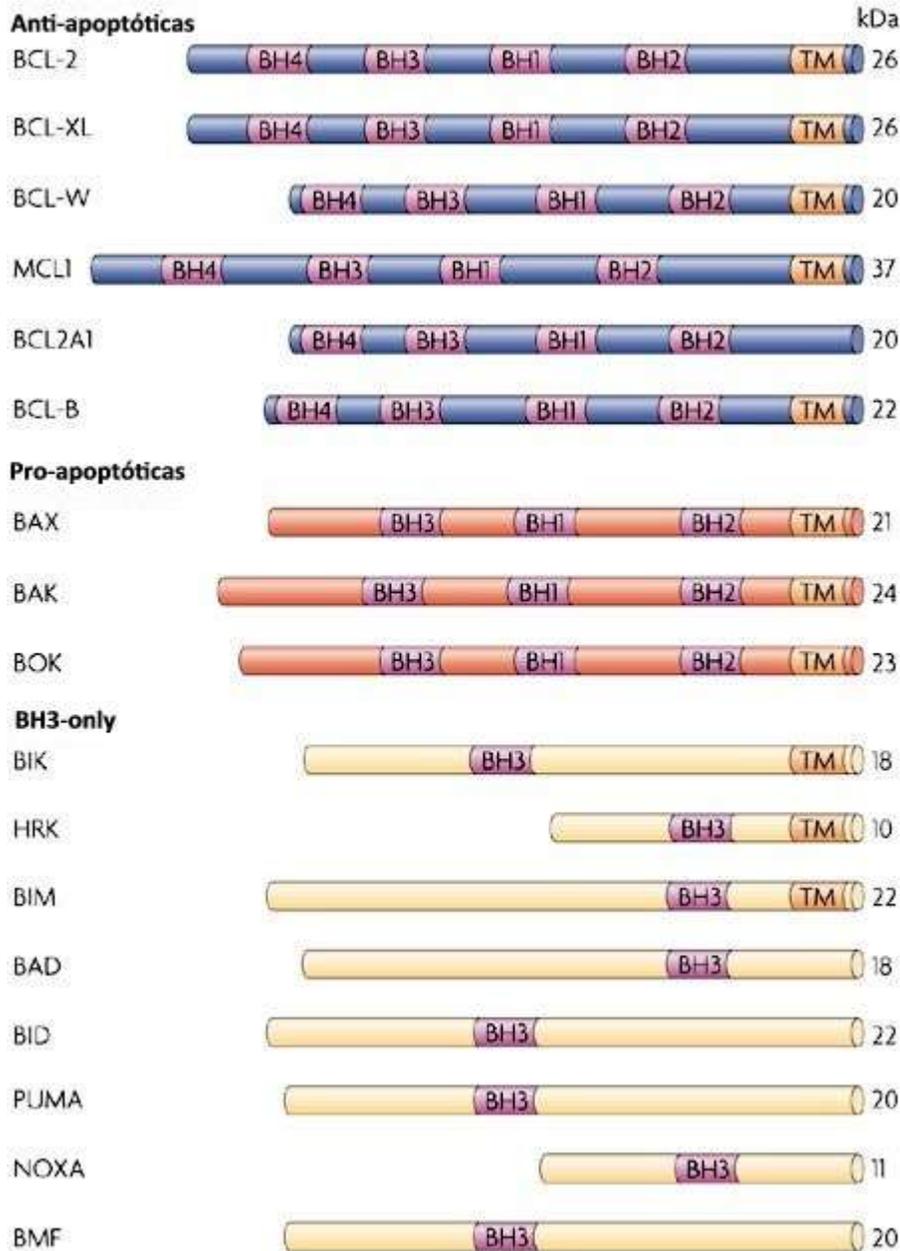


Figura 7.- Clasificación de las proteínas Bcl-2 (Modificado de Taylor y Cullen, 2008).

2.2.-Autofagia

La autofagia es una vía de degradación lisosomal, es un proceso fisiológico altamente dinámico esencial para la supervivencia, diferenciación, desarrollo, y homeostasis celular. Este proceso implica la reorganización de las membranas subcelulares para el secuestro del citoplasma y de los organelos, el cual forma vesículas de doble membrana que se fusionan con un lisosoma, donde el contenido es degradado y reciclado. Las

principales rutas de degradación de los constituyentes celulares son la autofagia y el reciclamiento citosólico del proteosoma, ambas son importantes bajo condiciones de estrés y durante el desarrollo embrionario.

Se han identificado tres formas de autofagia: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia y macroautofagia. Las cuales se diferencian en sus funciones fisiológicas y el modo en el que reclutan el sustrato que va a ser degradado por el lisosoma. Es un proceso que mantiene el equilibrio entre la síntesis protéica, la biogénesis de organelos y su degradación. En mamíferos, la macroautofagia es el principal mecanismo catabólico.

La autofagia está mediada por un organelo llamado autofagosoma. La formación de los autofagosomas y la dinámica de la membrana están altamente conservadas en levaduras, plantas y animales. En el primer paso de la formación del autofagosoma, los componentes citoplasmáticos (incluyendo a los organelos) son secuestrados por una membrana única llamada fagóforo o membrana de aislamiento. La formación del fagóforo depende de la participación de una familia de proteínas importantes llamadas Atg, de las cuales, 18 de 31 proteínas existentes están involucradas en la formación del autofagosoma, entre las que se encuentran la Atg3, la Atg5, la Atg7, la Atg10, la Atg12 y la Atg8/LC3. Estas proteínas se encargan de la organización, reclutamiento y andamiaje del autofagosoma, algunas de las cuales también están involucradas en la ubiquitinación de proteínas blanco (Klionsky et al., 2000; Levine & Kroemer, 2008). En cuanto a la LC3, es una proteína que se encuentra libre en el citoplasma como pro-LC3 y también como LC3-1, pero al ser conjugada con el fosfolípido fosfatidiletanolamina, se puede incorporar a la membrana de los autofagosomas, es entonces cuando se puede asociar con un aumento en la actividad autofágica, cuando se observa un patrón punteado por inmunofluorescencia.

La porción citoplasmática es engullida y aislada completamente por el autofagosoma, un organelo típico de doble membrana. Sin embargo, este paso es un simple secuestro y no implica la degradación de sus componentes. Se piensa generalmente que es un sistema de degradación no selectivo, en contraste con el sistema ubiquitina-proteosoma, que reconoce específicamente proteínas ubiquitinadas para la degradación proteosomal.

Después de haberse formado el autofagosoma, éste se fusiona con el lisosoma formando un autofagolisosoma, en el cual se degrada el contenido por enzimas hidrolíticas (Klionsky et al., 2000; Levine & Kroemer, 2008; Mizushima, 2007; Tanida et al., 2004).

Los lisosomas son organelos que contienen alrededor de 50 diferentes enzimas, entre las cuales se encuentran varias proteasas, lipasas, glucosidasas, fosfatasas y nucleasas, capaces de degradar todo tipo de polímeros biológicos derivados del espacio extracelular o desde el citoplasma. Los lisosomas funcionan como un sistema digestivo

celular, en donde la membrana lisosomal media funciones de compartamentación y acidificación del lumen lisosomal, transporte de aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos resultantes de la degradación. En el citoplasma los lisosomas se visualizan como vacuolas densas esféricas de diferentes tamaños.

Los lisosomas se forman a partir de la fusión de vesículas de la red *trans* del aparato de Golgi, los cuales son formados primeramente como endosomas tempranos, los cuáles van madurando y su pH disminuye hasta llegar a su óptimo (alrededor de pH 5) necesario para la actividad de las hidrolasas ácidas lisosomales. Para mantener un pH ácido, los lisosomas deben concentrar iones H⁺ activos. Esto se logra mediante una bomba de protones en la membrana lisosomal, que transporta protones hacia el lisosoma desde el citosol, mediante la hidrólisis de ATP (Levine & Kroemer, 2008; Mizushima, 2007; Tanida et al., 2004).

Las enzimas lisosomales están dirigidas a los lisosomas por una marca de residuos de manosa-6- fosfato, que son reconocidos por receptores en la red *trans* del aparato de Golgi y empaquetados en vesículas. Las hidrolasas se liberan en el lumen del endosoma, mientras que los receptores permanecen en la membrana y son eventualmente reciclados por el aparato de Golgi (Kornfeld & Mellman, 1989; Cooper, 2000; Luzio et al., 2003).

Los autofagolisosomas poseen proteínas altamente glicosiladas como Lamp-1 y Lamp-2 (*Lysosome-associated membrane protein 1 y 2*). Estas son proteínas transmembranales de tipo 1 con un dominio luminal grande, un dominio transmembranal y una cola citoplasmática carboxilo terminal. Ambas Lamps tienen carbohidratos unidos a la región luminal que funcionan como protectores de la membrana lisosomal contra la acción de enzimas hidrolíticas. En estos autofagolisosomas el contenido es degradado y transportado al citoplasma para la reutilización de sus componentes (Figura 8) (Escobar et al., 2011; Eskelinen, 2005; Eskelinen, 2006; Mizushima, 2007).

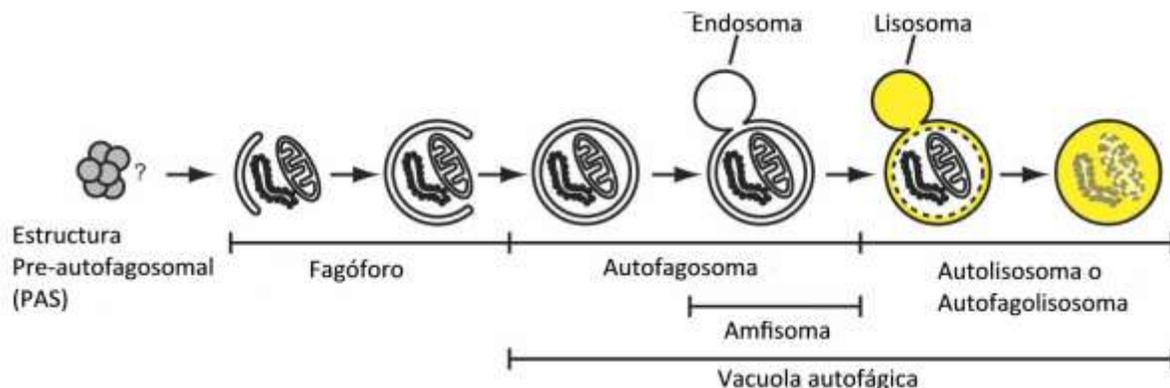


Figura 8.- Formación del autofagolisosoma (Modificado de Mizushima, 2007).

En la mayoría de las circunstancias, la autofagia es una vía de adaptación al estrés que promueve la supervivencia celular. La paradoja está en que la autofagia también

se considera un tipo de muerte celular programada no apoptótica. Este tipo de muerte ha sido definida a través de criterios morfológicos, como un exceso en la cantidad de vesículas autofágicas; sin embargo, se considera una característica insuficiente para determinar si es una muerte celular por autofagia, por lo que se evalúan bioquímicamente la presencia de proteínas proautofágicas como Beclina-1 y LC3.

Todavía no se entienden completamente los factores que determinan en una célula si la autofagia es un proceso citoprotector o citotóxico, tampoco se sabe si este proceso es resultado de la degradación específica de citoprotectores u otro mecanismo que dispare la cascada de señalización de la ruta de muerte celular, o es resultado de cruzar un umbral o punto de no retorno de autodigestión.

Aunque la autofagia ocurre de manera independiente, puede ligarse a vías de muerte apoptóticas a través de moléculas que interactúan en ambos procesos. La activación sinérgica de ambas rutas puede ser consecuencia de los umbrales de señalización de cada proceso. Sin embargo, estas rutas no solamente pueden activarse a sí mismas, también pueden desactivarse o inhibirse dependiendo de las condiciones celulares (Levine & Kroemer, 2008; Kroemer & Jäätelä, 2005; Guicciardi et al., 2004; Rubinstein et al., 2012).

2.3.- Necrosis

La necrosis es un proceso que ocurre en las células que se exponen a un medio físico desfavorable (por ejemplo: hipotermia, hipoxia, radiación, pH bajo, traumatismos, etc) el cual causa una lesión celular aguda, evidenciada por un daño de la membrana plasmática, y por una hinchazón y fragmentación intracelular. En condiciones fisiológicas el daño de la membrana puede ser iniciado por virus, sustancias como el complemento o proteínas llamadas perforinas. Dos características típicas de este proceso son la tumefacción rápida y la lisis celular, las cuales son evidenciadas por un aumento de enzimas en el citoplasma como la LDH (*lactate dehydrogenase*), la GDH (*glutamato dehydrogenase*) y el AST (*aspartate*). Este proceso puede ser iniciado a través de la activación de quinasas pronecróticas como RIP1 y RIP3, que desencadenan la producción de especies reactivas (ROS), a este proceso se le conoce como necroptosis (Cho et al., 2010; Moquín & Chan, 2010).

Los organelos intracelulares como las mitocondrias, el RER y el núcleo sufren alteraciones irreversibles que son causadas por un exceso en la entrada de agua a la célula, ocasionado por el daño de las bombas de iones. A menudo se asocia con una vasta lesión de tejidos vecinos y una respuesta inflamatoria intensa (Golstein & Kroemer, 2007; Bustamante et al., 2012).

La necroptosis está relacionada con la apoptosis a nivel molecular a través de receptores TNF. Sin embargo se ha observado que la activación de una respuesta anula la actividad de la otra (Moquín & Chan, 2010).

ANTECEDENTES

1.- Muerte celular en testículo

La muerte celular es un proceso normal y regular que se lleva a cabo para mantener la homeostasis en los testículos de varias especies; esta pérdida de células es conocida desde finales del siglo XIX como degeneración celular, y fue sustituido por el término de apoptosis o muerte celular programada en la década de los 70's (Kerr et al., 1972; Roosen-Runge, 1973). Se calcula que hay una pérdida del 75% de las células germinales potenciales en los túbulos seminíferos durante la espermatogénesis (Huckins, 1978; Oakberg, 1956; Dunkel et al., 1997).

La espermatogénesis es un proceso donde se elevan los índices de muerte celular durante algunos estadios específicos en la rata adulta, durante el desarrollo embrionario, y durante los primeros ciclos espermatogénicos en ratas juveniles (Royere et al., 2004).

La viabilidad de las células germinales dependen directamente de la cantidad de células de Sertoli, ya que estas células además de funcionar como nodrizas, por mecanismos de señalización parácrina pueden iniciar o regular la transducción de señales apoptóticas (Royere et al., 2004; Sinha et al., 2003).

Existen diversas alteraciones fisiológicas que activan los procesos de muerte, entre las más estudiadas se encuentra la falta de hormonas, como la FSH, la LH, la testosterona y los andrógenos, las cuales tienen un efecto directo sobre el desarrollo de las células germinales. La ausencia o inhibición de alguna de éstas ocasiona un aumento de la muerte celular por apoptosis (Billig et al., 1995; Brinkworth et al., 1995; Tapanainen et al., 1993; Russel et al., 1977; Russel et al., 1987; Dunkel et al., 1997). El punto de control paquiténico (*el checkpoint*) es otra causa de muerte celular, ya que es un punto de control que regula la división meiótica e impide el desarrollo de células que no completan la recombinación meiótica o están estacionadas en un estadio un largo periodo de tiempo (Roeder & Bailis, 2000; Odorisio et al., 1998).

La eliminación celular en la espermatogénesis no solo se presenta bajo condiciones fisiológicas, también se presenta bajo tratamientos como radiaciones, quimioterapia, hipertermia u otros compuestos que alteran diversos factores reguladores de este proceso (Morales et al., 2007; Shaha & Mishra, 2010).

La apoptosis en el testículo se puede identificar por la fragmentación de la cromatina, contracción del citoplasma, vacuolización y cambios en la morfología mitocondrial. El porcentaje de células apoptóticas es similar al porcentaje de células en división celular. Los cuerpos apoptóticos se encuentran en estadios definidos, y normalmente en grupos (Roosen-Runge, 1955; Roosen-Runge, 1973).

Bioquímicamente, se han reportado diferentes proteínas, genes y miRNAs que interactúan para la activación de la apoptosis en células germinales. Sin embargo, se ha observado que la principal ruta de muerte, es la apoptosis por la vía extrínseca, donde participa el sistema Fas/FasL, en donde el receptor Fas del espermatocito interactúa con el FASL de las células de Sertoli, activando la ruta de muerte celular (Lee et al., 1997; Oldereid et al., 2001). Sin embargo, se ha observado también la participación de las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 en espermatocitos durante la apoptosis. Las Bcl-2 proapoptóticas están relacionadas principalmente a la vía intrínseca, y se ha visto principalmente su activación en organismos *knock out* y en tratamiento con alteraciones hormonales (Royere et al., 2004).

Entre los oncogenes que pueden modular el proceso de apoptosis se encuentran el sistema *Kit-factor*, el cual se expresa en células germinales y en células de Leydig (Yin et al., 1998). En cuanto al factor P53, se ha reportado que se expresa y promueve la apoptosis en células germinales primordiales, espermatogonias A y espermatocitos primarios (Royere et al., 2004; Yin et al., 1998; Oldereid et al., 2001).

Entre las células germinales, las espermatogonias y los espermatocitos son los principales objetivos de los procesos de muerte celular. Las espermatogonias que se encuentran en continuos procesos de división mitótica presentan procesos apoptóticos caracterizados morfológicamente por la marginación de la cromatina nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos, y bioquímicamente por la transcripción de p53 y la fragmentación de ADN. (Allan et al., 1992; Clermont, 1962; De Rooij & Lok, 1987; Roosen-Runge, 1973; Huckins, 1978; Huckins & Oakberg, 1978; Royere et al., 2004).

Los espermatocitos primarios mueren abundantemente en estadios definidos del ciclo espermatogénico en etapas maduras y durante las primeras ondas espermatogénicas en etapas prepúberes. Los espermatocitos que presentaron procesos de apoptosis se identificaron como paquitenos tempranos de la profase meiótica, caracterizados por la presencia de cuerpos apoptóticos en estadios definidos del ciclo. Las características morfológicas apoptóticas principales de estas células son la formación de cuerpos apoptóticos y condensación nuclear, y bioquímicamente la fragmentación de ADN, la activación de caspasas y Bcl-2 proapoptóticas (Jahnukainen et al., 2004; Richburg and Boekelheide, 1996; Lee et al., 1997). Dependiendo de la cantidad de energía y sustratos disponibles, los procesos apoptóticos de los espermatocitos pueden desactivarse y activar procesos necróticos (Bustamante & Quiroga, 2012).

Las células de Sertoli también sufren procesos de apoptosis, sobre todo en las primeras etapas de desarrollo del túbulo seminífero, las cuales están involucradas principalmente en la formación de la luz del túbulo seminífero. Su muerte celular está relacionada con su densidad poblacional y la interacción nutricional con la membrana basal del túbulo (Dirami et al., 1995; Dym et al., 1995).

En el testículo, los procesos de autofagia han sido poco caracterizados, sin embargo se ha visto que bajo condiciones de estrés térmico o golpes de calor se pueden activar procesos de autofagia y apoptosis en células germinales en cultivos celulares (Zhang et al., 2012; Kim et al., 2013).

2.- Muerte celular durante los primeros ciclos espermatogénicos.

El inicio de la fase meiótica de la espermatogénesis en la mayoría de los mamíferos está relacionado con un incremento de células apoptóticas que limitan la eficiencia de su producción de espermatozoides durante los primeros ciclos espermatogénicos antes de entrar en la pubertad. Diversos estudios han mostrado que la muerte celular por apoptosis es un proceso primordial en el desarrollo de este tejido durante las primeras etapas de desarrollo. Después de estas etapas se incrementa la supervivencia celular dentro del túbulo. Este proceso requiere una progresión continua del ciclo celular, y al no tener las condiciones adecuadas para su desarrollo, ni estar arrestadas en un estadio un largo periodo de tiempo, las células germinales son altamente sensibles a procesos de eliminación (Royere et al., 2004).

La apoptosis de las células germinales depende directamente de las relaciones entre estas y las células de Sertoli. No solamente por su capacidad de activar la ruta de muerte directamente a través de diversos factores como el FasL, sino también indirectamente a través del ensamblaje incompleto de la barrera hematotesticular, la cual limita las condiciones para que se desarrollen los espermatoцитos. Esta barrera no se ensambla completamente antes de los 15 días postnatales en rata.

Los diseños experimentales que se han hecho para comprender los mecanismos y las causas que desatan este evento han sido basados en la privación hormonal y en modelos con criptorquidia, donde se ha establecido que la FSH, la testosterona y las bajas temperaturas son vitales para la supervivencia celular en esta etapa del desarrollo (Royere et al., 2004)

La apoptosis en los primeros ciclos espermatogénicos en rata se presenta de los 16 a los 32 días de edad (Billig et al., 1995; Boekelheide et al., 1998). Estos procesos han sido encontrados abundantemente entre los 25-27 días de edad, en los estadios IV-VI, los cuales han sido identificados a través de la expresión de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, la activación de caspasas, la fragmentación de ADN, y la presencia de cuerpos apoptóticos (Billig et al., 1995; Russel et al., 1987; Rodríguez et al., 1997).

Los procesos de apoptosis y autofagia durante estas etapas han sido poco descritos.

JUSTIFICACIÓN

El proceso de muerte celular en el testículo durante la primera onda espermatogénica ha sido tipificado como apoptosis en espermatoцитos en paquiteno. Sin embargo, no se tiene una caracterización completa y factible del proceso de muerte celular en esta etapa de maduración. Observaciones hechas por nuestro grupo de investigación indican que puede haber otros tipos de muerte celular, debido a la presencia de vesículas autofágicas en túbulos seminíferos, y la coexistencia de apoptosis y autofagia en otros tipos de células germinales. Por lo cual se considera que debe realizarse una exploración y descripción detallada de las características de muerte celular durante estas etapas.

HIPÓTESIS

Tanto la autofagia como la apoptosis son eventos muerte celular en los túbulos seminíferos durante la primera onda espermatogénica.

OBJETIVOS

1.- Objetivos generales

- Identificar, caracterizar y cuantificar los procesos de eliminación celular en espermatocitos primarios durante los primeros ciclos espermatogénicos en testículos de ratas prepúberes.
- Determinar si las características celulares durante el proceso de muerte de la primera onda espermatogénica están asociadas con apoptosis, autofagia o una combinación de ambas.

2.- Objetivos particulares

- Describir las asociaciones celulares de los túbulos seminíferos de testículos de rata prepúber.
- Caracterizar a nivel ultraestructural las alteraciones celulares de los espermatocitos en proceso de muerte durante la primera onda espermatogénica en testículos de rata prepúberes.
- Identificar a nivel ultraestructural los tipos celulares que están muriendo por los diferentes procesos de muerte celular.
- Correlacionar los procesos de eliminación, identificando y cuantificando las proteínas proapoptóticas y proautofágicas por medio de inmunohistoquímica.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Material biológico

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) wistar machos de 18, 25, 27 y 32 días de edad, 6 ratas por cada edad respectivamente. Cada ejemplar fue anestesiado, diseccionado y eutanasiado conforme a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, para la extracción de los dos testículos. Un testículo fue fijado para microscopía electrónica e incluido en resina epóxica, para buscar características ultraestructurales, y el otro testículo fue fijado para microscopía óptica e incluido en parafina, para la realización de las inmunolocalizaciones y la técnica de TUNEL para detectar muerte celular.

2.- Microscopía electrónica de transmisión

Se hizo la fijación de los fragmentos de los testículos con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador PBS 1X (*phosphate buffer saline*) pH 7.2 durante dos horas. Posteriormente, se les hizo los lavados a las muestras con el mismo amortiguador. A una parte del testículo se le hizo una postfijación con tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% en PBS 1X durante una hora y después se le hicieron los lavados con el amortiguador. Se realizó la deshidratación del tejido en alcoholes graduales desde etanol al 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, etanol absoluto, 10 minutos por alcohol aproximadamente. Se realizó una preinclusión con mezclas de óxido de propileno y etanol absoluto en diferentes concentraciones, y continuamente se les hicieron 2 cambios de óxido de propileno de 20 minutos cada uno aproximadamente. Posteriormente, se les hicieron cambios con diluciones 2:1, 1:1, 1:2 de óxido de propileno- resina epóxica (EPON). Las muestras se incluyeron en resina epóxica (EPON) pura en moldes de plástico a 60°C durante 48hrs. Se hicieron cortes semifinos y ultrafinos de los bloques de las diferentes edades en el ultramicrotomo. Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina y fueron observados y fotografiados en el microscopio óptico. Los cortes ultrafinos

fueron contrastados con acetato de uranilo al 4% y citrato de plomo al 0.035%, los cuales fueron observados y fotografiados en el Microscopio Electrónico JEOL 1010.

3.- Microscopía óptica

Se hizo la fijación de los fragmentos de los testículos en paraformaldehído al 4% en amortiguador PBS 1X durante un día, y posteriormente se les hicieron los lavados con el mismo amortiguador. Se deshidrataron los fragmentos con alcoholes graduales desde etanol al 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, etanol absoluto de 30 minutos a 1 hora en cada alcohol. Se realizó un aclaramiento en xilol y se incluyeron las muestras en bloques de parafina. Los bloques de parafina fueron cortados en un micrótomo de parafina, de los cuales se obtuvieron cortes semifinos que fueron montados en portaobjetos con Poli-L-lisina. Los cortes fueron desparafinados e hidratados en alcoholes graduales hasta H₂O y luego fueron puestos en PBS 1X para realizarles las inmunolocalizaciones y la técnica de TUNEL.

3.1.- Inmunolocalizaciones de las proteínas caspasa-3 activa, Lamp-1 y LC3

A los portaobjetos con los cortes histológicos se les hizo una recuperación antigénica con buffer de citratos en horno de microondas, 3 minutos a potencia 10 y 6 minutos a potencia 3, posteriormente se les hicieron 3 lavados de PBS de 3 minutos cada uno. Se les hizo un bloqueo con glicina 100 mM en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las preparaciones con disoluciones de anticuerpo primario (1 µl en 100 µl de PBS), de los anticuerpos primarios anti-Lamp-1 (IgG) de abcam-, anti-LC3 (IgG) de abcam y anti-caspasa-3 activa (IgG) de sigma-aldrich durante toda la noche. Se realizaron los lavados con PBS y se incubaron las preparaciones con diluciones de anticuerpo secundario (1 µl en 200 µl de PBS), de GAR (*Goat anti-rabbit*) (IgG) con FITC de Jackson para caspasa-3 activa y para Lamp-1 y GAM (*Goat anti-mouse*) (IgG) con FITC de Alexa para LC3 durante 2 horas en la oscuridad. Se hicieron lavados con PBS y se les agregó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) durante 2 minutos. Se hicieron los lavados con PBS y se montaron con

medio de montaje para fluorescencia Vectashield de Vector. Se observaron y fotografiaron las preparaciones en el microscopio de epifluorescencia.

3.2.- Técnica de TUNEL (*TDT-mediated dUTP-biotin Nick end-labeling*)

A las preparaciones se les hizo la recuperación antigénica con proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Se les hicieron 3 lavados con PBS y se les realizó la técnica de TUNEL con el kit de detección de apoptosis Apoptag de Millipore. Los cortes se incubaron con el buffer de equilibrio de 10 a 20 minutos. Posteriormente, se incubaron con la enzima TDT en buffer de reacción a 37 °C durante 1 hora. Se detuvo la reacción con buffer de paro durante 10 minutos. Posteriormente, se les hicieron los lavados con PBS y se incubaron las preparaciones con disoluciones de anti-digoxigenina-rodamina en buffer de bloqueo durante 45 minutos en la oscuridad. Se les hicieron los lavados con PBS y se les agregó DAPI durante 2 minutos. Continuamente, se les hicieron los lavados con PBS y se montaron las preparaciones con medio de montaje para fluorescencia Vectashield de Vector. Finalmente, se observaron y fotografiaron las preparaciones en el microscopio de epifluorescencia.

4.- Análisis de datos

4.1.- Clasificación de las características morfológicas e inmunohistoquímicas

De acuerdo a las características morfológicas y la localización celular de los biomarcadores de autofagia y/o apoptosis, se elaboró una tabla para relacionar el tipo de muerte celular y la edad en la que se presenta.

4.2.- Cuantificación y análisis de los biomarcadores

Se hizo un conteo del número de células marcadas por túbulo por el número total de células por túbulo. Se contaron alrededor de 30 túbulos por marca y por edad. Posteriormente, se realizó el cálculo de un índice apoptótico (Número de células positivas por cada 100 células) (Heninger et al., 2004). Posteriormente se les hicieron análisis de varianza (ANOVA) para ver si existían diferencias estadísticas entre los

tratamientos por edad, y se les hicieron pruebas de Tukey para definir las edades que presentaban diferencias significativas.

RESULTADOS

Las observaciones morfológicas hechas en los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina nos permitieron describir las características morfológicas de los túbulos seminíferos y los estadios del ciclo del epitelio seminífero en las diferentes edades, y en los cortes ultrafinos se pudieron identificar y describir los diferentes tipos celulares, estadios del ciclo del epitelio seminífero y las células en distintas fases del proceso de muerte celular.

En cambio las inmunolocalizaciones nos permitieron observar los diferentes patrones de marcaje de los procesos de muerte celular tanto de apoptosis como de autofagia, y así poder compararlos con su descripción morfológica. Caspasa-3 activa y la técnica de TUNEL para apoptosis y LC3 y Lamp-1 para autofagia respectivamente.

18 días

Características generales de los túbulos

A la edad de 18 días de edad, el epitelio seminífero consiste de 2 a 3 capas celulares. Algunos de estos túbulos mostraron una luz discreta en el centro, en la que se mostraron prolongaciones citoplasmáticas de las células de Sertoli. Estos túbulos presentaron espermatogonias de los dos tipos, A y B, así como espermatocitos primarios en los diferentes estadios de la profase meiótica (del preleptoteno al paquiteno temprano) en menor proporción respecto a las espermatogonias. Algunas espermatogonias se observaron en procesos de división mitótica. Los espermatocitos primarios mostraron signos de alteración, unas células con un tamaño y forma irregular, y otras células con la forma típica de un cuerpo apoptótico, con un alto grado de compactación de cromatina, ubicadas preferentemente en la región adluminal (Figura 9). En las micrografías electrónicas se identificaron 2 diferentes tipos de características morfológicas en espermatocitos primarios: características iniciales y características tardías (Figuras 10A y 10B).

Características morfológicas iniciales del proceso de eliminación celular

Las células con estas características se presentan en la mayoría de los túbulos. Son espermatocitos primarios grandes e irregulares en la zona adluminal que tienden a perder sus uniones con las células contiguas y con las células de Sertoli. Estas células pueden ser probablemente cigotos transitando a paquitenos, identificados por un nucleolo bien desarrollado, la presencia de un cuerpo XY, de ejes cromosómicos, y el inicio de la formación de complejos sinaptonémicos (Figura 10C y 10D). En su citoplasma presentan mitocondrias dilatadas con sus crestas desplazadas hacia la periferia (Figuras 10C, 10D y 11B). No se observan alteraciones visibles en su nucleolo, ni en su cromatina, la única alteración nuclear que presenta es una discontinuidad de la envoltura interna por segmentos (Figuras 10D, 11B, 11C y 11D).

Estas células no presentan vesículas autofágicas en su citoplasma, solo se llegan a observar en células de Sertoli y en la luz del túbulo (Figura 11A).

Características morfológicas tardías del proceso de eliminación celular

Las células con estas características se identifican principalmente por las alteraciones nucleares y la formación de cuerpos apoptóticos. Estas células se caracterizan por la fragmentación y compactación de la cromatina, y cuerpos membranosos dilatados, incluyendo sus mitocondrias (Figuras 12 y 13). Estos espermatocitos se observan como núcleos picnóticos en la zona adluminal del túbulo, algunas veces se llegan a encontrar en grupos. Al pertenecer estas células a un tejido muy activo, muchas de estas células son fagocitadas por células de Sertoli antes de terminar por completo su proceso de muerte celular.

La mayoría de las células alteradas son espermatocitos primarios, sin embargo se llegan a observar espermatogonias alteradas cercanas a la membrana basal. Estas presentan retracciones celulares y cambios morfológicos en sus fases más tempranas, y cariorrexis y formación de cuerpos apoptóticos en sus fases más tardías (Figura 14).

Inmunolocalización de biomarcadores de apoptosis y autofagia

En el día 18 se encontraron espermatocitos primarios positivos a caspasa-3 activa y a la técnica de TUNEL, pero no se observó un marcaje positivo de Lamp-1 y LC3 en los espermatocitos primarios.

Los resultados de la identificación de la caspasa-3 activa indican que hay una mayor cantidad de marca positiva en los espermatocitos primarios, aunque se llega a encontrar también en espermatogonias (Gráfica 1). El marcaje positivo se observa en el citoplasma de los espermatocitos que a nivel morfológico-ultraestructural mostraban características iniciales del proceso de muerte (Figuras 15A y 15B). También se observaron elementos TUNEL positivos que morfológicamente correspondían a células con características tardías (Figura 15F). Los resultados indican que hay una mayor cantidad de espermatocitos positivos a caspasa-3 que a TUNEL (Gráfica 1).

Los resultados de la localización de la proteína Lamp-1 indican la presencia de esta proteína en la zona correspondiente a las células de Sertoli, lo que se considera normal por su alta actividad fisiológica (Figuras 15C y 15D). Los resultados de la localización de la proteína LC3 indican que hay una insignificante cantidad de espermatoцитos marcados, solo presentaron marca algunas células de Leydig fuera de los túbulos seminíferos (Figura 15E) (Gráfica 1).

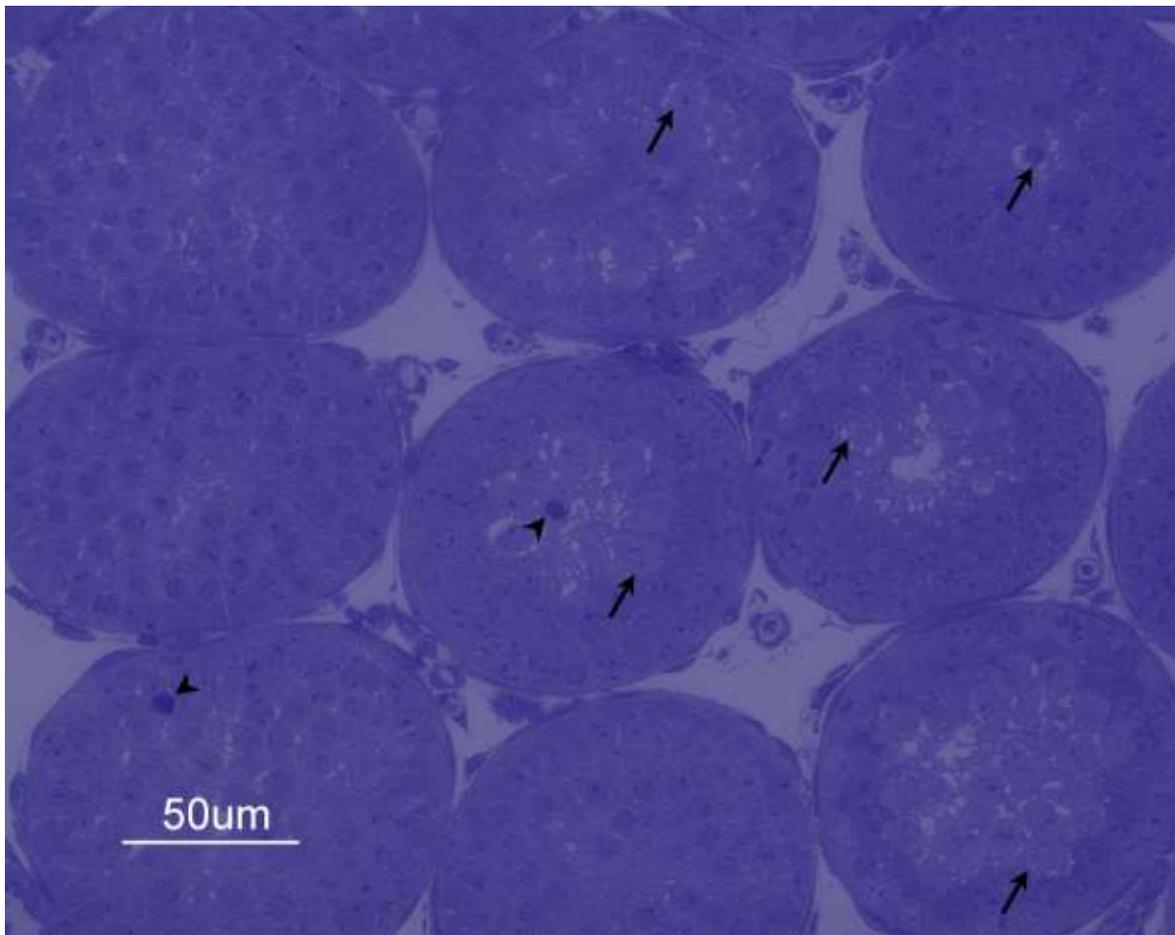


Figura 9.- Cortes semifinos transversales de túbulos seminíferos de testículo de rata prepúber de 18 días de edad. En la imagen se observan túbulos en diferentes estadios del ciclo espermatogénico. Con flechas negras se señalan células en procesos de eliminación que muestran formas irregulares y pérdida de uniones celulares con las células contiguas, y las cabezas de flecha señalan células con una alta compactación de la cromatina. Tinción con azul de toluidina.

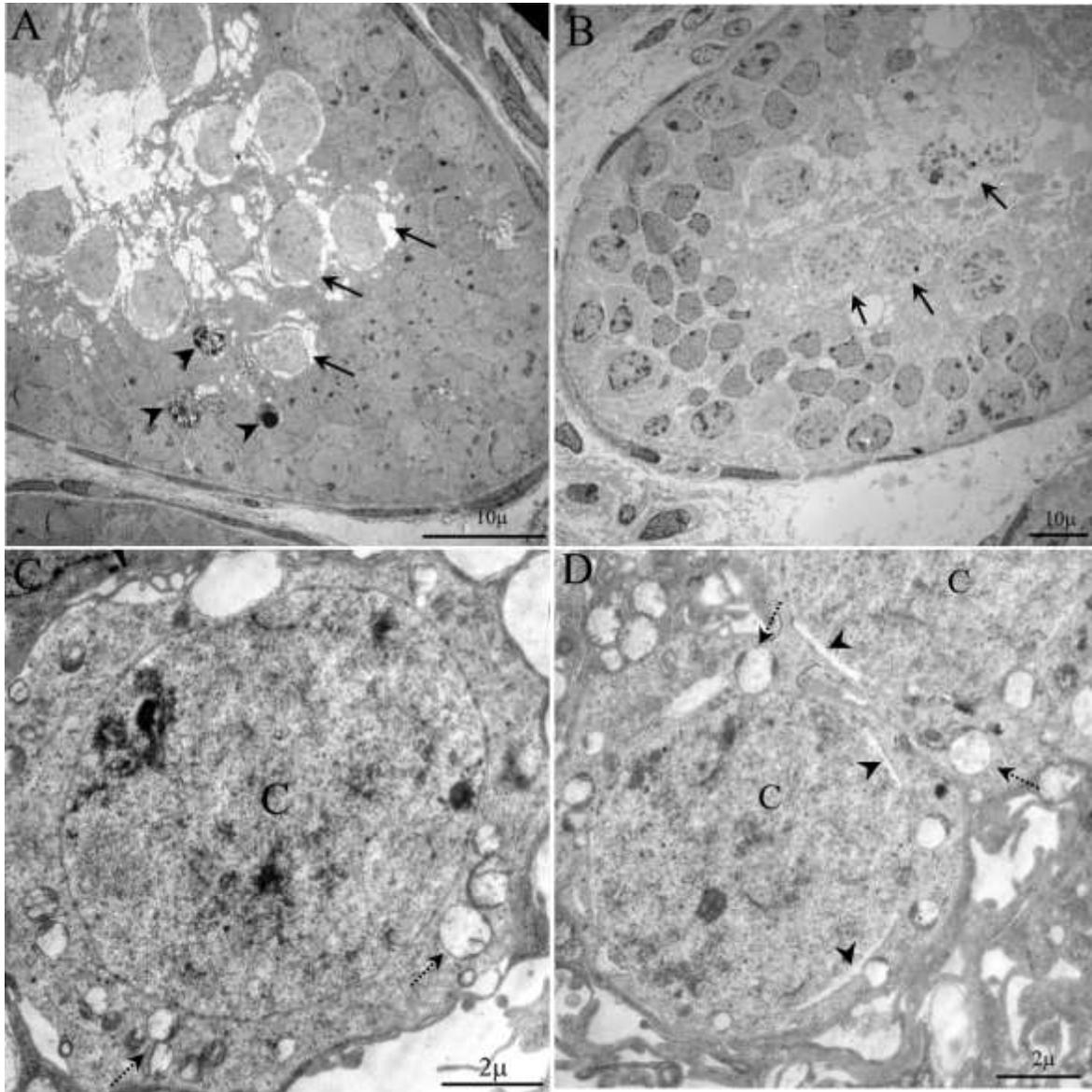


Figura 10.- Las figuras A y B muestran fotomicrografías electrónicas panorámicas de cortes transversales ultrafinos de dos túbulos seminíferos en diferentes estadios. Ambas imágenes presentan células con diferentes grados de alteración. Con flechas negras están señaladas células con alteraciones iniciales y con cabezas de flechas células con alteraciones tardías. En las figuras C y D se observan espermatozoides primarios en cigoteno (C), los cuales presentan una forma irregular y separación de las células contiguas, además de tener mitocondrias con crestas dilatadas (flechas punteadas) en su citoplasma y una discontinuidad de la envoltura interna del núcleo (cabezas de flecha).

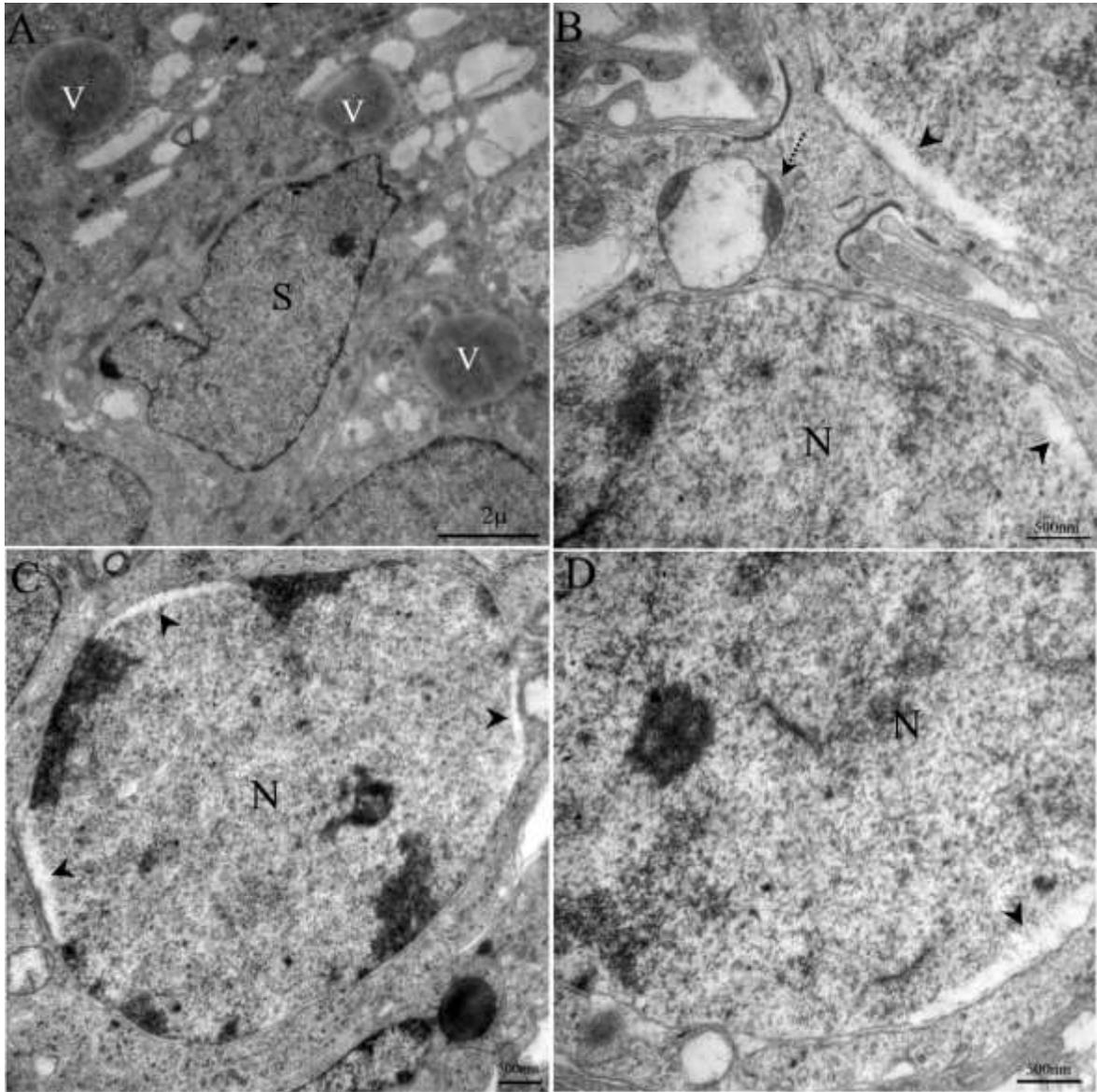


Figura 11.- Micrografías electrónicas de células de túbulos seminíferos de 18 días de edad. En la figura A se observa la presencia de vesículas (V) alrededor de una célula de Sertoli (S). En las figuras B, C y D espermatocitos primarios con discontinuidades en su envoltura interna (cabezas de flecha) y mitocondrias con crestas dilatadas en su citoplasma (flechas punteadas).

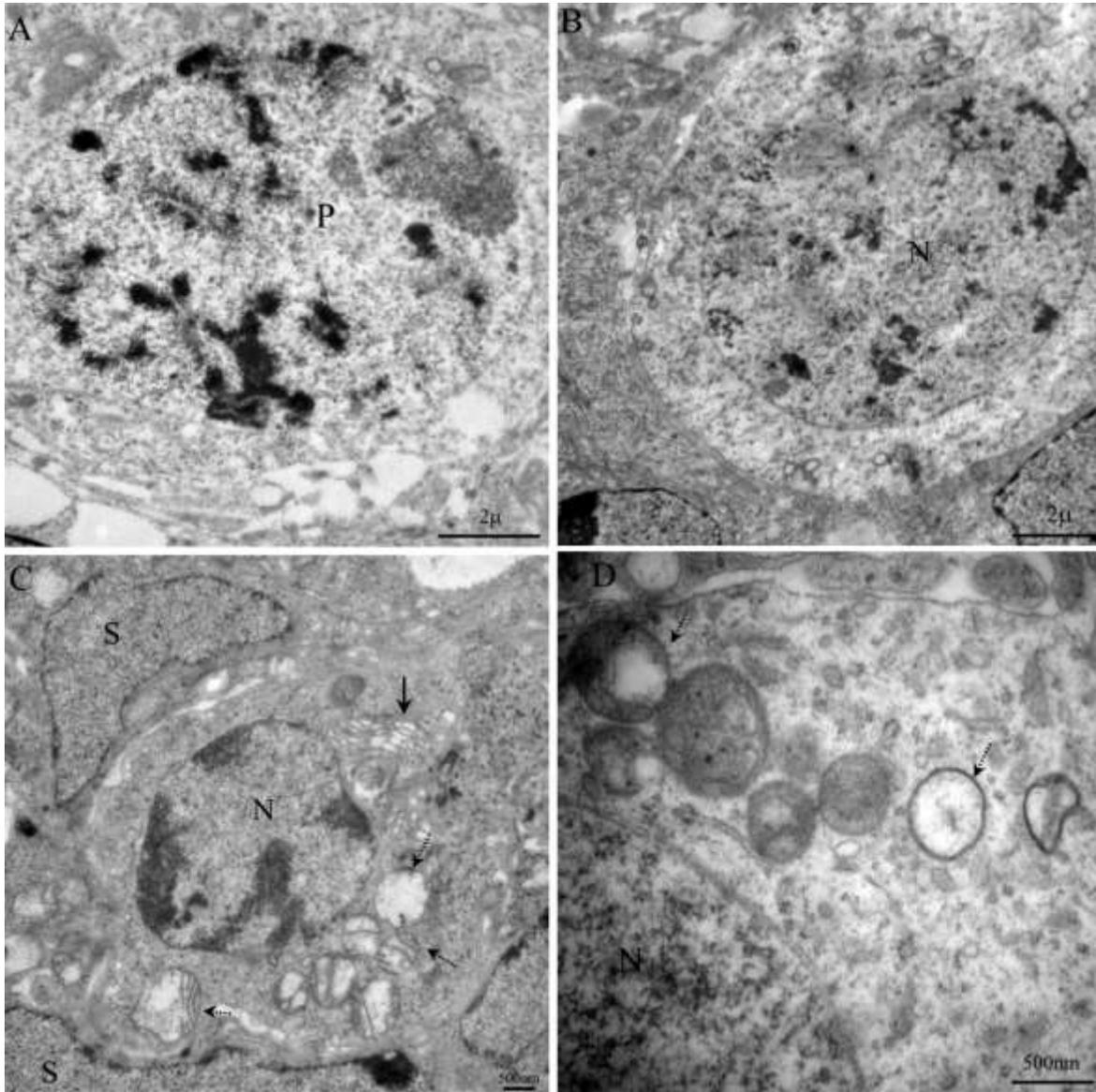


Figura 12.- Micrografías electrónicas de células con alteraciones tardías de túbulos seminíferos de ratas de 18 días de nacidas. En la figura A se muestra un espermatocito primario en paquitenio (P) que presenta un citoplasma alterado y un núcleo alterado con grumos de cromatina compacta. En la figura B una célula con cariorrexis (N) y un citoplasma alterado. En la figura C una célula con sistemas membranosos dilatados (flechas negras) y mitocondrias con crestas desplazadas hacia su periferia (flechas punteadas) en su citoplasma, siendo rodeada por una célula de Sertoli (S). En la figura D se observan diferentes grados de alteración de las mitocondrias (flechas punteadas).

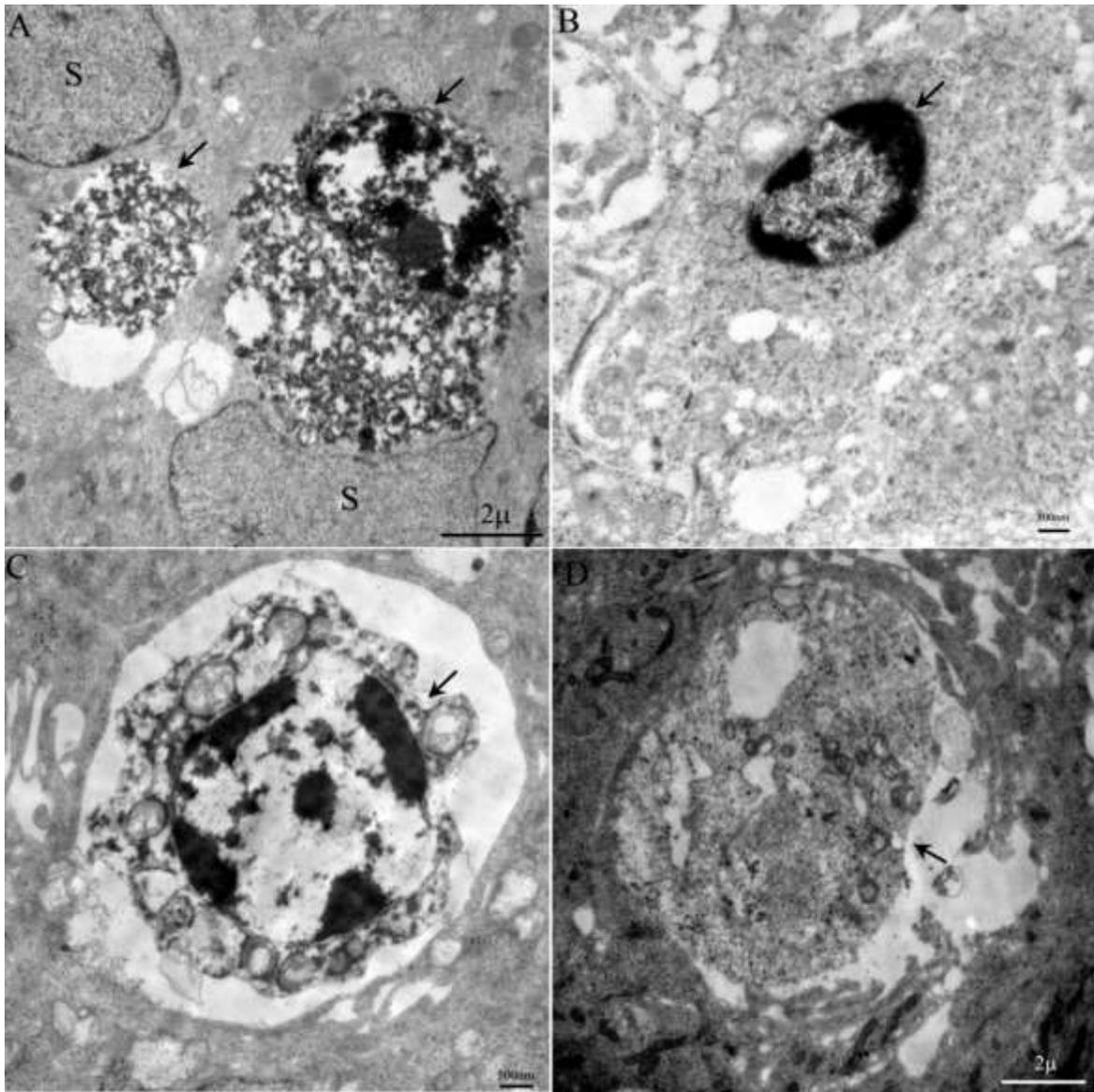


Figura 13.- Micrografías electrónicas de restos celulares y cuerpos apoptóticos de túbulos seminíferos de 18 días de edad. En la figura A se observan dos células con características avanzadas de muerte celular (flechas negras) rodeados por células de Sertoli (S). En la figura B una célula alterada (flecha negra) con la cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear. En la figura C una célula con características tardías rodeada por una membrana (flecha negra). En la figura D restos celulares (flechas negra) productos de procesos de muerte celular.

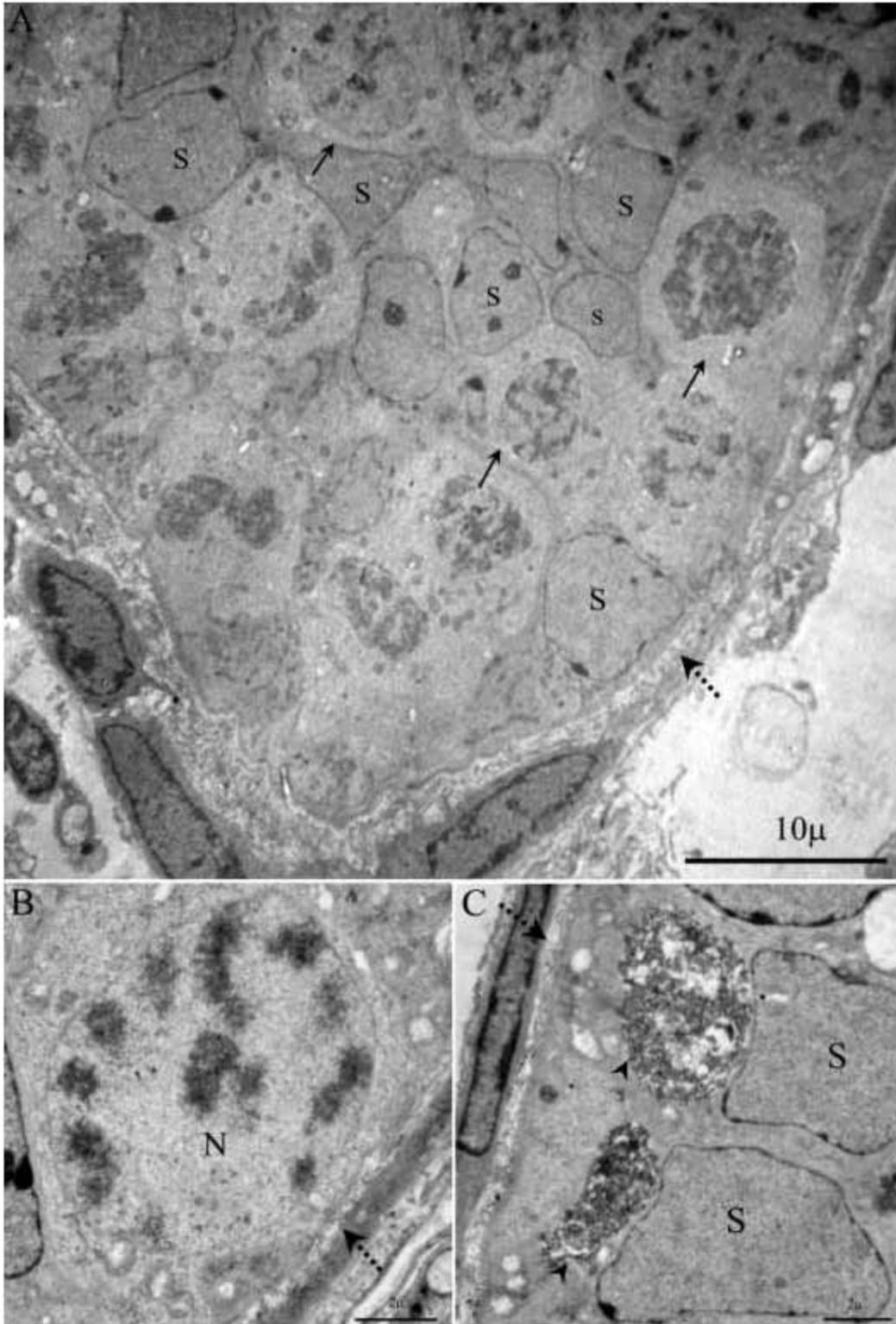


Figura 14.- Micrografías electrónicas de espermatogonias en procesos de muerte celular a 18 días de edad. En la figura A se observa una micrografía panorámica de un túbulo donde se observan células alteradas (flechas negras) en el compartimento basal. Membrana basal (flechas punteadas) células de Sertoli (S). En la figura B una espermatogonia con cromatina fragmentada. Núcleo (N) Membrana basal (flecha punteada). En la figura C dos células con cromatina compacta cercanas a la membrana basal (flecha punteada) rodeados por células de Sertoli (S).

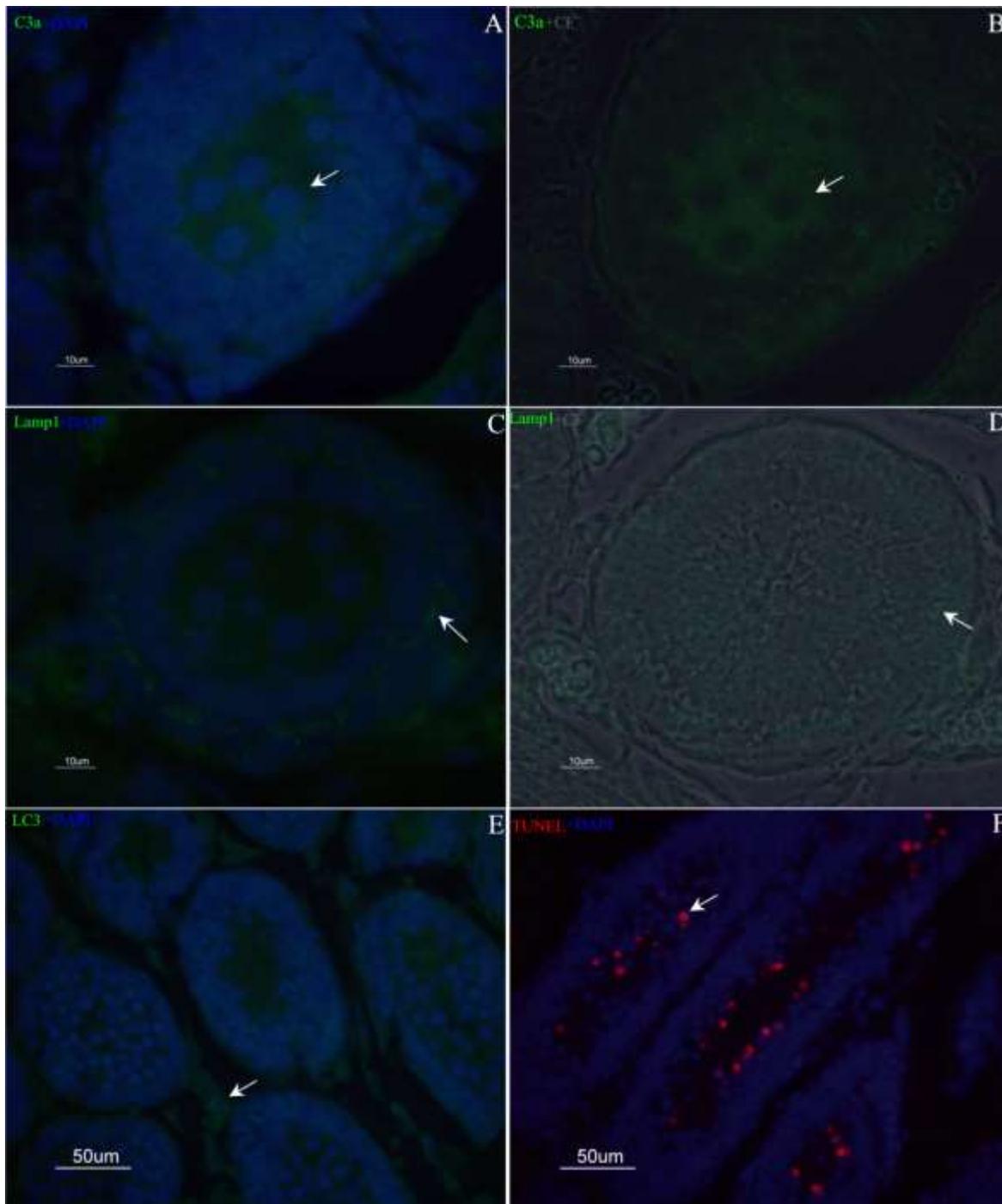


Figura 15.- Inmunolocalizaciones en cortes de túbulos seminíferos de rata de 18 días de edad. En las imágenes A y B inmunolocalización de Caspasa-3 activa, en la imagen A con sobreposición con DAPI, y en la imagen B con sobreposición con contraste de fases. Se puede apreciar el marcaje positivo (flechas blancas) en el citoplasma de espermatocitos primarios en la zona adluminal del túbulo. En la imagen C y D una inmunolocalización de Lamp-1, la imagen C una sobreposición con DAPI y la D con contraste de fases. En estas imágenes se muestra un marcaje positivo (flechas Blancas) cerca de la membrana basal, en la zona que corresponde a las células de Sertoli, las cuales se aprecian mejor en la imagen D. En la imagen E una inmunolocalización de LC3 sobrepuesta con DAPI, en la que no se encontró marcaje positivo, excepto en las células de Leydig fuera de los túbulos seminíferos (flechas blancas). En la imagen F la técnica de TUNEL sobrepuesta con DAPI donde se aprecian células TUNEL positivas (flechas blancas) en la zona adluminal del túbulo seminífero correspondiente a espermatocitos primarios.

25 días

Características generales del túbulo

A la edad de 25 días de edad los túbulos seminíferos están formados de varias capas celulares, estos túbulos muestran un aumento en el diámetro del lumen central en comparación a los de 18 días. En esta edad se observaron a diferentes asociaciones celulares, similares a diferentes estadios del ciclo espermatogénico del epitelio seminífero descrito en ratas adultas. Se presentaron diferentes tipos celulares entre los se incluyeron espermatogonias A, y espermatocitos primarios en las etapas de cigoteno y paquiteno tardío. Esta asociación celular es particularmente parecida al estadio XII del ciclo del epitelio seminífero en adulto. En otros túbulos se observa espermatogonias tipo B y espermatocitos transitando de preleptoteno a la profase meiótica I, además de algunos espermatocitos en paquiteno, la cual es una asociación celular similar a los estadios VI-VIII del ciclo espermatogénico en ratas adultas. En algunos de estos espermatocitos, el cuerpo XY fue encontrado cerca del nucleolo.

Características morfológicas del proceso de eliminación

A 25 días se observa un claro aumento en la cantidad de espermatocitos primarios alterados, y en la cantidad de células apoptóticas en comparación a 18 días (Figura 16). En las micrografías electrónicas se encuentran las mismas alteraciones tempranas observadas en los espermatocitos primarios a los 18 días (pérdida de forma y tamaño celular, discontinuidad de la envoltura interna del núcleo, pérdida de las uniones celulares y dilatación de las cisternas mitocondriales) (Figura17). Se presentan una abundante cantidad de células en apoptosis con características tardías evidenciadas por la compactación de la cromatina y la contracción celular (Figuras 18A, 18B y 18C).

A esta edad tampoco se observó la presencia de vesículas autofágicas en el citoplasma de los espermatocitos, sin embargo se encontraron algunos túbulos con algunas células necróticas en su luz, las cuales presentaban una membrana plasmática dañada y una lisis de su núcleo, citoplasma y organelos (Figura 18D).

Inmunolocalización de biomarcadores de apoptosis y autofagia

En esta edad se observa un aumento de espermatocitos primarios positivos a caspasa-3 activa, a TUNEL, y a Lamp-1, y no se encontró marca positiva de LC3 (Gráfica 1).

Los resultados de la identificación de caspasa-3 activa indican que hay un aumento de células marcadas con respecto a 18 días, estos espermatocitos muestran una marca citoplasmática en células irregulares con características iniciales de muerte celular, y un marcaje nuclear en células en un proceso más avanzado de muerte celular (Figura 19A) (Gráfica 1). También se muestra un aumento de células TUNEL positivas, las marcas corresponden principalmente a células apoptóticas (Figura 19D) (Gráfica 1).

Se identificaron espermatoцитos con la marca de Lamp-1, sin embargo no se considera que puedan estar asociados con una ruta de muerte celular (Figura 19B). A esta edad tampoco se encontró marca positiva de LC3 dentro del túbulo (Figura 19C).

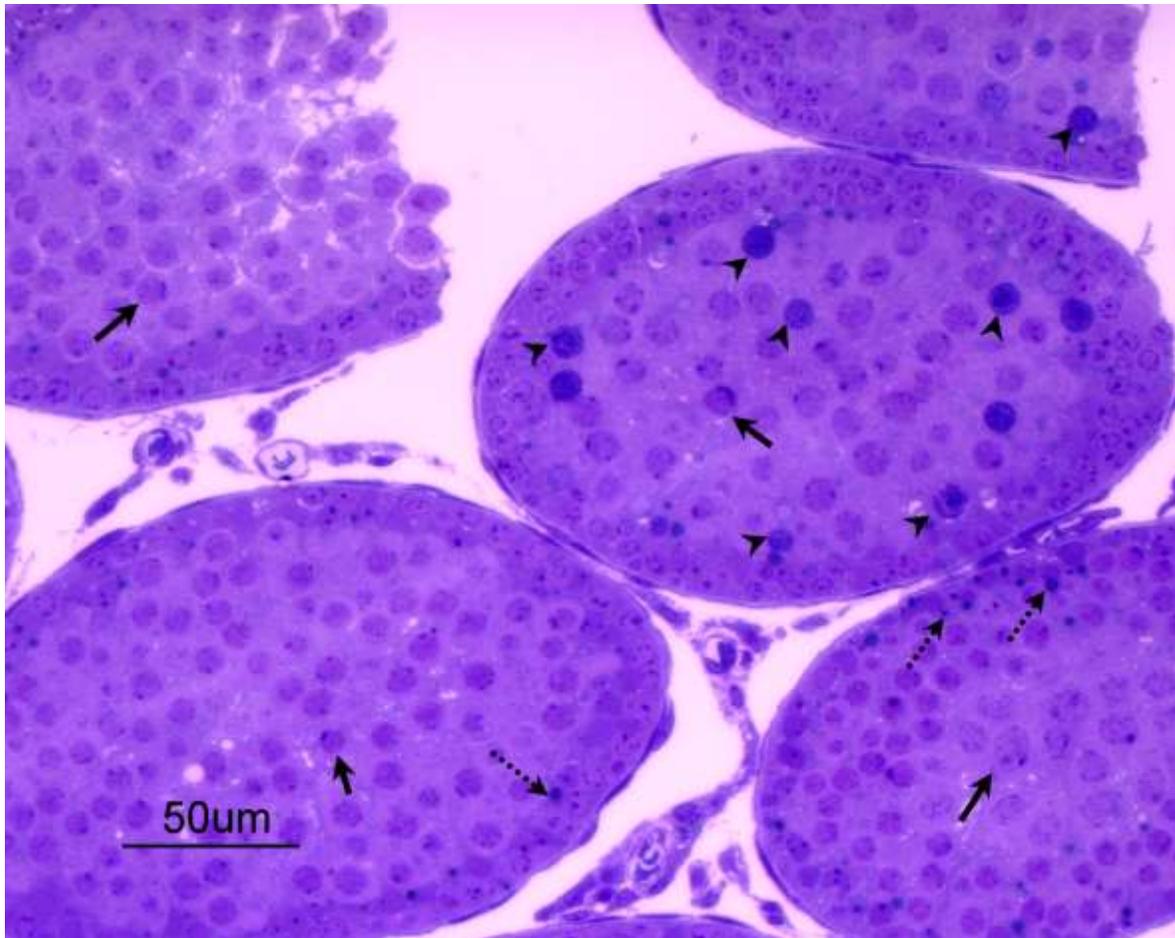


Figura 16.- Cortes semifinos transversales de túbulo seminíferos de ratas de 25 días de edad. En esta imagen se observan túbulo seminíferos con una gran cantidad de células alteradas señaladas con flechas negras, células apoptóticas avanzadas señaladas con cabezas de flecha hacia el centro del túbulo y cuerpos apoptóticos señalados con flechas punteadas. Tinción con azul de toluidina.

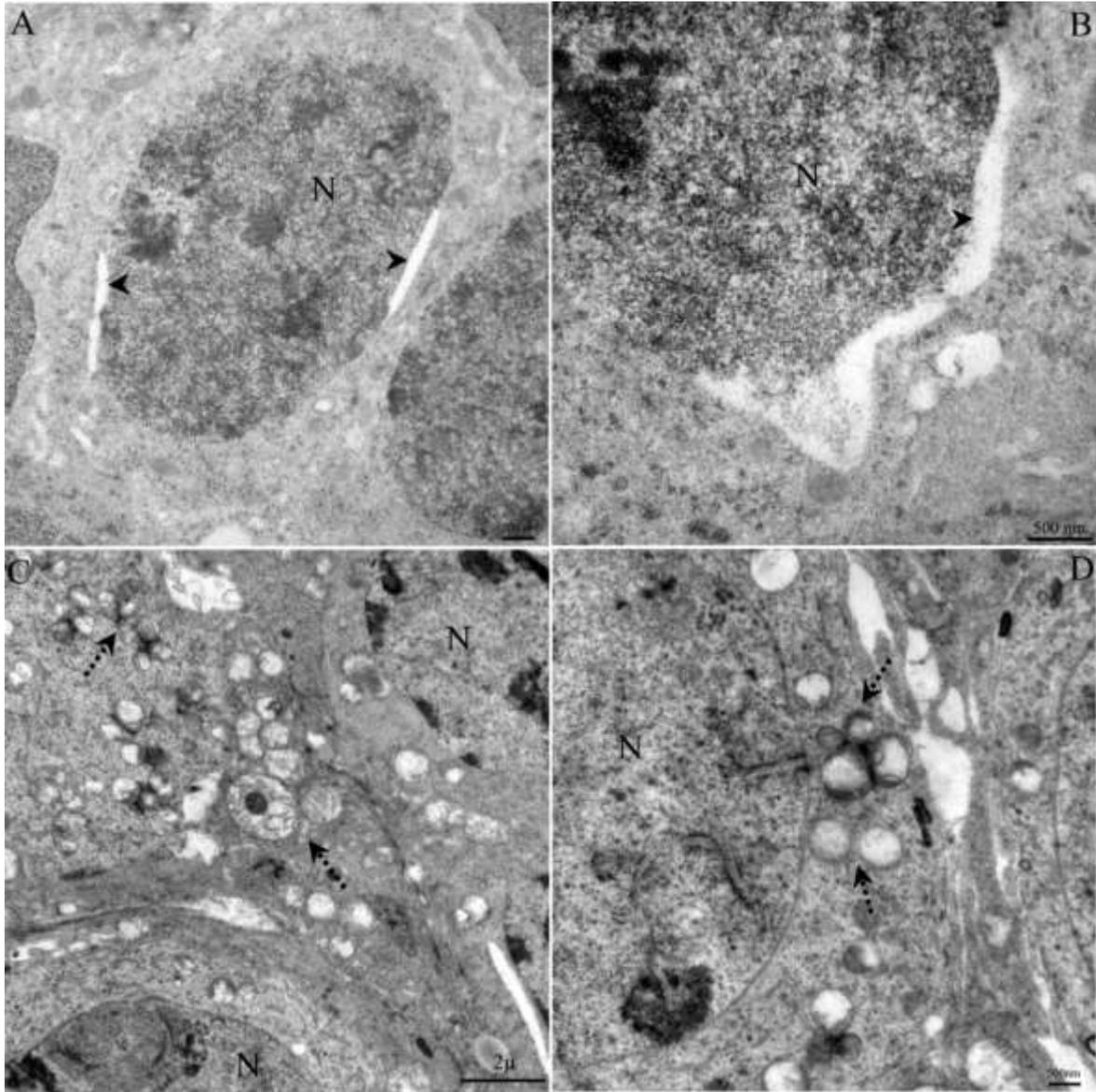


Figura 17.- Micrografías electrónicas de células alteradas de túbulos seminíferos de ratas de 25 días de edad. En la figura A y B se observan espermatoцитos primarios cuyo núcleo (N) se observa aparentemente sano, pero presentan una discontinuidad de la envoltura interna del núcleo (cabezas de flecha). En la figura C y D se aprecian espermatoцитos primarios con núcleos (N) aparentemente sanos, y mitocondrias con crestas dilatadas (flechas punteadas).

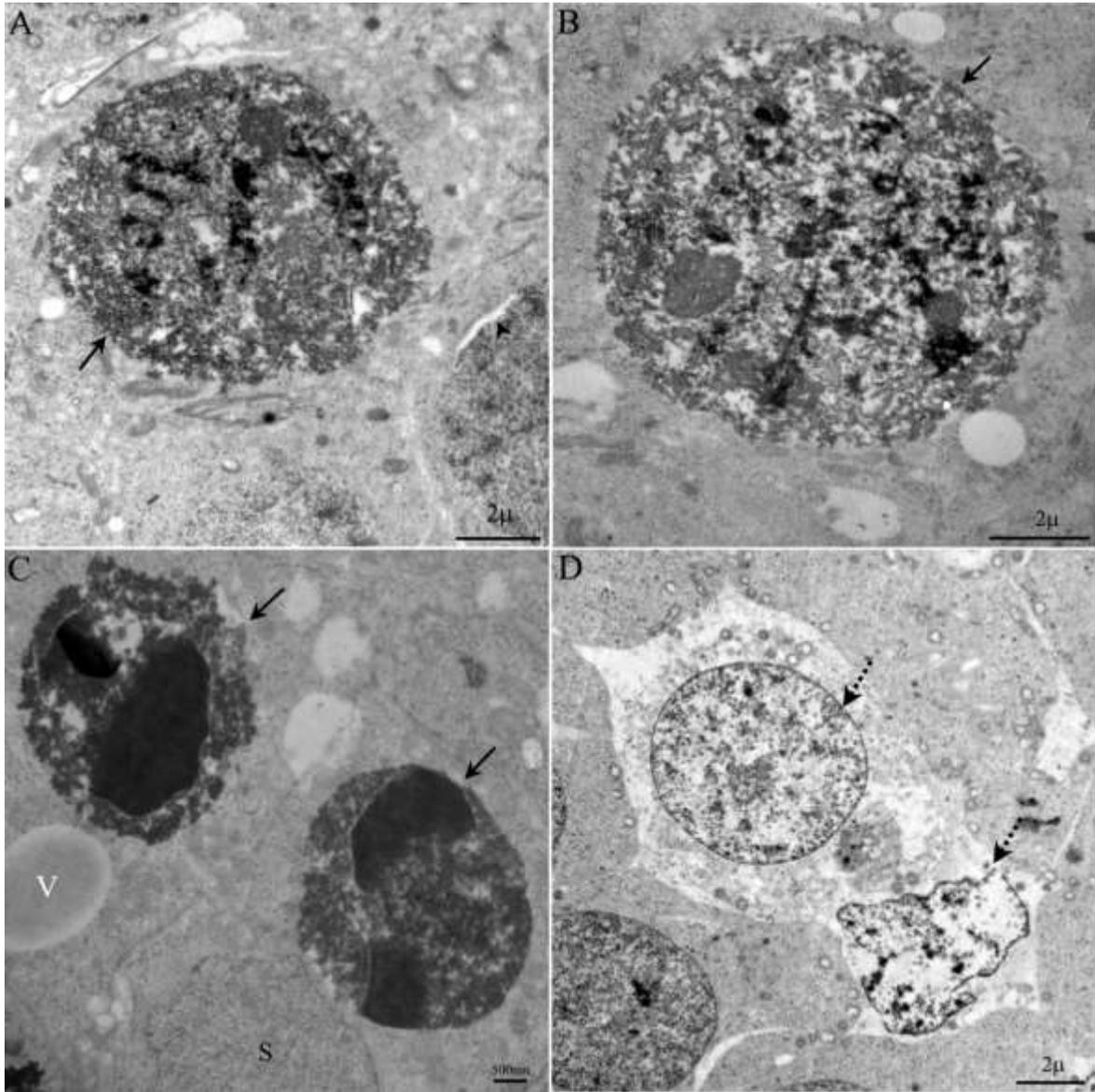


Figura 18.- Micrografías electrónicas de cuerpos residuales de túbulos seminíferos de ratas de 25 días de edad. En las figuras A, B y C se encuentran células apoptóticas (flechas negras). En estas imágenes se observan células con retracción celular y compactación de cromatina, que están acompañadas de células alteradas como en la figura A donde se muestra una célula con una discontinuidad de su envoltura interna nuclear, o como en la figura C acompañada de otras células apoptóticas con cromatina compacta . En la figura D se aprecian células con apariencia necrótica (flechas punteadas) las cuales perdieron la integridad de su membrana plasmática y presentan un proceso de cariólisis.

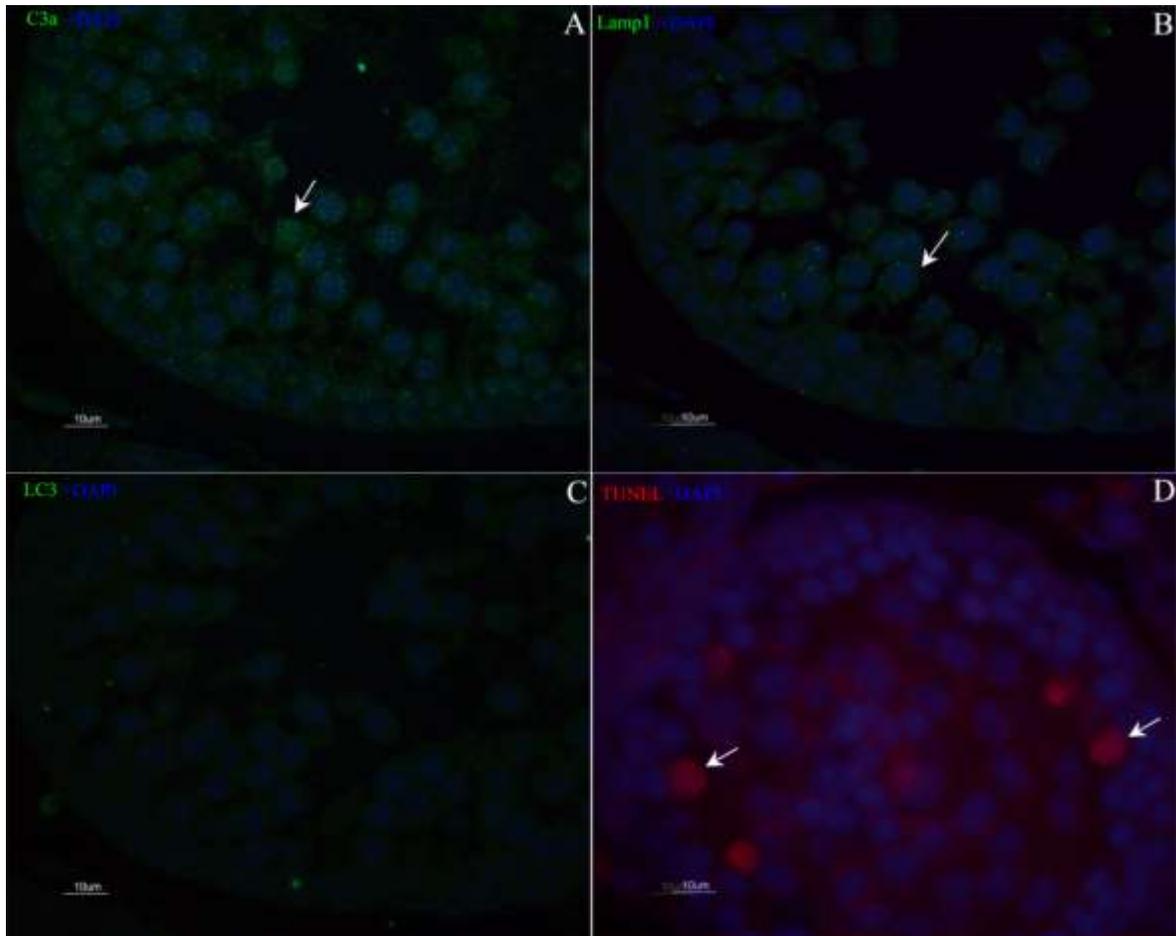


Figura 19.- Inmunolocalizaciones en cortes de túbulos seminíferos de rata de 25 días de edad. Todas las imágenes con sobreposición de DAPI. Figura A inmunolocalización de caspasa-3 activa. Se puede observar un aumento en la cantidad de espermatoцитos primarios marcados con respecto a 18 días. Sin embargo, algunos espermatoцитos no solamente están marcados en el citoplasma, sino también en el núcleo (flecha blanca). Figura B espermatoцитos con marca positiva a Lamp-1 (flecha blanca). Figura C inmunolocalización de LC3. Se aprecian células marcadas dentro del túbulo seminífero. Figura D células TUNEL positivas (flechas blancas) dentro del túbulo seminífero correspondientes a espermatoцитos primarios.

27 días

Características generales del túbulo

A la edad de 27 días, los túbulos seminíferos presentaron asociaciones similares al epitelio seminífero observado en la edad de 25 días, aunque a diferencia de 25 días se observó un aumento en el tamaño del túbulo seminífero, en el diámetro de la luz del túbulo seminífero.

Características morfológicas del proceso de eliminación

En las micrografías electrónicas túbulos seminíferos se encontraron un gran número de células germinales en proceso de muerte celular (Figuras 20 y 21). Se observa un gran número de espermatoцитos primarios con características iniciales de muerte celular, y también un aumento en la presencia de células apoptóticas en la zona basal y en la adluminal del túbulo en comparación a la edad de 25 días (Figura 22).

A esta edad también se llegaron a observar esporádicamente células de apariencia necrótica en la luz de los túbulos. Y tampoco se identificaron vesículas autofágicas en los espermatoцитos primarios.

Inmunolocalización de biomarcadores de apoptosis y autofagia

A esta edad se observa una disminución en el número de células con marcaje positivo a caspasa-3 activa y un aumento de células marcadas con la técnica de TUNEL. Se identificaron espermatoцитos primarios con marcaje positivo a las proteínas LC3 y Lamp-1 (Gráfica 1).

Los resultados de la inmunolocalización de caspasa-3 activa indican que hay una disminución de células marcadas a esta proteasa (Gráfica 1). En los espermatoцитos primarios se sigue observando los dos tipos de marca tanto en citoplasma, como en el núcleo. El marcaje nuclear se observa sobre todo en células con procesos avanzados de muerte celular (Figuras 23A y 23B). Se muestra también un aumento en células TUNEL positivas dentro del túbulo. Estas se correlacionan directamente con la cantidad de células apoptóticas (Figura 23D) (Gráfica 1).

A esta edad no se encontraron espermatoцитos primarios con marca clara para Lamp-1 (Figura 23C). Se identificaron espermatoцитos primarios positivos a la proteína LC3. (Figuras 23E y 23F).

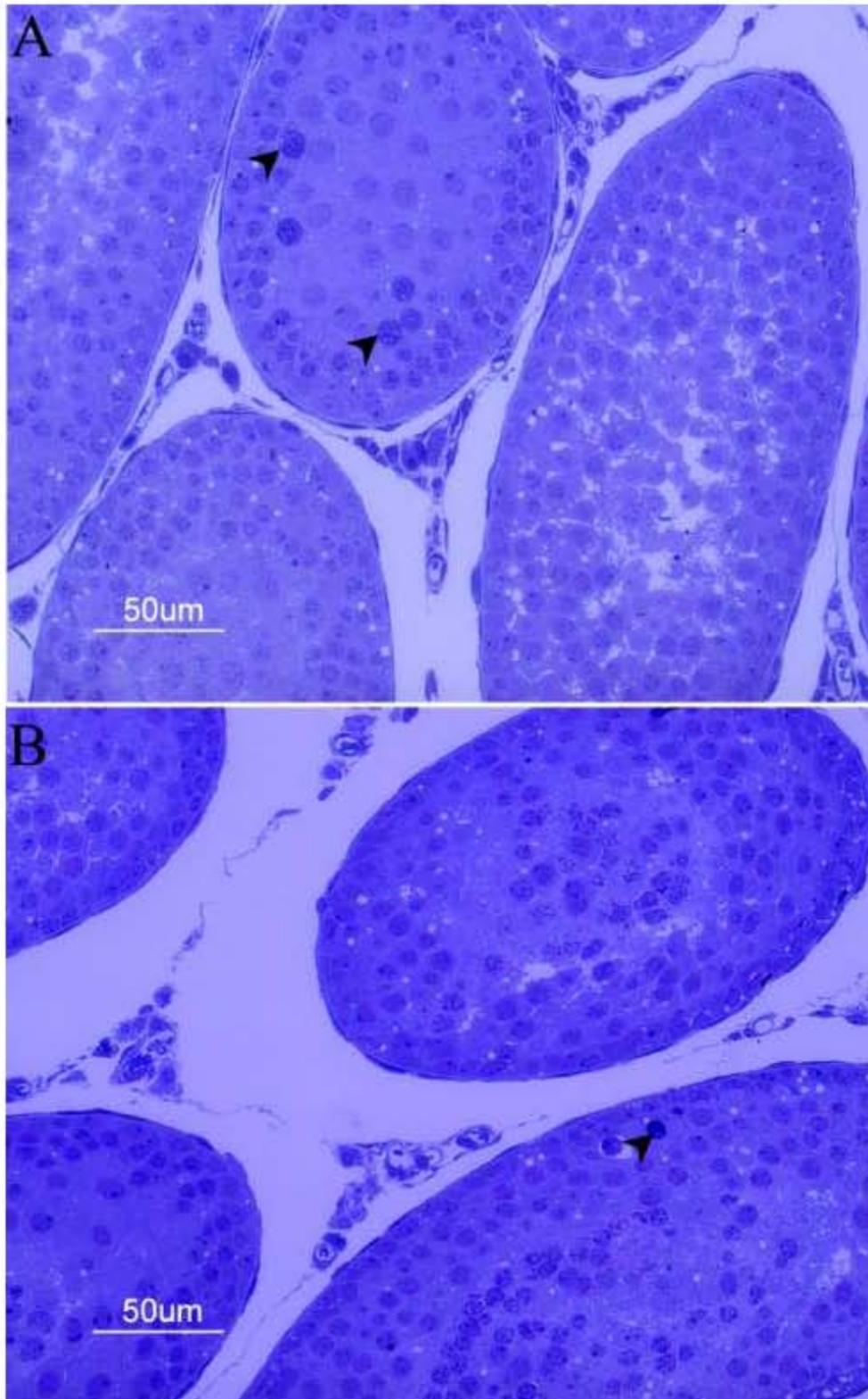


Figura 20.- Cortes semifinos de túbulos seminíferos de ratas de 27 días de edad. En la figura A se observan una gran cantidad de células apoptóticas marcados con cabezas de flecha en la zona adluminal correspondiente a los espermatocitos primarios, y en la figura B células apoptóticas (cabezas de flecha) en la zona basal correspondiente a las espermatogonias. Tinción con azul de toluidina.

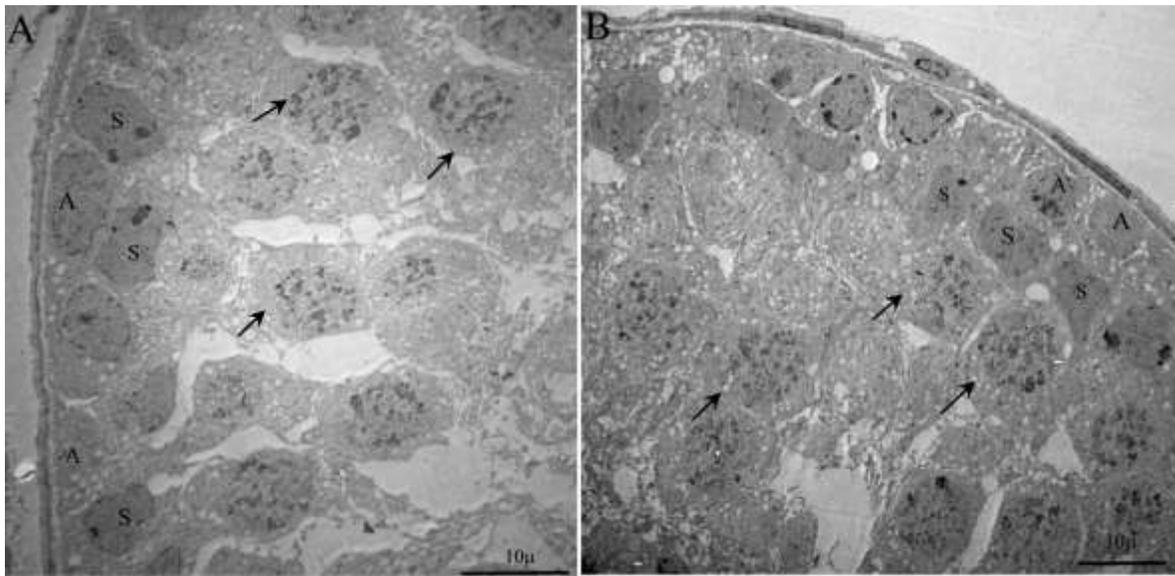


Figura 21.- Micrografías electrónicas panorámicas de túbulos seminíferos de ratas de 27 días de edad. En estas figuras se aprecia la estructura del epitelio, en donde se observan espermatogonias A (A), células de Sertoli (S), y espermatocitos primarios en sus diferentes fases de la profase meiótica. La mayoría de los espermatocitos primarios están alterados casi en su totalidad (flechas negras).

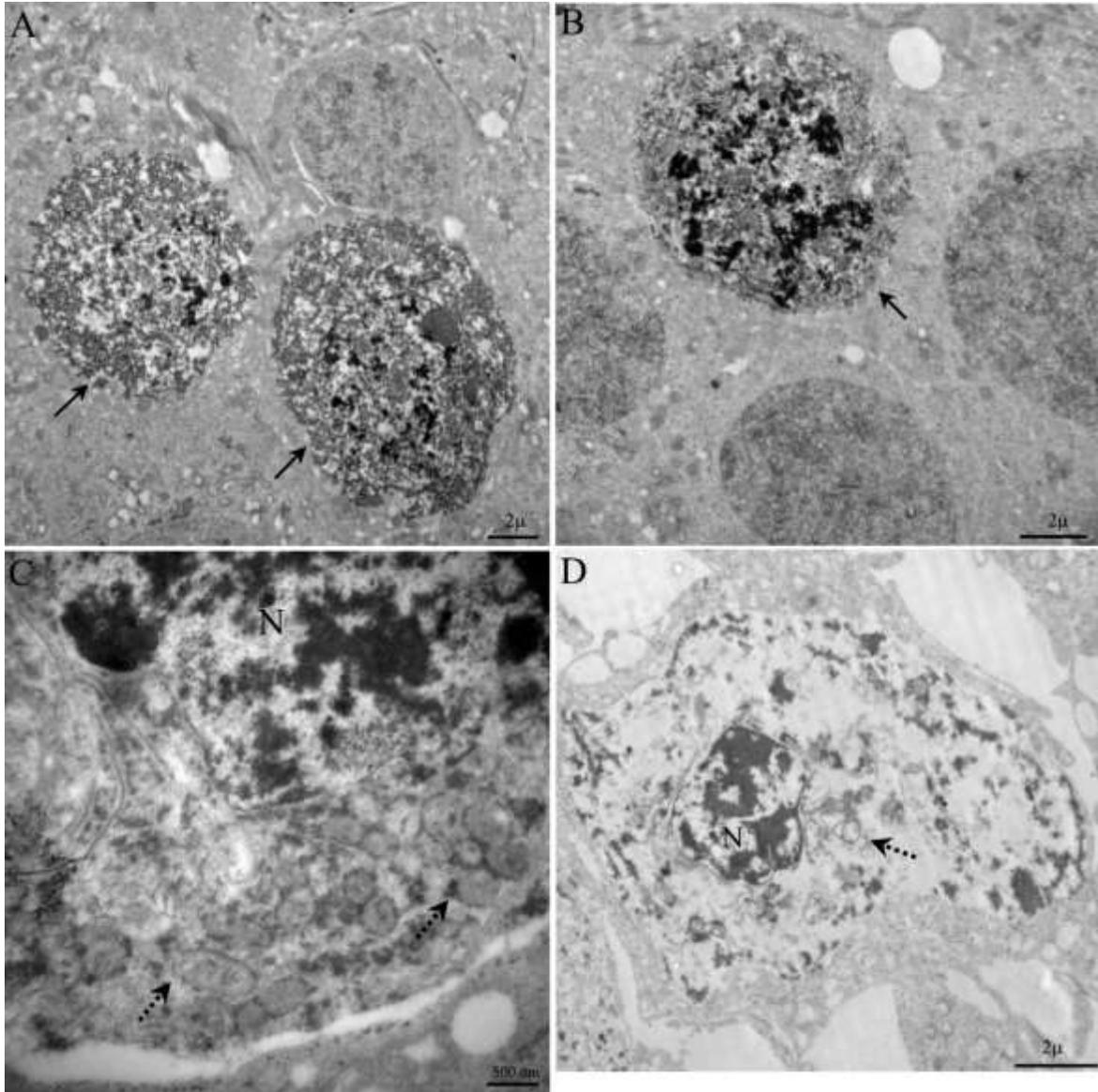


Figura 22.- Micrografías electrónicas de cuerpos apoptóticos de túbulos de ratas de 27 días de edad. En todas las figuras se observan células apoptóticas (flechas negras) caracterizadas por la contracción celular y la presencia de cromatina compacta en el núcleo (N). En las figuras C y D se aprecian cuerpos membranosos dilatados (flechas punteadas).

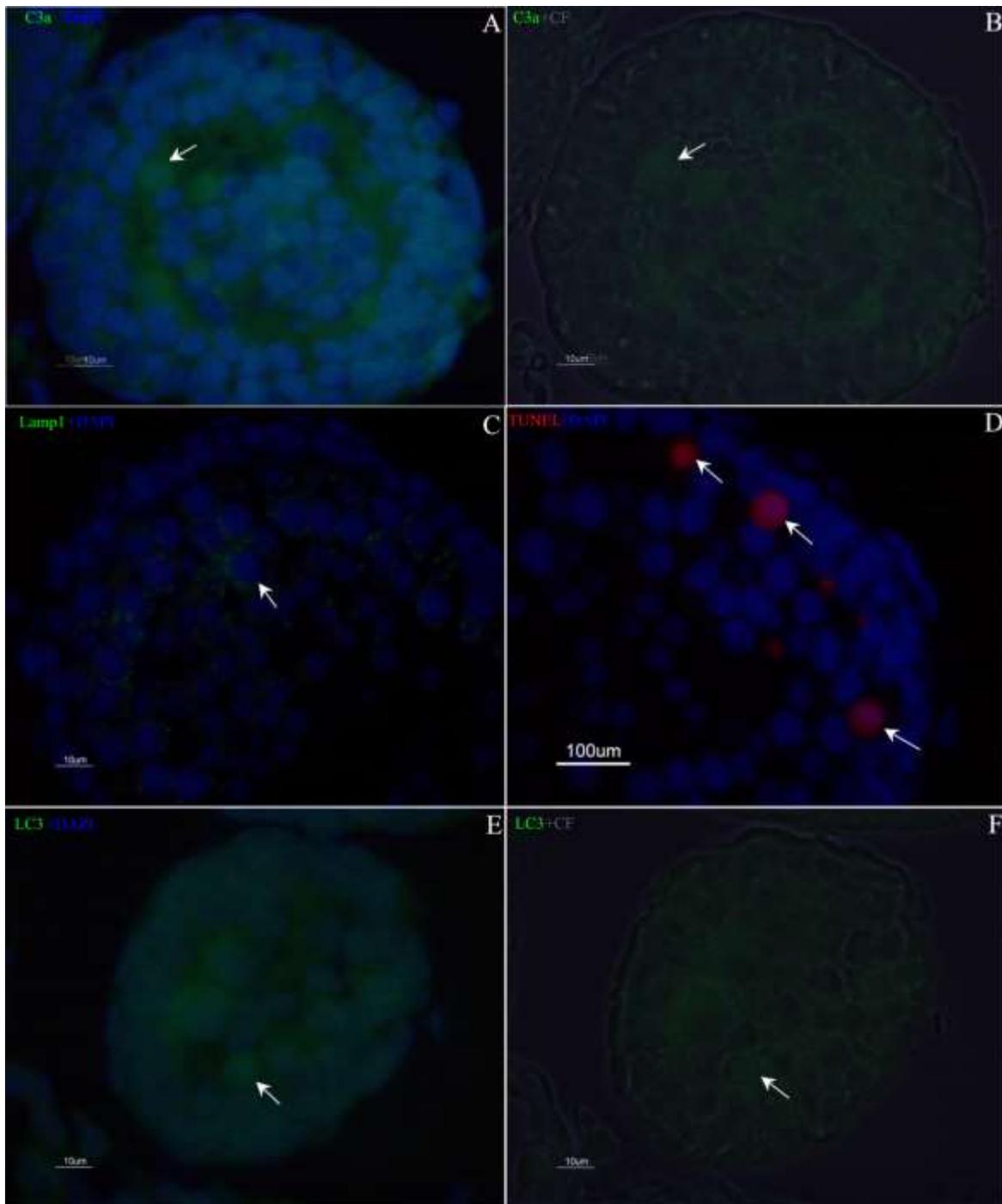


Figura 23.- Inmunolocalizaciones en cortes de túbulos seminíferos de rata de 27 días de edad. Figuras A y B inmunolocalización de caspasa-3 activa, en la imagen A una sobreposición con DAPI y en la imagen B una sobreposición con contraste de fases. Se observa el marcaje positivo en espermatocitos primarios, además de observarse marca citoplásmica, se observa marca nuclear en células apoptóticas (flechas blancas). En la imagen C se aprecian algunos espermatocitos con marca positiva a Lamp-1 en el centro del túbulo (flechas blancas). En la imagen D células TUNEL positivas (flechas blancas) en abundancia. Estas células marcadas corresponden morfológicamente a células con características apoptóticas avanzadas. Figuras E y F inmunolocalización de LC3. En la imagen E se observa una sobreposición con DAPI y en la imagen F una sobreposición con contraste de fases. En estas imágenes se observa marca positiva a LC3 en citoplasma en espermatocitos con características iniciales de muerte, y marca positiva en núcleo en espermatocitos con un proceso de muerte celular más avanzado (flechas blancas).

32 días

Características generales del túbulo

El epitelio de los túbulos seminíferos a la edad de 32 días, es altamente heterogéneo. A esta edad se encuentran diferentes asociaciones celulares y un aumento en el diámetro de la luz del túbulo seminífero con respecto a 27 días. Algunos de los túbulos seminíferos presentaron espermatogonias tipo A, espermatocitos primarios en paquitenio temprano y espermatidas redondeadas que corresponde a los estadios I-III del ciclo espermatogénico en la rata adulta. Se observaron en otros túbulos seminíferos asociaciones celulares como preleptotenos y espermatocitos primarios en paquitenio y espermatidas correspondientes a los estadios VI-VIII, y espermatogonias A, espermatocitos primarios en cigoteno y paquitenos tardíos que corresponden a los estadios XI y XII del ciclo espermatogénico en la rata adulta. En esta etapa se encuentra establecida completamente la barrera hematotesticular (Figuras 24A, 24B y 25A).

A mayores aumentos en las micrografías electrónicas se observaron procesos de división celular en el centro del túbulo y espermatidas en desarrollo (Figuras 25B y 25C). A esta edad ya se aprecian espermatocitos primarios sanos.

Características morfológicas del proceso de eliminación

A esta edad se siguieron encontrando células que presentaban características iniciales y tardías de muerte celular en los túbulos aunque hubo una disminución en la cantidad de células encontradas con respecto a las edades anteriores (Figuras 25D y 26). Se siguieron encontrando células necróticas y pocas vesículas en los espermatocitos. Las células que siguieron sufriendo procesos de muerte celular fueron los espermatocitos primarios.

Inmunolocalización de biomarcadores de apoptosis y autofagia

A esta edad se observó una disminución en el número de células con marcaje positivo caspasa-3 activa y a TUNEL (Gráfica 1). Se encontraron células con marca positiva a Lamp-1, pero no se encontraron células marcadas positivamente a LC3.

Los resultados de la identificación de caspasa-3 activa indican que hay una disminución considerable de espermatocitos primarios marcados con esta proteína. Entre los espermatocitos primarios marcados se siguió observando marca tanto en citoplasma, como en núcleo (Figura 27A) (Gráfica 1). Se muestra también una disminución considerable de células TUNEL positivas dentro del túbulo (Figura 27D) (Gráfica 1).

Se encontraron células marcadas a Lamp-1 en la zona de desarrollo de las espermatidas, la cual está vinculada con su propia actividad fisiológica (Figura 27B). En cuanto a la LC3 no se identificaron células marcadas a esta edad (Figura 27C).

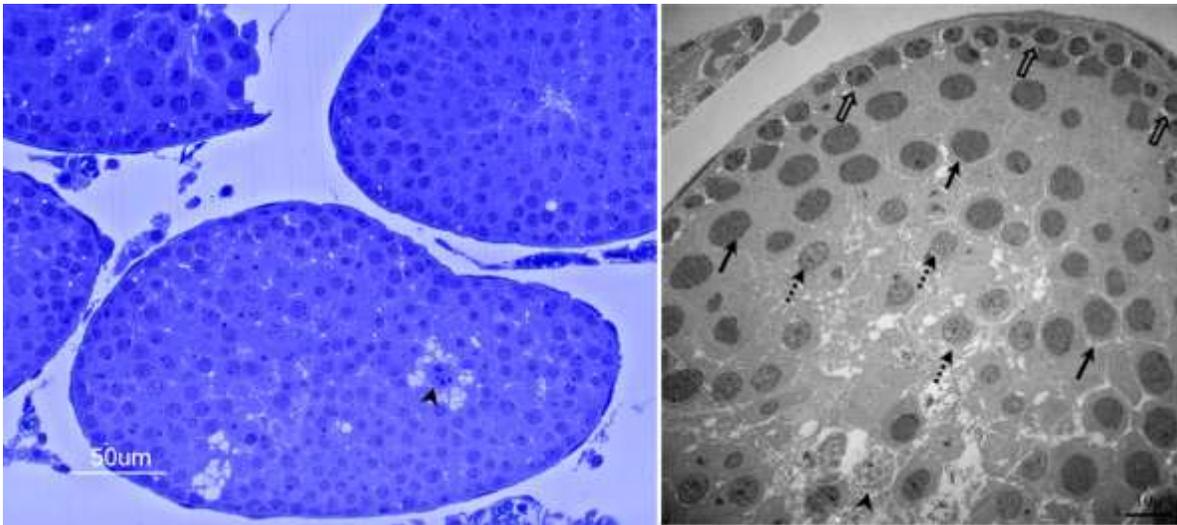


Figura 24.- Cortes de túbulos seminíferos de ratas de 32 días de nacidas. En la figura A se muestran cortes semifiños transversales de túbulos seminíferos de ratas de 32 días de edad teñidos con azul de toluidina. Se observan túbulos con pocas células en proceso de muerte celular (cabezas de flecha). En la figura B se aprecia una micrografía electrónica panorámica de cortes ultrafinos de túbulos seminíferos de ratas de 32 días de edad donde se observan capas definidas del epitelio seminífero, y células en proceso de muerte celular hacia la luz del túbulo (cabezas de flecha). Espermatogonias (flechas vacías), espermatocitos primarios (flechas negras), espermatidas (flechas punteadas).

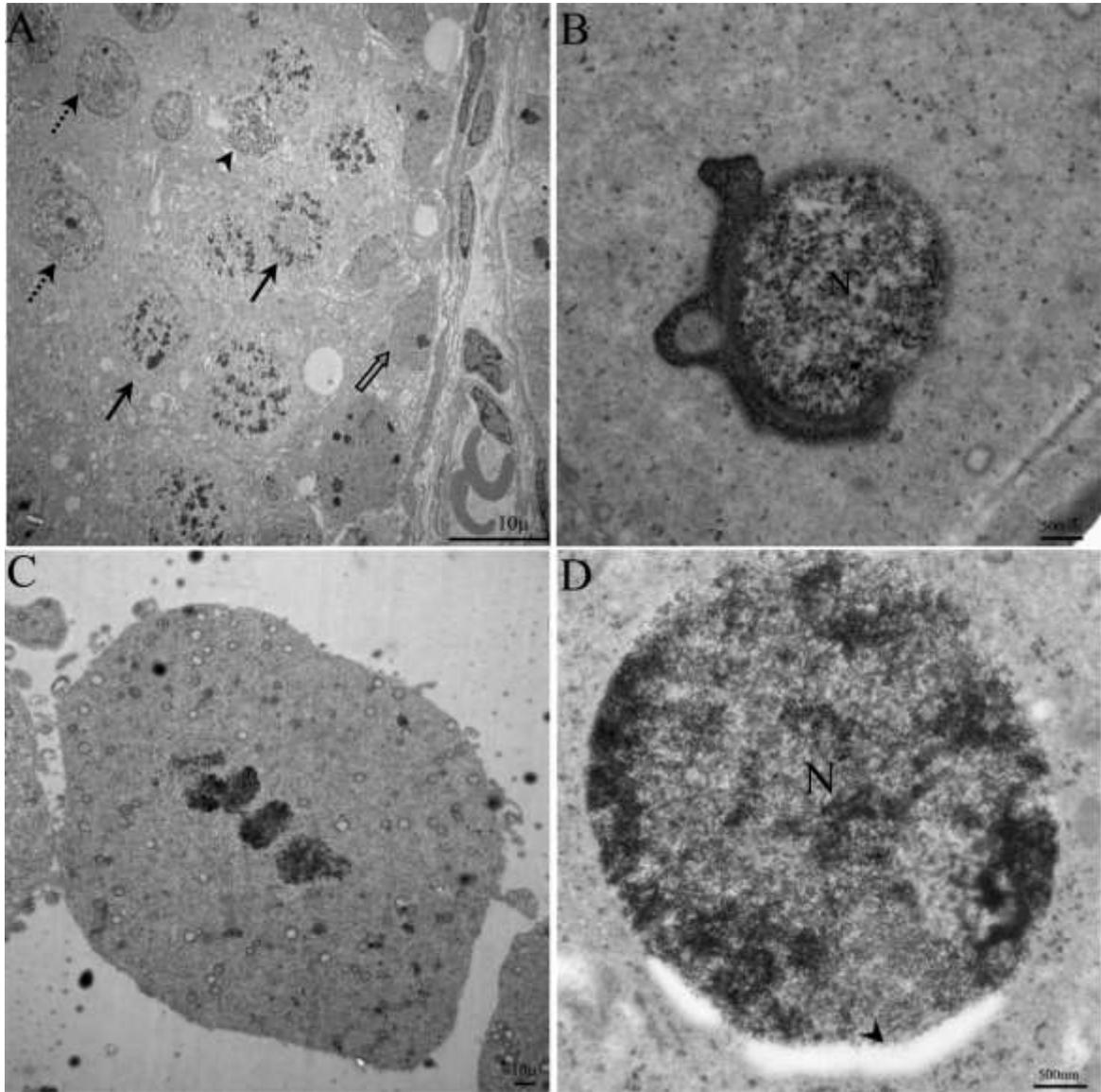


Figura 25.- Micrografías electrónicas de células de túbulos seminíferos de ratas de 32 días de edad. En la figura A se muestra una micrografía panorámica en la que se observa la estructuración del epitelio seminífero a esta edad y los tipos celulares que lo conforman. Espermatogonias A (flechas vacías), espermatocitos primarios (flechas negras), espermatidas (flechas punteadas), también se distinguen algunos cuerpos apoptóticos (cabezas de flecha). En la figura B se aprecia una espermatida en desarrollo con un núcleo (N) sano. En la figura C una célula en división celular en metafase. En la figura D se observa un espermatocito primario con un núcleo (N) con cromatina sin alteraciones aparentes y una discontinuidad de la envoltura interna (cabeza de flecha).

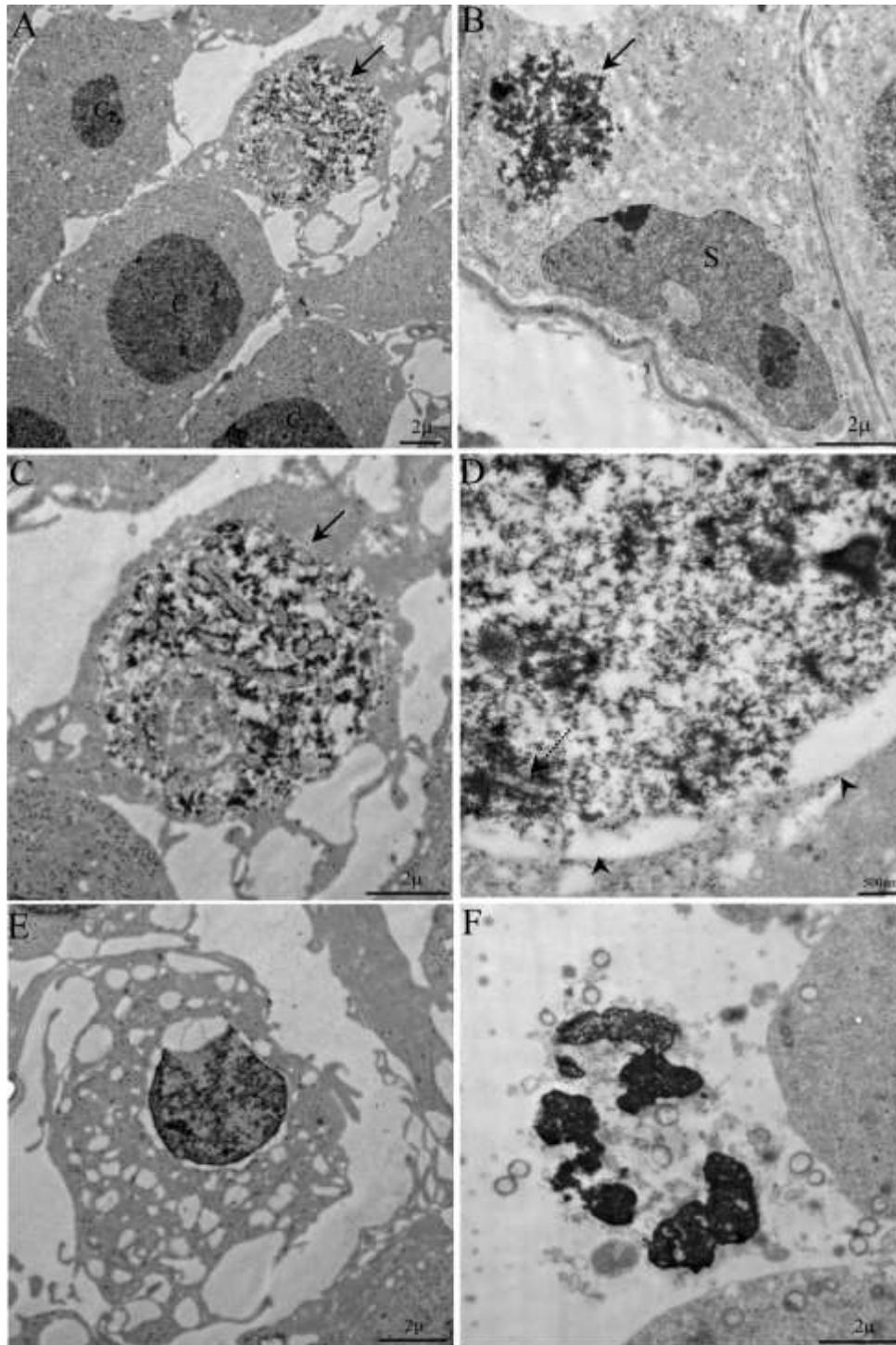


Figura 26.- Micrografías electrónicas de cuerpos residuales de túbulos seminíferos de ratas de 32 días de edad. En las figura A, B, C y D se muestran células apoptóticas con características tardías (flechas negras). En la figura A se observa una célula apoptótica rodeada de espermatocitos primarios en fase de cigoteno (C) a mayor aumento se aprecia en la figura C la célula con cromatina compacta y encogimiento celular. En la figura B se aprecia una célula apoptótica a lado de una célula de Sertoli. En la figura D se muestra una célula apoptótica con cromatina compacta y discontinuidad de la envoltura interna del núcleo (cabezas de flecha) que se encuentra en la fase de paquiteno por la presencia del complejo sinaptonémico (flecha punteada). En las figuras E y F se observan cuerpos apoptóticos.

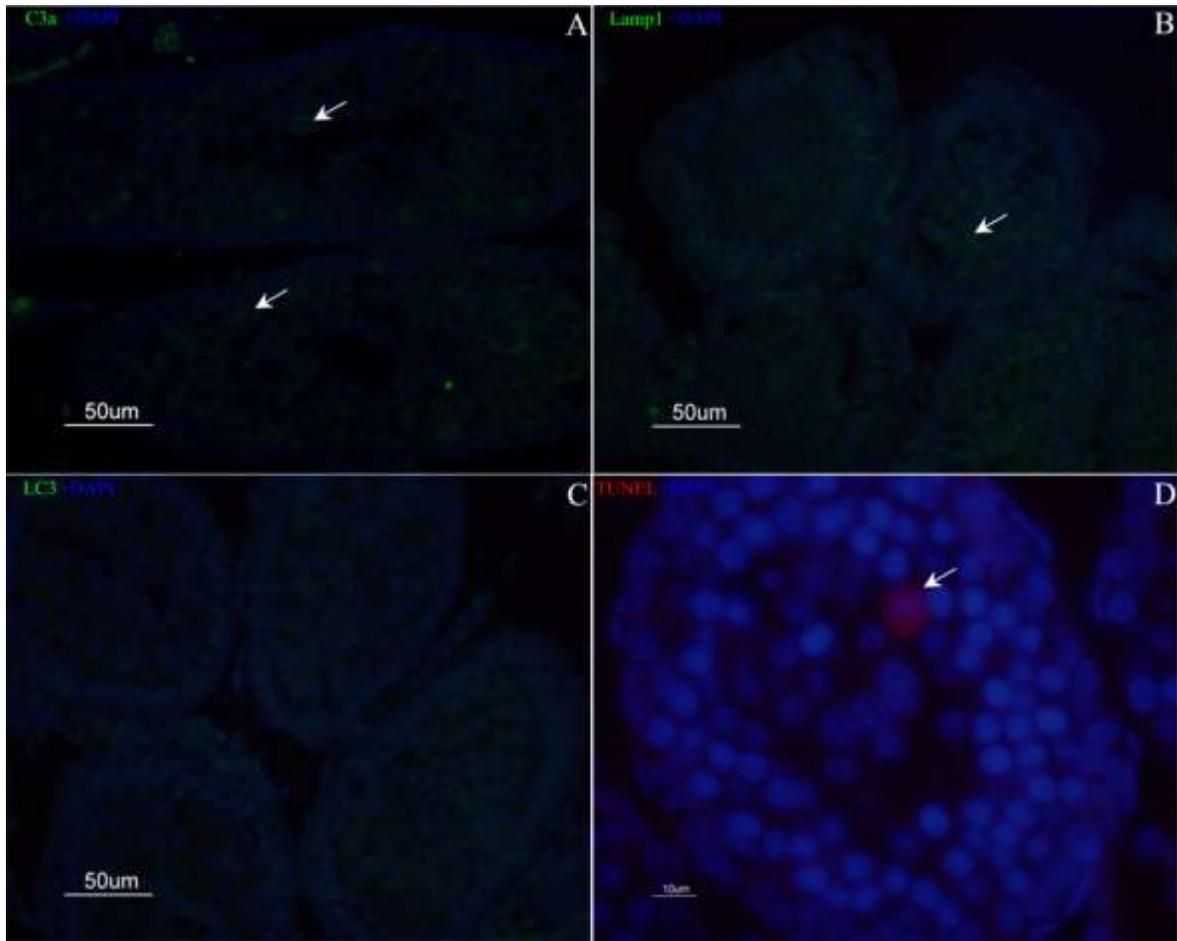


Figura 27.- Inmunolocalizaciones en cortes de túbulos seminíferos de rata de 32 días de edad. Todas las imágenes con sobreposición de DAPI. Figura A inmunolocalización de caspasa-3 activa. Se observa una disminución en la marca con respecto a las edades anteriores. Se sigue viendo marca citoplásmica y nuclear en los espermatozoides primarios (flechas blancas). Figura B. Se observa marca positiva (flecha blanca) a Lamp-1 en espermatozoides primarios hacia la luz del túbulo. Figura C. No se encontró marca positiva en la inmunolocalización de LC3. En la imagen D se observan pocas células positivas a TUNEL (flechas blancas) en comparación de las demás edades.

Análisis de resultados

Clasificación de las características morfológicas e inmunohistoquímicas

En la tabla 1 se muestran las diferentes características morfológicas e inmunohistoquímicas encontradas en espermatoцитos de 18 a 32 días de edad, las cuales fueron clasificadas dependiendo del tipo de muerte celular al que correspondían. En la tabla se muestran las características apoptóticas mostradas en las edades muestreadas. La mayoría de las alteraciones morfológicas iniciales y tardías encontradas en los espermatoцитos son las mismas en las 4 edades y pertenecen a características apoptóticas. La marca de caspasa-3 activa está relacionada con las células con características iniciales, y la marca de TUNEL con los estadios tardíos del proceso y con los cuerpos apoptóticos.

La autofagia morfológicamente no se presenta en ninguna de las edades, ya que únicamente se encontraron vesículas autofágicas en células de Sertoli, de Leydig y en la luz del túbulo. Inmunohistoquímicamente, se encontró marca de LC3 a 27 días de edad, probablemente debido a la actividad fagocítica dentro del túbulo. También se encontró marca de Lamp-1 a 32 días de edad, la cual está vinculada al desarrollo de las espermátidas.

Las células con características necróticas se presentan desde los 25 días hasta los 32 días de edad.

Tabla 1.- Características de muerte celular en túbulos seminíferos de 18 a 32 días de edad.

EDAD/TIPO DE MUERTE CELULAR	APOPTOSIS				AUTOFAGIA		NECROSIS
	CARACTERÍSTICAS INICIALES		CARACTERÍSTICAS FINALES		Presencia de autofagosomas	Marcas inmunohistoquímicas	Lisis celular
	Morfológicas	Marcas inmunohistoquímicas	Morfológicas	Marcas inmunohistoquímicas			
18 DÍAS	☆☆☆☆	+ Caspasa-3 activa	☆☆☆	+TUNEL	Poca o nula cantidad	Marca basal a LAMP1 Nula marca de LC3	No se encontraron
25 DÍAS	☆☆☆☆	+ Caspasa-3 activa, Marca en citoplasma y núcleo	☆☆☆	+TUNEL	Poca o nula cantidad	Marca basal a LAMP1 Nula marca de LC3	1 o 2 células encontradas esporádicamente dentro de los túbulos
27 DÍAS	☆☆☆☆	+ Caspasa-3 activa Marca en citoplasma y núcleo	☆☆☆	+TUNEL (mayor número células marcadas)	Poca o nula cantidad	Marca basal a LAMP1 Marca + de LC3 en citoplasma y en núcleo	1 o 2 células encontradas esporádicamente dentro de los túbulos
32 DÍAS	☆☆☆☆	+ Caspasa-3 activa Marca en citoplasma y núcleo	☆☆☆	+TUNEL (pocas células marcadas)	Poca o nula cantidad	Aumento en la marca a LAMP1 Nula marca de LC3	1 o 2 células encontradas esporádicamente dentro de los túbulos

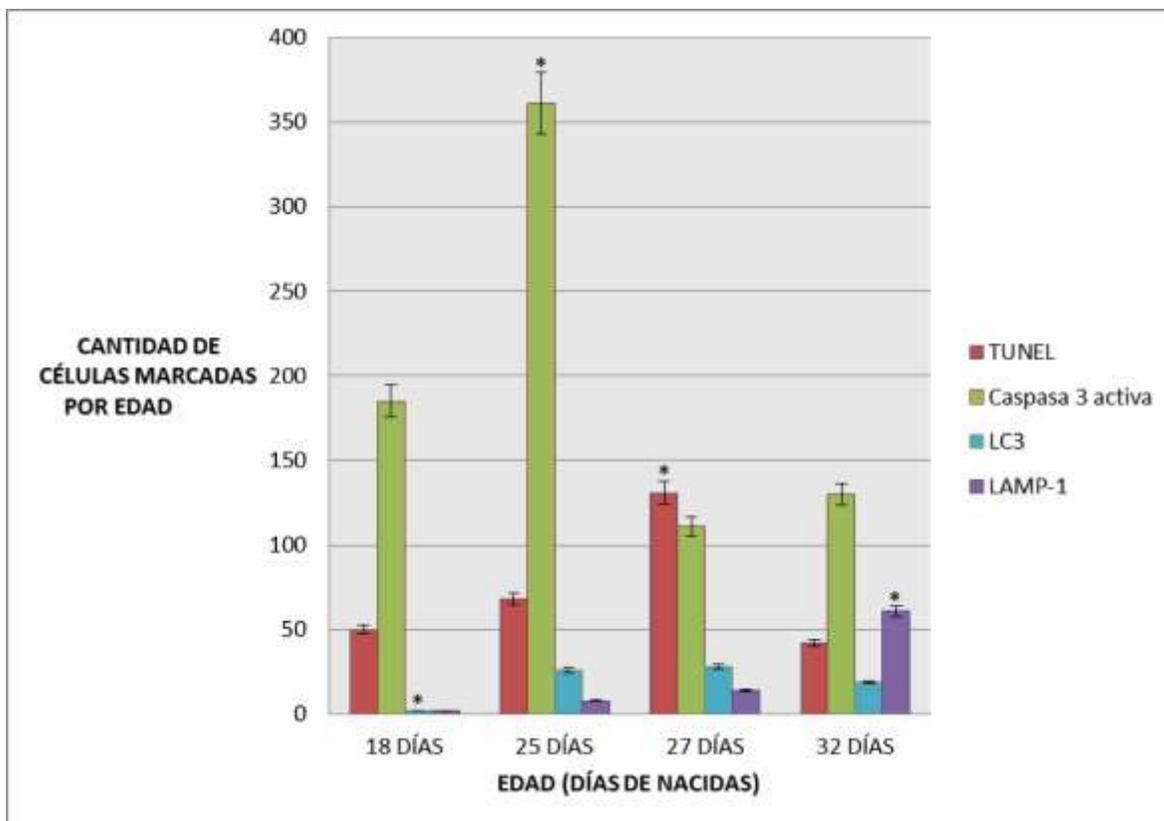
Características apoptóticas

- *Pérdida de forma y tamaño celular
- *Pérdida de conexiones celulares
- *Dilatación de las crestas mitocondriales
- *Discontinuidad de la envoltura interna nuclear

- *Fragmentación nuclear
- *Compactación de la cromatina
- *Fragmentación de los cuerpos apoptóticos

Cuantificación de las marcas inmunohistoquímicas

Las diferentes células positivas para Caspasa-3, Lamp-1, LC3 y a la técnica de TUNEL se encuentran en diferentes cantidades de 18 a 32 días de edad. En la gráfica 1 se observa que la mayor cantidad de células marcadas corresponden a caspasa-3 activa, teniendo su valor más elevado a los 25 días de edad, donde se encontraron alrededor de 350 células marcadas en total de los 30 túbulos muestreados de las 6 ratas por edad. La mayor cantidad de células TUNEL positivas se encontró a 27 días de edad, sin embargo se encuentra bien representada en todas las edades.



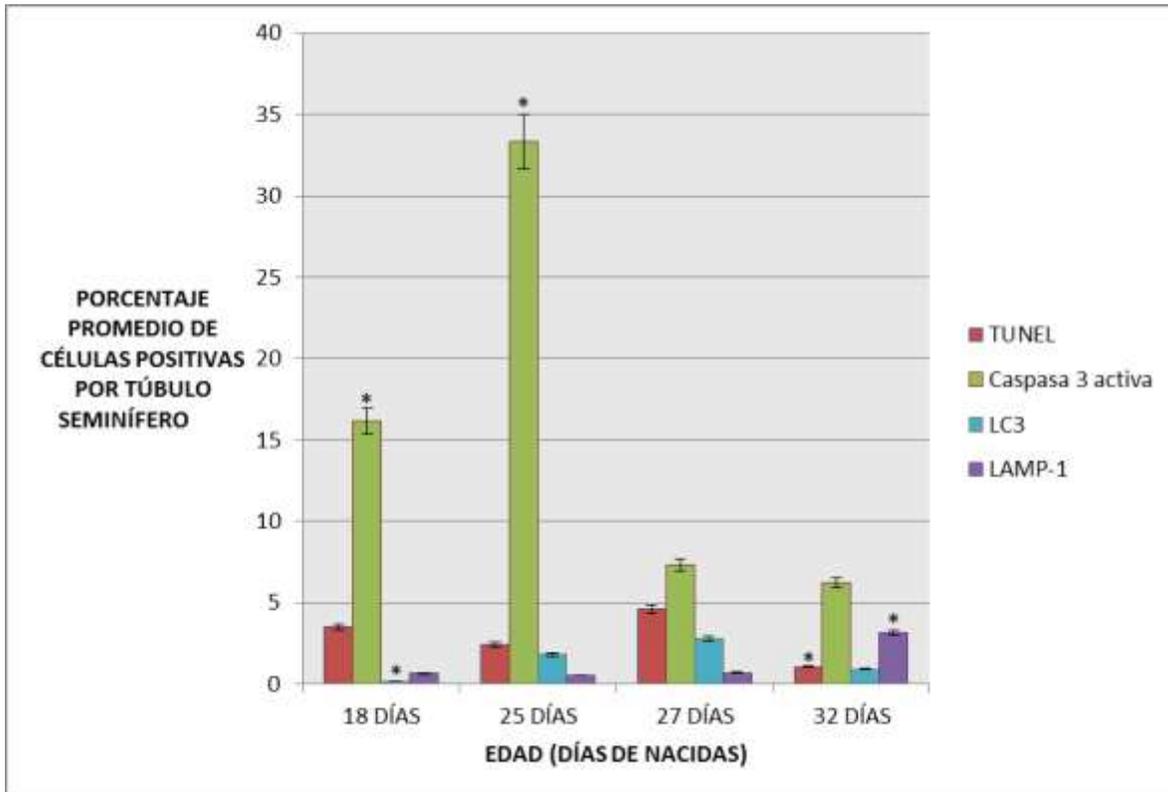
Gráfica 1.- Cantidad de células marcadas por edad (n= 30 túbulos por edad).

De los biomarcadores de autofagia, se encontraron menos de 30 células positivas para LC3 por edad, viéndose la menor cantidad de células marcadas a los 18 días donde se encontraron menos de 5 células marcadas. En cuanto a Lamp-1, se aprecian menos de 20 células marcadas por edad, excepto a 32 días donde se observaron alrededor de 60 células marcadas.

En la gráfica 2 se representa el índice aplicado a los distintos marcadores, los cuales se distribuyen en valores diferentes a los de la gráfica anterior. La incidencia de la marca en los túbulos seminíferos de los diferentes biomarcadores es menor del 35%. Encontramos que el mayor porcentaje de células marcadas por túbulo es para caspasa-

3 activa, alcanzando el valor más alto del 33% a 25 días de edad. Y la menor incidencia es de LC3, la cual es menor del 3% en todas las edades.

Los análisis de los biomarcadores arrojaron que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el número de células con señal positiva para caspasa-3, Lamp-1, LC3 y TUNEL a las diferentes edades muestreadas. Y con las pruebas de Tukey se distinguieron las edades que presentaron diferencias significativas para cada señal.



Gráfica 2.- Índices de muerte celular por edad para los diferentes marcadores inmunohistoquímicos (n= 30 túbulos por edad).

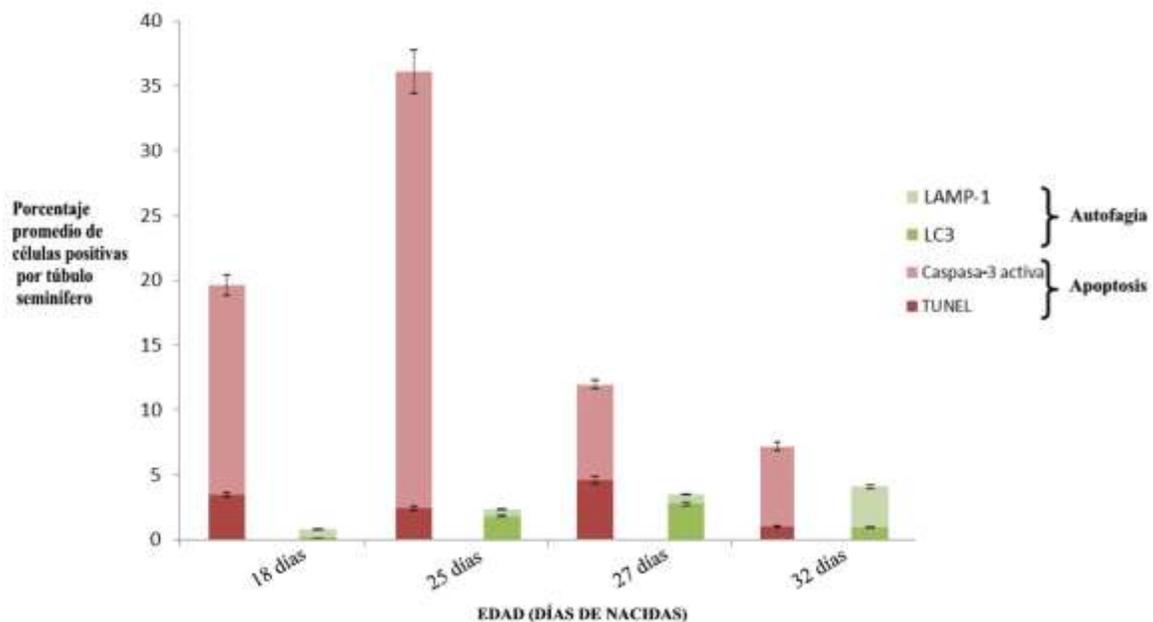
Las pruebas de ANOVA arrojaron que hay diferencias significativas en el número de células positivas para Caspasa 3 a los 18 y 25 días, lo cual indica que en estas etapas, se observa un aumento en la muerte celular por apoptosis.

En los índices de TUNEL a 32 días de edad se muestran diferencias significativas con respecto a las demás edades. Se observa que aunque hay diferencias en las cantidades de células marcadas, al hacer los análisis de incidencia, las proporciones son similares en todas las edades, con valores promedio alrededor del 3.5%, excepto a 32 días de edad donde se encontró una disminución en la marca estadísticamente diferente.

En cuanto a LC3 solo se encuentran diferencias en los índices porcentuales a 18 días con respecto a las demás edades, ya que en esta edad se presenta un porcentaje menor al 0.2%.

Los índices de Lamp-1 a 32 días muestran diferencias significativas con respecto a las demás edades, ya que su porcentaje promedio es de 3.17%, 5 veces mayor que los porcentajes promedio de las edades anteriores.

Al agrupar los marcadores por tipo de marca, observamos en la gráfica 3 que las marcas apoptóticas están mejor representadas que los marcadores autofágicos durante estas etapas. También se muestra que hay pocas relaciones porcentuales en los comportamientos de los marcadores en ambos procesos. Por lo que se puede decir que son procesos independientes.



Gráfica 3.- Gráfica de comportamiento de los marcadores apoptóticos y autofágicos (n= 30 túbulos por edad).

DISCUSIÓN

Los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, muestran túbulos seminíferos con espermatocitos en desarrollo desde los 18 días de edad. Sin embargo a esta edad, las células ya presentan signos de un proceso de muerte celular. Al respecto existen evidencias de que hay espermatocitos alterados en proceso de apoptosis y meiosis desde los 16 días de edad en rata. Estos espermatocitos primarios han sido caracterizados en su mayoría como paquitenos medios, principalmente identificados por el estadio del ciclo del epitelio seminífero en el que se encontraron cuerpos apoptóticos (Jahnukainen et al., 2004). Sin embargo, en nuestro trabajo encontramos que los espermatocitos primarios presentan alteraciones desde la etapa de cigoteno hasta la etapa de paquitenos. Los espermatocitos primarios en cigoteno se identificaron por un nucleolo bien desarrollado, la presencia del cuerpo XY y de ejes cromosómicos; y en paquitenos por la formación de complejos sinaptonémicos, todo a nivel ultraestructural.

Los espermatocitos primarios mostraron dos tipos de características de procesos de apoptosis: características iniciales y tardías. Las características iniciales que presentaron fueron: un tamaño y forma irregular, retracción celular, separación de células adyacentes, mitocondrias con crestas dilatadas. Estas características del proceso de apoptosis que no se habían descrito para estos tipos celulares durante estas etapas. Otra característica importante que presenta, es la discontinuidad en algunas células de la parte interna de la envoltura nuclear, lo cual no se había reportado como una característica de muerte celular en espermatocitos y es un dato para analizar y buscar sus causas en trabajos posteriores. Estas células en etapas tempranas no presentaron alteraciones morfológicas visibles en el nucleolo, ni en la cromatina. Estas inaparentes alteraciones durante las etapas tempranas del proceso pueden ser debidas a la alta actividad de proteínas reparadoras de ADN dentro del núcleo, o a que el núcleo es un blanco tardío en la ruta de activación de la apoptosis, lo que correspondería a la vía extrínseca de la apoptosis. Sin embargo es difícil de concluirlo con los conocimientos actuales (Morales et al., 2006). Estas características celulares se presentaron en las cuatro edades muestreadas desde 18 hasta los 32 días de edad.

Los espermatocitos que morfológicamente tenían características apoptóticas iniciales presentaron marca positiva a caspasa-3 activa de dos tipos. Una marca homogénea en el citoplasma que se mostró en todas las edades, y una marca punteada en el núcleo que se mostró desde los 25 hasta los 32 días de edad. Al hacer el análisis de los datos, se vio un aumento en la proporción de células por túbulo a la edad de 25 días de edad, alcanzando un 33.3% de incidencia, y posteriormente un declive hasta el 7 y 6% a los 27 y 32 días de edad. Estos datos coinciden con trabajos anteriores donde reportan un pico en la activación de caspasas efectoras a estas edades (Morales et al. 2006; Russel et al. 2002). A este respecto la caspasa-3 es uno de los ejecutores principales de la muerte celular por apoptosis, por lo que hay una relación directa entre la expresión de caspasa-3 activa y la cantidad de espermatocitos que mueren por apoptosis (Morales et al., 2006). La presencia de la caspasa-3 activa en el núcleo se ha reportado que se debe

a la translocación de la caspasa-3 desde el citoplasma para la activación de endonucleasas necesarias para llevar a cabo la fragmentación de la cromatina (Kamada et al., 2005; Kim et al., 2001).

Las células con características avanzadas de muerte celular se encontraron desde los 18 hasta los 32 días de edad. Estas células en las últimas etapas del proceso apoptótico se presentaron abundantemente en la zona adluminal del túbulo, aunque también se llegaron a encontrar cerca de la membrana basal. Las características morfológicas apoptóticas tardías se identificaron principalmente por alteraciones nucleares como la fragmentación y compactación de la cromatina, además de otras alteraciones como la fragmentación del citoplasma, la dilatación de cuerpos membranosos y la retracción celular, las cuales coinciden con la descripción de células apoptóticas en trabajos anteriores (Russel et al., 2002). Algunos de estas células se encontraron en grupos, probablemente debido a los puentes citoplásmicos que existen entre ellos. Estas células y los cuerpos apoptóticos eran fagocitados por las células de Sertoli antes de terminar su proceso de degeneración.

Las células apoptóticas avanzadas se encontraron en todas las edades muestreadas. Estas células presentaron marca de TUNEL, una técnica que marca rompimientos de doble cadena de ADN en un proceso apoptótico avanzado. Las células marcadas con esta técnica fueron más abundantes a los 27 días de edad, sin embargo las proporciones por túbulo fueron muy parecidas en todas las edades. Esta marca se encontró con una incidencia en los túbulo seminíferos alrededor del 3.5% encontrando diferencias estadísticas únicamente a los 32 días de edad, donde ya hay una disminución en el número y proporción de células con respecto a las edades anteriores. El aumento en la abundancia de células con rompimiento de ADN a la edad de 27 días coincide con trabajos anteriores (Morales et al., 2006; Russel et al., 2002). Aunque es una marca apoptótica, se muestra en diferentes proporciones a la marca de caspasa-3 activa en todas las edades, probablemente debido a la alta actividad de las células de Sertoli, las cuales fagocitan células apoptóticas antes de terminar por completo su proceso de compactación, sin embargo habría que hacer otros experimentos para corroborar estas hipótesis.

En este estudio también se identificaron espermatogonias en procesos apoptóticos teniendo características parecidas a las de los espermatocitos primarios. Sin embargo los procesos de muerte celular en las espermatogonias están relacionados con las tasas de división mitótica y la densidad celular (Clermont, 1962, De Rooji & lok 1987, Huckins & Oakberg, 1978).

En este estudio también se buscó la presencia de vesículas autofágicas como signo de muerte celular por autofagia. Sin embargo, las células germinales no presentaron vesículas autofágicas en su citoplasma, solo se llegaron a observar en células de Sertoli y en la luz del túbulo, y fuera del túbulo en células de Leydig. Las vesículas dentro del túbulo tenían diferentes tipos de contenido, en su mayoría tenían contenido lipídico

derivado de una alta actividad hormonal (Baccetti et al., 1998). Las vesículas que tenían contenido autofágico se apreciaban en el citoplasma de células de Sertoli, siendo un proceso fisiológico normal, ya que estas células llevan a cabo la degradación celular y reciclamiento celular dentro del túbulo (Ulvik & Dahl, 1981). Y las vesículas libres en estas etapas están relacionadas en la formación del lumen del túbulo (Van Haaster et al., 1993).

Las marcas inmunohistoquímicas proautofágicas se observaron en niveles basales en todas edades muestreadas. En el caso de la Lamp-1, la cual es una glucoproteína de membrana de lisosomas, fue localizada en la luz y en la zona correspondiente a las células de Sertoli en la mayoría de los túbulos seminíferos. En casi todas las edades se presenta una marca basal correspondiente a una actividad autofágica fisiológica normal, comparada con la actividad en adulto y en células en cultivo celular (Zhang et al., 2012). La incidencia de esta marca dentro de los túbulos se encuentra alrededor del 0.6% desde los 18 hasta los 27 días de edad en las células de la línea germinal, y a 32 días se presentan diferencias estadísticas con respecto a las edades anteriores ya que aumentó 5 veces su proporción alcanzando un 3.17% de incidencia. Este incremento puede ser debido a la actividad de las espermatidas en desarrollo, las cuales ya se aprecian a esta edad (Moreno, 2003). A estas edades no se encontraron espermatoцитos primarios con una marca exacerbada para considerarlos en un proceso de muerte celular.

Se muestra muy poca cantidad de células marcadas positivamente para LC3 dentro de los túbulos seminíferos durante la mayoría de las edades, excepto a 27 días donde se observan algunas espermatoцитos primarios marcadas en el citoplasma y en el núcleo. La proteína LC3 es una proteína asociada a microtúbulos que se encuentra incorporada en la membrana de los autofagosomas, lo cual indica que su marcaje es directamente proporcional a las células con autofagia (Tanida et al., 2008). La incidencia de LC3 dentro de los túbulos seminíferos es alrededor del 1.8% de 25 a 32 días de edad, encontrándose diferencias significativas a 18 días de edad donde solo encontró una incidencia del 0.13%. La marca de LC3 en núcleo es resultado de la translocación de la proteína desde el citoplasma para ser desacetilada y poder unirse a la fosfatidiletanolamida en el citoplasma. El proceso de translocación LC3 al núcleo es un proceso independiente de los procesos de autofagia en la célula, por lo que no se puede tomar como un indicador de muerte celular (Drake et al., 2010). Sin embargo, su marcaje puede estar relacionado con la formación de los cuerpos apoptóticos pero no se puede definir su participación con los conocimientos actuales. Los resultados de las marcas basales de las proteínas LC3 y Lamp-1 en esta etapa, aunado a la baja cantidad de vesículas autofágicas indican que no hay procesos de muerte celular por autofagia durante los primeros ciclos espermatogénicos, y que la actividad autofágica en esta etapa en las células germinales es independiente del proceso de muerte celular.

Se encontraron células que presentaban necrosis celular siendo ultraestructuralmente identificadas por la lisis de su núcleo y citoplasma, además de la pérdida de integridad de su membrana plasmática. Dentro de los túbulos se apreciaron como células libres y claras hacia la luz del túbulo. Estas células se llegan a observar desde los 25 hasta los 32 días de edad. La presencia de células necróticas ha sido observada en testículos de organismos adultos, la causa principal de este proceso es la cantidad y fuente de energía disponible, ya que dependiendo del sustrato y cantidad de ATP, las células pueden cambiar de ruta muerte celular, de apoptosis a necrosis y viceversa (Bustamante-Marín et al., 2012).

Los resultados indican que el proceso que se lleva a cabo para la eliminación de las células durante los primeros ciclos espermatogénicos es la apoptosis. En el presente estudio se pudieron observar espermatoцитos primarios desde las etapas de cigoteno a paquiteno con características morfológicas e inmunocitoquímicas iniciales y tardías del proceso apoptótico, evidenciando que no hay una participación de procesos autofágicos en la eliminación celular en las primeras ondas espermatogénicas en los cordones seminíferos en condiciones fisiológicas *in situ*. Consideramos que aunque es solo un proceso de eliminación, es un proceso muy eficiente que mantiene la homeostasis celular durante esta etapa del desarrollo del testículo. Sin embargo, son necesarios otros estudios donde se analicen otros tipos de marcadores donde se corroboren los tipos de muerte celular y los estadios de las células de la línea germinal, además de analizar e integrar los diferentes factores que interactúan para tener como resultado estos procesos celulares.

Conclusiones

- Los espermatoцитos primarios en etapas de cigoteno-paquiteno son los principales tipos celulares que se encuentran en procesos de muerte en esta etapa, sin embargo se llegan a observar también espermatogonias.
- Las características ultraestructurales apoptóticas iniciales en espermatoцитos primarios son la discontinuidad de la envoltura interna del núcleo, mitocondrias con crestas dilatadas y desplazadas hacia su periferia, cambio en la forma y tamaño celular, la separación de las células adyacentes; y las características tardías son la fragmentación del núcleo, la compactación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos.
- Hay poca cantidad de vesículas autofágicas, lo que indica que los niveles de autofagia son fisiológicamente normales y no están vinculados con algún tipo de muerte celular.
- En todas las edades muestreadas de la primer onda espermatogénica en rata (18, 25, 27 y 32 días de edad) se observa señal positiva de caspasa-3 en espermatoцитos con características iniciales de muerte celular y la marca de TUNEL en células apoptóticas con características avanzadas; la proteína LC3 y Lamp-1 se observan en niveles basales de actividad autofágica en todas las edades.
- Durante las edades estudiadas el tipo principal de muerte celular en espermatoцитos es la apoptosis. Sin embargo, se considera que se deben hacer otros experimentos para corroborar dichos resultados.

Referencias

- Adams JM, Cory S. (1998). “*The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*”. Science. Aug 28; 281(5381):1322-6. Review.
- Adrain C, Slee EA, Harte MT, Martin SJ. (1999). “*Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region*”. J Biol Chem. Jul 23; 274(30):20855-60.
- Allan DJ, Harmon BV, Roberts SA. (1992). “*Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat*”. Cell Prolif. May; 25(3):241-50.
- Baccarini M. (2002). “*An old kinase on a new path: Raf and apoptosis*”. Cell Death Differ. Aug; 9(8):783-5. Review.
- Baccetti B, Collodel G, Costantino-Ceccarini E, Eshkol A, Gambera L, Moretti E, Strazza M, Piomboni P. (1993). “*Localization of human follicle-stimulating hormone in the testis*”. FASEB J. 1998 Aug; 12(11):1045-54.
- Baliga B, Kumar S. (2003). “*Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow?*” Cell Death Differ. Jan; 10(1):16-8. Review.
- Bao Q, Shi Y. (2007). “*Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases*”. Cell Death Differ. Jan; 14(1):56-65. Epub 2006 Sep 15. Review.
- Bellvé AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. (1977). “*Spermatogenic cells of the prepuberal mouse*”. Isolation and morphological characterization. J Cell Biol. Jul; 74(1):68-85.
- Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJ. (1995). “*Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages*”. Endocrinology. Jan; 136(1):5-12.
- Bloom, W, Fawcett, DW. (1995). “*Tratado de Histología*”. 12a edición. Ed. McGraw-Hill/Interamericana.
- Boekelheide K, Lee J, Shipp EB, Richburg JH, Li G. (1998). “*Expression of Fas system-related genes in the testis during development and after toxicant exposure*”. Toxicol. Lett. 102-103, 503–508.
- Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlatt S, Nieschlag E. (1995). “*Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats*”. J Reprod Fertil. Sep; 105(1):25-33.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. (1999). “*Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis*”. Annu Rev Cell Dev Biol. 1999; 15: 269-90.
- Bustamante-Marín X, Quiroga C, Lavandero S, Reyes JG, Moreno RD. (2012). “*Apoptosis, necrosis and autophagy are influenced by metabolic energy sources in cultured rat spermatocytes*”. Apoptosis. Jun; 17(6):539-50. doi: 10.1007/s10495-012-0709-2
- Challa S, Chan FK. (2010). “*Going up in flames: necrotic cell injury and inflammatory diseases*”. Cell Mol Life Sci. 2010; 67:3241–53.
- Chan FK, Shisler J, Bixby JG, Felices M, Zheng L, Appel M, Orenstein J, Moss B, Lenardo MJ. (2003). “*A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses*”. J Biol Chem. 2003; 278:51613–21.
- Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK. (2009). “*Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation*”. Cell. 2009; 137:1112–23.
- Clermont Y, Perey, B. (1957). “*The stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat: practical definitions in PA-Schiff-hematoxylin and hematoxylin-eosin stained sections*”. Rev Can Biol. Dec; 16(4):451-62.
- Clermont Y. (1962). “*Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia*”. Am J Anat. Sep; 111:111-29.
- Contreras-Zentella ML, Hernández-Muñoz R. (2016). “*Is Liver Enzyme Release Really Associated with Cell Necrosis Induced by Oxidant Stress?*” Oxid Med Cell Longev. 2016; 2016:3529149. doi: 10.1155/2016/3529149. Review.

- Cooper GM. (2000). *"The Cell: A Molecular Approach"*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Lysosomes.
- Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. (2003). *"Caspase-activation pathways in apoptosis and Immunity"*. Immunol Rev. Jun; 193: 10-21. Review.
- De Rooij DG, Lok D. (1987). *"Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia"*. Anat Rec. Feb; 217(2):131-6.
- Degtarev A, Boyce M, Yuan J. (2003). *"A decade of caspases."* Oncogene. Nov 24; 22(53):8543-67. Review.
- Dirami G, Ravindranath N, Kleinman HK, Dym M. (1995). *"Evidence that basement membrane prevents apoptosis of Sertoli cells in vitro in the absence of known regulators of Sertoli cell function"*. Endocrinology. Oct; 136(10):4439-47.
- Drake KR, Kang M, Kenworthy AK. (2010). *"Nucleocytoplasmic distribution and dynamics of the autophagosome marker EGFP-LC3"*. PLoS One. 2010 Mar 23; 5(3):e9806. doi: 10.1371/journal.pone.0009806.
- Dunkel L, Hirvonen V, Erkkilä K. (1997). *"Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis"*. Cell Death Differ. Apr; 4(3):171-9.
- Dym M, Dirami G, Ravindranath N. (1995). *"The role of apoptosis in tubule lumen formation"*. Mol. Biol. Cell; 6:314.
- Escobar ML, Vázquez-Nin GH, Echeverría OM. (2011). *"Apoptosis"*. En GH Vázquez- Nin, ML Escobar, M de Felici, OM Echeverría, & FG Klinger (eds.), Cell death in mammalian Ovary, (pp, 63- 81).
- Eskelinen EL. (2005). *"Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells"*. Autophagy. Apr; 1(1):1-10. Epub 2005 Apr 28. Review.
- Eskelinen EL. (2006). *"Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy"*. Mol Aspects Med. Oct-Dec; 27(5-6):495-502. Epub 2006 Sep 14. Review.
- Fulda S, Debatin KM. (2006). *"Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy"*. Oncogene. Aug 7; 25(34):4798-811. Review.
- Gartner LP, Hiatt JL. (2002). *"Texto atlas de histología"*, 2da ed., edit. McGraw-Hill interamericana, pp. 463-483. 1.
- Giam M, Huang DC, Bouillet P. (2008). *"BH3-only proteins and their roles in programmed cell death"*. Oncogene. Dec; 27 Suppl 1:S128-36. doi: 10.1038/onc.2009.50. Review.
- Golstein P, Kroemer G. (2007). *"Cell death by necrosis: towards a molecular definition"*. Trends Biochem Sci 32:37-43
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. (1999) *"BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis"*. Genes Dev. 1999 Aug 1; 13(15):1899-911. Review.
- Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. (2004). *"Lysosomes in cell death"*. Oncogene. Apr 12; 23(16):2881-90.
- Heninger NL, Staub C, Blanchard TL, Johnson L, Varner DD, Forrest DW. (2004). *"Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions"*. Theriogenology. 2004 Jul; 62(1-2):283-97.
- Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J. (2000). *"Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule"*. Nat Immunol. 2000; 1:489-95.
- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Núñez G. (1998). *"Bel-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation"*. Proc Natl Acad Sci U S A. Apr 14; 95(8):4386-91.
- Hu Y, Benedict MA, Ding L, Núñez G. (1999). *"Role of cytochrome C and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis"*. EMBO J. Jul 1; 18(13):3586-95.

- Huckins C. (1978). “*The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium*”. *Anat Rec.* Apr; 190(4):905-26.
- Huckins C, Oakberg EF. (1978). “*Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules, I. The normal testes*”. *Anat Rec.* Dec; 192(4):519-28.
- Igney FH, Krammer PH. (2002). “*Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*”. *Nat Rev Cancer.* Apr; 2(4):277-88. Review.
- Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S, Söder O.(2004). “*Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis*”. *Biol Reprod.* Feb; 70(2):290-6.
- Kamada S, Kikkawa U, Tsujimoto Y, Hunter T. (2005). “*Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s)*”. *J Biol Chem.* 2005 Jan 14; 280(2):857-60.
- Karp G. (2009). “*Biología celular y molecular*”, 5ta ed., edit. McGraw-Hill interamericana, pp. 653-657.
- Kerr JF WA, Currie AR. (1972). “*Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*”. *Br J Cancer,* 26:239–257.
- Kerr JB. (1992). “*Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle*”. *J Reprod Fertil.* Aug; 95(3):825-30.
- Kim B, Park K, Rhee K. (2013). “*Heat stress response of male germ cells*”. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Aug; 70(15):2623-36. doi: 10.1007/s00018-012-1165-4. Epub 2012 Sep 25. Review.
- Kim JM, Ghosh SR, Weil AC, Zirkin BR. (2001). “*Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone*”. *Endocrinology.* 2001 Sep; 142(9):3809-16.
- Klionsky DJ, Emr SD. (2000). “*Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation*”. *Science.* Dec 1; 290(5497):1717-21. Review.
- Kornfeld S, Mellman I. (1989). “*The biogenesis of lysosomes*”. *Annu Rev Cell Biol.*; 5:483-525. Review.
- Kroemer G, Jäättelä M. (2005). “*Lysosomes and autophagy in cell death control*”. *Nat Rev Cancer.* Nov; 5(11):886-97. Review.
- Kumar S. (2007). “*Caspase function in programmed cell death*”. *Cell Death Differ.* Jan; 14(1):32-43. Epub 2006 Nov 3. Review.
- Leblond CP, Clermont Y. (1952). “*Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat*”. *Ann N Y Acad Sci.* 1952 Nov 20; 55(4):548-73.
- Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. (1997). “*The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis*”. *Endocrinology* 138, 2081–2088.
- Levine B, Kroemer G. (2008). “*Autophagy in the pathogenesis of disease*”. *Cell.* 2008 Jan 11; 132(1):27-42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018. Review.
- Lizama C, Alfaro I, Reyes JG & Moreno RD. (2007). “*Up-regulation of CD95 Apo-1/Fas is associated with spermatocyte apoptosis during the first round of spermatogenesis in the rat*”. *Apoptosis* 12, 499–512. (Doi: 10.1007/s10495-006-0012-1).
- Lodish H et al. (2005). “*Biología celular y molecular*”, 5ta ed., edit. Panamericana, pp. 598- 600.
- Luzio JP, Poupon V, Lindsay MR, Mullock BM, Piper RC, Pryor PR. (2003). “*Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes*”. *Mol Membr Biol.* Apr-Jun; 20(2):141-54. Review.
- MacKenzie SH & Clark AC. (2012). “*Death by caspase dimerization*”. In *Protein Dimerization and Oligomerization in Biology* (pp. 55-73). Springer New York.
- Mizushima N. (2007). “*Autophagy: process and function*”. *Genes Dev.* Nov 15; 21(22):2861-73. Review.

- Morales A, Mohamed F, Cavicchia JC. (2007). "Apoptosis and blood-testis barrier during the first spermatogenic wave in the pubertal rat". *Anat Rec (Hoboken)*. 2007 Feb; 290(2):206-14.
- Moreno RD. (2003). "Differential expression of lysosomal associated membrane protein (LAMP-1) during mammalian spermiogenesis". *Mol Reprod Dev*. 2003 Oct; 66(2):202-9.
- Moreno RD, Lizama C, Urzúa N, Vergara SP, Reyes JG. (2006). "Caspase activation throughout the first wave of spermatogenesis in the rat". *Cell Tissue Res*. 2006 Sep; 325(3):533-40.
- Moquin D, & Chan F. K.-M. (2010). "The Molecular Regulation of Programmed Necrotic Cell Injury". *Trends in Biochemical Sciences*, 35(8), 434–441.
- Mori C, Nakamura N, Dix DJ, Fujioka M, Nakagawa S, Shiota K, Eddy EM. (1997). "Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice". *Dev Dyn*. Jan; 208(1):125-36.
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. (1998). "An induced proximity model for caspase-8 activation". *J Biol Chem*. Jan 30; 273(5):2926-30.
- Oakberg EF. (1956). "A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal". *Am J Anat*. Nov; 99(3):391-413.
- Odorisio T, Rodriguez TA, Evans EP, Clarke AR, Burgoyne PS. (1998). "The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis". *Nat Genet*. 1998 Mar; 18(3):257-61.
- Oldereid NB, Angelis PD, Wiger R, Clausen OP. (2001). "Expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis". *Mol Hum Reprod*. 2001 May; 7(5):403-8.
- Reyland Mary E. (2010). "Protein kinase C and apoptosis", in *protein kinase C in cáncer signaling and therapy*, edit. Springer, pp. 31-55.
- Richburg J, Boekelheide K. (1996). "Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes". *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 137, 42–50.
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. (1997). "An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis". *EMBO J*. 1997 May 1; 16(9):2262-70.
- Roeder GS, Bailis JM. (2000). "The pachytene checkpoint". *Trends Genet*. Sep; 16(9):395-403. Review.
- Rojas M, Salmen S, & Berrueta L. (2009). "Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación". *Revista Médica de la Extensión Portuguesa—ULA*. (4), 3, 92-106.
- Roosen-Runge EC, Giesel LO. (1950). "Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat". *Am J Anat*. Jul; 87(1):1-30.
- Roosen-Runge EC. (1955). "Untersuchungen über die Degeneration samenbildender Zellen in der normaler Spermatogenese der Ratte". *Z. Zeforsen mikrosk. Anat*. 41, 221
- Roosen-Runge EC. (1973). "Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis". *J Reprod Fertil*. Nov; 35(2):339-48. Review.
- Roseto A, & Brener C. (1999). "Apoptosis o la muerte celular programada". *Arch. argent. pediatri*, 97(4), 253-75.
- Ross MH, Kaye GI, Pawlina, W. (2005); "Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular", 4ta ed., editorial panamericana, pp. 684-727.
- Royere D, Guérif F, Laurent-Cadoret V, & Hochereau de Reviere MT. (2004). "Apoptosis in testicular germ cells". In *International Congress Series*. Elsevier. Vol. 1266, pp. 170-176.
- Rubinstein AD, Kimchi A. (2012). "Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis". *J Cell Sci*. Nov 15; 125(Pt 22):5259-68. doi: 10.1242/jcs.115865. Review.
- Russell LD, Clermont Y. (1977). "Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats". *Anat Rec*. Mar; 187(3):347-66.

- Russell LD, Alger LE, Nequin LG. (1987). "*Hormonal control of pubertal spermatogenesis*". *Endocrinology*. Apr; 120(4):1615-32.
- Russell LD. (1990). "*Histological and histopathological evaluation of the testis*". Cache River Press.
- Salvesen GS, Dixit VM. (1997). "*Caspases: intracellular signaling by proteolysis*". *Cell*. 1997 Nov 14; 91(4):443-6. Review.
- Shaha C, Tripathi R, Mishra DP. (2010). "*Male germ cell apoptosis: regulation and biology*". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010 May 27; 365(1546):1501-15. doi: 10.1098/rstb.2009.0124. Review.
- Sinha Hikim AP, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C, Swerdloff RS. (2003). "*Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis*". *J Steroid Biochem Mol Biol*. Jun; 85(2-5):175-82.
- Stennicke HR, Salvesen GS. (1998). "*Properties of the caspases*". *Biochim Biophys Acta*. Sep 8; 1387(1-2):17-31. Review.
- Stocco DM, McPhaul MJ. (2006). "*Chapter 20: Physiology of testicular steroidogenesis*" in Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, 3ra ed. Elsevier.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. (2004). "*LC3 conjugation system in mammalian autophagy*". *Int J Biochem Cell Biol*. Dec; 36(12):2503-18. Review.
- Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. (1993). "*Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors*". *Mol Endocrinol*. May; 7(5):643-50.
- Taylor RC, Cullen SP. (2008). "*Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*". *Nat Rev Mol Cell Biol*. Mar; 9(3):231-41. Review.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. (1998). "*Caspases: enemies within*". *Science*. Aug 28; 281(5381):1312-6. Review.
- Ulvik NM, Dahl E. (1981). "*Stage-dependent variations in volume density and size of Sertoli cell vesicles in the rat testis*". *Cell Tissue Res*. 1981; 221(2):311-20.
- Van Haaster LH, de Jong FH, Docter R, de Rooij DG. (2010). "*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*". *Endocrinology*. 1993 Aug; 133(2):755-60.
- Wajant H. (2002). "*The Fas signaling pathway: more than a paradigm*". *Science*. May 31; 296(5573):1635-6. Review.
- Wing TY and Christensen AK. (1982). "*Morphometric studies on rat seminiferous tubules*". *American Journal of Anatomy* 165:13-2.
- Yin Y, Stahl BC, DeWolf, WC, & Morgentaler A. (1998). "*P53-mediated germ cell quality control in spermatogenesis*". *Developmental biology*, 204(1), 165-171.
- Youle RJ, Strasser A. (2008). "*The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*". *Nat Rev Mol Cell Biol*. Jan; 9(1):47-59. Review.
- Zhang M, Jiang M, Bi Y, Zhu H, Zhou Z, Sha J. (2012). "*Autophagy and apoptosis act as partners to induce germ cell death after heat stress in mice*". *PLoS One*. 2012; 7(7):e411412. doi: 10.1371/journal.pone.0041142. Epub 2012 Jul 25.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. (1997). "*Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*". *Cell*. Aug 8; 90(3):405-13.