



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Biología Celular e Histología

Facultad de Medicina

**CAMBIOS CELULARES EN EL INTERSTICIO TESTICULAR DEL HÁMSTER
(*Mesocricetus auratus*) DURANTE EL ENVEJECIMIENTO Y EN LA
REGRESIÓN TRAS LA EXPOSICIÓN A FOTOPERIODO CORTO**

**CELLULAR CHANGES IN THE TESTICULAR INTERSTITIUM OF HAMSTER
(*Mesocricetus auratus*) DURING AGING AND REGRESSION AFTER
EXPOSURE TO A SHORT PHOTOPERIOD**

**TESIS DOCTORAL
ESTHER BELTRÁN FRUTOS
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

MURCIA

2012

*A mis padres,
con cariño y profunda admiración*

*A mí marido y a mi hijo,
mís grandes amores*

Tras varios años de intenso trabajo, por fin ha llegado el momento en que se culmina esta tesis doctoral. La finalización de la misma no habría sido posible sin el apoyo y el cariño que he recibido durante todo este tiempo. Por lo que no sería justo cerrar este manuscrito sin haber dado las gracias a todos aquellos que han participado de un modo u otro en ella.

A mis directores de tesis Luis Miguel Pastor García y Concepción Ferrer Cazorla, por transmitirme vuestra pasión por la ciencia. Por vuestra dedicación, consejos y sabiduría empleados en mi formación.

Al departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina por acogerme durante este largo período y en especial a los profesores Drs. Francisco Hernández Calvo, Adelina Zuasti Elizondo, Juan Francisco Madrid Cuevas, Jose Ángel Martínez Menarguez, Manuel Avilés Sánchez, M^a Teresa Castells Mora y Emilio Gómez Sánchez. Gracias por vuestro apoyo profesional y personal.

A M^a Carmen González Ulloa, por su amistad, cariño y consejos. Gracias "jefa". A Ángel Fernández Hernández por su inestimable ayuda.

A mis chicas de la piscina, Emma Martínez Alonso y Mónica Tomás Caballero. Por haberme hecho pasar ratos tan buenos y haberme dado siempre ánimos.

A M^a José Izquierdo, Tere Zomeño, Vicente Seco y María Jiménez por brindarme siempre vuestra ayuda.

A todos mis compañeros de laboratorio y de departamento: M^a Carmen Bernal, Julián, Isa, Irene, Guillermo, Fara, Irene ST, Wilson, Lili, Luis Miguel, Narcí, Blanca, Mar, Carla, Salvador y Sara.

Al profesor Manuel Canteras Jordana del Departamento de Bioestadística de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia por su ayuda y consejos en el análisis estadístico.

A la Fundación Séneca, Distribuciones Magaña S.L y a Sergio Navarro Sánchez por la concesión de mi beca de investigación.

A mis hermanas, M^a José y Asun que siempre estáis en mi corazón y en mi vida. Por haberme protegido y escuchado. A mis sobrinos Alejandro y Laura por transmitirme siempre alegría. A mis cuñados Ginés y Carlos por su amistad.

A mis suegros, Paco y Juana y mi cuñada Merce por acogerme desde el primer día como una hija más en su casa.

A mis padres porque vosotros habéis sido mis mayores maestros. A tí papá por todas esas horas extras que has tenido que trabajar para que nunca nos faltara nada. Por ser un ejemplo de tenacidad y esfuerzo. A tí mamá por tu apoyo incondicional, por tu dedicación sin descanso, por todas esas noches al pie de mi cama cuando he estado enferma, por tu comprensión y tu ternura. Sin vosotros nunca hubiera llegado hasta aquí.

A Fran por estar siempre a mi lado, en los buenos y malos momentos animándome siempre a continuar. Gracias por ser mi otra mitad. A mi hijo por tenerme enganchada a la vida y por enseñarme lo que significa la palabra felicidad. Os quiero.

Algunos de los aspectos tratados en la presente tesis doctoral han sido divulgados en los siguientes resúmenes publicados y comunicaciones a congresos:

-Proliferation activity in testicular interstitial cells of Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*): changes during aging. Beltrán E, Ferrer C, Zuasti A, Bernal-Mañas CM., Canteras M., Pastor LM. *Reproduction in Domestic Animals* 41:110. 2006

-Aging changes in testicular interstitial cells of Syrian Hamster: an ultrastructural study. Beltrán E., Ferrer C., Zuasti A., Horn R., Bernal-Mañas CM., Martín M., Pastor LM. *Reproduction in Domestic Animals* 41: 110. 2006.

-Interstitial testis cells: proliferation activity in young, middle-age and old age in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). Beltrán-Frutos E., Ferrer C., Zuasti A., Bernal-Mañas CM., Canteras M., Pastor LM. *Histology and Histopathology Supplement 2: S77*.2007.

-Effect of Age on the Proliferation and Apoptosis of Testicular Interstitial Cells of Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*). E Beltrán-Frutos, A Zuasti, C Ferrer, M Canteras, V Seco, LM Pastor. *Reproduction in Domestic Animals* 43:79. 2008.

-Cellular Proliferation in the Testicular Interstitium of Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*) Subjected to Short Photoperiod. LM Pastor, E, Beltrán-Frutos, C Ferrer , A Zuasti , V Seco M Canteras. *Reproduction in Domestic Animals* 43:79. 2008.

-Changes in proliferative and apoptotic activity in two different physiological conditions of the *Mesocricetus auratus* testicular interstitium. Pastor LM.,

Beltrán-Frutos E., Ferrer C., Zuasti A., Seco-Rovira V., Gómez-Mayordomo V., canteras. *Histology and Histopathology*. Supplement 1. S23. 2009.

-Immunohistochemical and ultrastructural study of the Leydig cell during aging in the Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*). E. Beltrán-Frutos, C. Ferrer, A. Zuasti, V. Gómez-Mayordomo, M. canteras V. Seco-Rovira, LM Pastor. XIII Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular. 2009.

-Identification of HSP-47 immunohistochemistry in Sertoli cells and Leydig cells in different physiological conditions of Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*) Beltrán-Frutos E., Ferrer C., Seco-Rovira V., Zuasti A., Cortés S., Pastor LM. *Reproduction in Domestic Animals* 45: 101. 2010.

-HSP-47 and collagen IV in Leydig cells of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) during aging and photoinhibited testis. Beltrán-Frutos E., Seco-Rovira V., Canteras M., Ferrer C., Pastor LM. *Histology and Histopathology*. Supplement 2. 444. 2011.

-Changes in connective tissue volumen in the testis of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) during aging and in photoinhibited testis. Beltrán-Frutos E., Seco-Rovira V., Canteras M., Ferrer C., Pastor LM. *Histology and Histopathology*. Supplement 2. 445. 2011.

Ha sido estudiado el intersticio testicular durante el envejecimiento y tras la exposición a fotoperiodo corto en el hámster *Mesocricetus auratus*. Se estudió histoquímicamente y semicuantitativamente la proliferación y la apoptosis (TUNEL +) de células intersticiales y la actividad sintética a testosterona, HSP-47 y colágeno IV ($\alpha 5$) de las células de Leydig. Se completó con el cálculo del volumen total de tejido conjuntivo y la ultraestructura de las células intersticiales. El envejecimiento sólo disminuye la proliferación de pericitos. La regresión por fotoperiodo corto altera la proliferación y la apoptosis de las células intersticiales y la actividad sintética de las células de Leydig. Hay una disminución del tejido conjuntivo intersticial. En conclusión el intersticio testicular del hámster sufre pocas modificaciones con el envejecimiento, aunque una disminución en el recambio de células de Leydig asociado a una muerte constante de ellas, de carácter necrótico, puede causar su disminución. Contrariamente tras el fotoperiodo corto los cambios celulares en las células de Leydig son evidentes y la proliferación de los pericitos es mayor y no hay muerte celular en el intersticio.

Testicular interstitium in hamster during aging and after exposure to a short photoperiod were studied. The proliferation and apoptosis of interstitial cells and presence of testosterone, HSP-47 and collagen IV ($\alpha 5$) in the Leydig cells were studied histochemically and semiquantitatively. The total volume of connective tissue and the ultrastructure of the interstitial cells were studied. The aging only diminished the proliferation of pericytes. The regression resulting from short photoperiod altered the proliferation and apoptosis of interstitial cells and the synthetic activity of the Leydig cells. Interstitial connective tissue was also diminished. In conclusion, the hamster testicular interstitium undergoes little modification with aging, although the decrease in the Leydig cell renewal rate and constant cell death –necrosis- may result in their diminution. In contrast, after exposure to a short photoperiod, the changes in Leydig cells are evident and pericyte proliferation is greater, while no cell death is observed in the interstitium.

Esta tesis doctoral ha sido financiada por los proyectos de investigación de la
Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia:

04542/GERM/06; 04543/GERM/06.

ABREVIATURAS

ALC: células de Leydig adultas

BrdU: 5-bromo-2 deoxiuridina

BSA: albúmina bovina sérica

CORT: corticosterona

DAB: diaminobenzidina

DPX: dibutyl phthalate xylene

ECM: matriz extracelular

EDS: ácido alquilante sulfónico ester

FSH: hormona foliculoestimulante

GFAP: proteína gliofibrilar ácida

hCG: hormona gonadotropina coriónica humana

HSP-47: proteína de choque térmico 47

IGF: factor de crecimiento similar a la insulina

ILC: células de Leydig inmaduras

IL-1 α : interleuquina-1 α

LH: hormona luteinizante

LHR: receptor de la hormona luteinizante

PBR: receptor periférico de la benzodiazepina

PBS: solución salina fosfatada

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular

PLC: progenitoras de las células de Leydig

PRL: prolactina

PModS: factor peritubular que modula la función de la célula de Sertoli

SLC: células madre de Leydig

StAR: proteína reguladora aguda esteroidogénica

TGF- α : factor de crecimiento transformante α

TGF β : factor de crecimiento transformante β

TUNEL: TdT-mediated bio-UTP Nick end labeling

VCAM: molécula de adhesión vascular

3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

11 β -HSD: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

17 β -HSD: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

ÍNDICE

	Pág.
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- JUSTIFICACIÓN	3
1.2.- OBJETIVOS	11
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
2.1.- INTERSTICIO TESTICULAR	15
2.1.1.- Generalidades	15
2.1.2.- Intersticio testicular en mamíferos y relación porcentual de sus componentes	17
2.1.3.- Célula de Leydig: identificación, tipos y origen	20
2.1.4.- Macrófago	31
2.1.5.- Pericito	33
2.1.6.- Célula mioide	34
2.2.- PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS EN EL INTERSTICIO TESTICULAR DE MAMÍFEROS	38
2.2.1.- Proliferación en el intersticio testicular	38
2.2.2.- Apoptosis en el intersticio testicular	42
2.3.- FUNCIONALIDAD DE LA CÉLULA DE LEYDIG	49
2.3.1.- Síntesis de testosterona y cambios de la célula de Leydig con la edad y la exposición a fotoperiodo corto	53
2.3.2.- Influencia de la matriz extracelular en la funcionalidad de la célula de Leydig	57
2.4.- ULTRAESTRUCTURA DE LA CÉLULA DE LEYDIG, DEL MACRÓFAGO Y DE LA CÉLULA MIOIDE	62
2.4.1.- Célula de Leydig	62
2.4.1.1.- <u>Ultraestructura de la célula de Leydig durante el envejecimiento</u>	66

<i>2.4.1.2.- Ultraestructura de la célula de Leydig como consecuencia de la exposición a fotoperiodo corto</i>	70
2.4.2.- Macrófago y célula mioide: ultraestructura y cambios con el envejecimiento y el fotoperiodo corto	73
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	77
3.1.- ANIMALES	79
3.2.- SACRIFICIO DE LOS ANIMALES	81
3.3.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	81
3.3.1.- Microscopía de luz	81
<i>3.3.1.1.- Histoquímica de proliferación y apoptosis</i>	82
3.3.1.1.1.- Técnica de detección de células en proliferación (PCNA)	82
3.3.1.1.2.- Técnica de detección de apoptosis “in situ” (TUNEL)	83
<i>3.3.1.2.- Identificación histoquímica de células positivas a testosterona</i>	85
<i>3.3.1.3.- Identificación histoquímica de tejido conjuntivo y de proteínas relacionadas</i>	86
3.3.1.3.1.- Tinción de Tricrómico de Masson	86
3.3.1.3.2.- Identificación inmunohistoquímica de células que expresan Heat Shock Protein 47 (HSP-47)	86
3.3.1.3.3.- Técnica de detección inmunohistoquímica de colágeno IV ($\alpha 5$).	87
3.3.2.- Microscopía electrónica	88
3.4.- ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO	90
3.4.1.- Porcentaje de células intersticiales	90
3.4.2.- Porcentaje de los tipos de células de Leydig	90
3.4.3.- Índices celulares de proliferación y apoptosis	91
3.4.4.- Índice de células de Leydig positivas a testosterona	92
3.4.5.- Índice de células de Leydig positivas a HSP-47	92
3.4.6.- Índice de células de Leydig positivas a colágeno IV ($\alpha 5$)	93

3.5.- DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE TEJIDO CONJUNTIVO TESTICULAR	94
3.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	95
4.- RESULTADOS	97
4.1.- RESULTADOS CUALITATIVOS	99
4.1.1.- Microscopía de luz convencional	99
<i>4.1.1.1.- <u>Animales jóvenes, adultos y envejecidos (6, 12 y 24 meses)</u></i>	99
<i>4.1.1.2.- <u>Animales sometidos a fotoperiodo corto</u></i>	101
4.1.2.- Análisis cualitativo de la proliferación celular	102
<i>4.1.2.1.- <u>Animales jóvenes, adultos y envejecidos (6, 12 y 24 meses)</u></i>	102
<i>4.1.2.2.- <u>Animales sometidos a fotoperiodo corto</u></i>	102
4.1.3.- Análisis cualitativo de células apoptóticas	102
<i>4.1.3.1.- <u>Animales jóvenes, adultos y envejecidos (6, 12 y 24 meses)</u></i>	103
<i>4.1.3.2.- <u>Animales sometidos a fotoperiodo corto</u></i>	103
4.1.4.- Análisis cualitativo de las células de Leydig productoras de la hormona testosterona	103
<i>4.1.4.1.- <u>Animales jóvenes, adultos y envejecidos (6, 12 y 24 meses)</u></i>	103
4.1.5.- Análisis cualitativo del tejido conjuntivo (Tricrómico de Masson)	104
<i>4.1.5.1.- <u>Animales jóvenes, adultos y envejecidos (6, 12 y 24 meses) y sometidos a fotoperiodo corto</u></i>	104
4.1.6.- Análisis cualitativo de células productoras de HSP-47	104
<i>4.1.6.1.- <u>Animales jóvenes, adultos y envejecidos (6, 12 y 24 meses)</u></i>	104
<i>4.1.6.2.- <u>Animales sometidos a fotoperiodo corto</u></i>	104
4.1.7.- Análisis cualitativo de colágeno IV ($\alpha 5$)	104
<i>4.1.7.1.- <u>Animales jóvenes, adultos y envejecidos (6, 12 y 24 meses)</u></i>	104
<i>4.1.7.2.- <u>Animales sometidos a fotoperiodo corto</u></i>	105

4.1.8.- Microscopía electrónica de transmisión	105
<i>4.1.8.1.- Animales jóvenes, adultos y envejecidos (6, 12 y 24 meses)</i>	105
<i>4.1.8.2.- Animales sometidos a fotoperiodo corto</i>	107
4.2.- RESULTADOS SEMICUANTITATIVOS	153
4.2.1.- Porcentaje de células intersticiales	153
4.2.2.- Porcentaje de los tipos de células de Leydig observadas: A y B	155
4.2.3.- Índice de la actividad proliferativa de células intersticiales: célula de Leydig, pericito y célula mioide	156
4.2.4.- Índice de apoptosis de células intersticiales: célula de Leydig, pericito y célula mioide	158
4.2.5.- Índice de células de Leydig positivas a testosterona	160
4.2.6.- Índice de positividad a testosterona de células de Leydig de tipo A y de tipo B	161
4.2.7.- Volumen de tejido conjuntivo en animales de 6, 12 y 24 meses y animales con testículo regresado	162
4.2.8.- Índice de células de Leydig positivas a HSP-47	163
4.2.9.- Índice de células de Leydig positivas a colágeno IV ($\alpha 5$)	164
5.- DISCUSIÓN	167
6.- CONCLUSIONES	197
7.- RESUMEN	203
8.- BIBLIOGRAFÍA	209

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-Justificación

El envejecimiento es uno de los procesos que despierta mayor interés en la sociedad actual y en diferentes ámbitos de la medicina, como es en el área de la reproducción humana, por el deseo de mantenerla en edades cada vez más avanzadas. El proceso de envejecimiento se define como una pérdida progresiva de la función corporal acompañada por una disminución en la fertilidad y un incremento en la mortalidad con el avance de la edad (Kirkwood y Austad, 2000). Las causas del mismo son de carácter multifactorial, incluye eventos como acortamiento de los telómeros, daños en el DNA, stress oxidativo, mutaciones que producen inestabilidad del genoma, alteraciones en lípidos y metabolismo de carbohidratos etc (Malisan y Testi, 2002) siendo todo ello objeto de múltiples estudios. Algunos de ellos han intentado explicar cuales son los procesos por los cuales las células envejecen. Aunque son variadas las teorías sobre el mismo como: "Teoría de la acumulación de productos de desecho"; "Teoría de la mutación genética nuclear"; "Teoría de la destrucción de las membranas por radicales libres", no se ha llegado a un consenso sobre los mecanismos exactos que producen el envejecimiento celular (Luo y cols., 2006). En el hombre, el envejecimiento es inexorable, ya que la progresiva disminución en la capacidad fisiológica y la reducida habilidad para responder al stress medioambiental incrementa la susceptibilidad y vulnerabilidad de la vida (Troen, 2003). El envejecimiento afecta a todas las células, tejidos y sistemas fisiológicos.

Son muchos los autores que se han centrado en estudiar el envejecimiento del testículo por su repercusión en el sistema reproductor masculino. Estos estudios se han centrado especialmente en el epitelio seminífero aunque también han abordado el intersticio testicular (Paniagua y cols., 1991; Mendis-Handagama y Gelber, 1995). En el primer caso los trabajos son muy numerosos y realizados en distintas especies como en el hombre (Paniagua y cols., 1986), burro (Nipken y Wrobel, 1997), rata (Wright y cols., 1993) y hámster (Morales y cols., 2003). Muchos de ellos tienen carácter histológico y se han hecho tanto con microscopía de luz como electrónica. En ellos se demuestra que la edad produce un deterioro de la espermatogénesis acompañado de alteraciones de las células de Sertoli y de la pared tubular; esta última sufre un engrosamiento con aumento de las proteínas de su matriz extracelular (Morales y cols., 2004). En el hámster se observa una involución progresiva de los túbulos seminíferos que comienza a ser “perceptible” a los 12 meses con una ligera hipoespermatogénesis y descamación celular (Horn y cols., 1996). Morfométricamente en el hámster existe posteriormente una disminución del diámetro del túbulo seminífero, disminución de la altura del epitelio germinal y disminución tanto del volumen tubular como epitelial en los animales envejecidos de 24 meses (Morales y cols., 2004).

En estos últimos años ha aumentado el interés por conocer la base celular de este deterioro, estudiándose la dinámica celular existente con el paso de los años entre el proceso de proliferación de las espermatogonias que mantiene el epitelio y el proceso de muerte celular en el mismo. Se ha observado que hay tanto un descenso de la proliferación de las espermatogonias como un incremento de la apoptosis en el epitelio seminífero que afecta a las espermatogonias y a los espermatocitos (Morales y cols., 2003).

Respecto al intersticio testicular y su modificación con el envejecimiento los trabajos se han centrado principalmente en cuatro aspectos. El primero en dilucidar si existen cambios en la síntesis de testosterona con la edad. Los estudios son numerosos en el hombre (Neaves y cols., 1984; Chen y cols., 2007) y en la rata Sprague-Dawley donde se produce una disminución de la síntesis de testosterona que tiene su origen en la disminución del número de

receptores de la hormona luteinizante (Limonta y cols., 1987). Por el contrario, el hámster sirio no muestra cambios en los niveles de testosterona en sangre con la edad ni tampoco de hormonas hipofisarias (Swanson y cols., 1982).

Otro aspecto al que se le ha prestado atención y que está muy relacionado con el anterior es determinar si existen alteraciones en las células de Leydig a nivel ultraestructural con la edad. Tales cambios estarían relacionados con una deficiente producción de testosterona. Los trabajos realizados tanto en el hombre como en otras especies han permitido observar como con el envejecimiento hay un deterioro celular que afecta a diversas organelas citoplasmáticas de la célula de Leydig. Así en el hombre se han observado varios tipos de células de Leydig envejecidas. Unas presentan desdiferenciación con una disminución de retículo endoplásmico liso y del número y tamaño de las mitocondrias. Otras presentan acumulación de gotas lipídicas y mayor número de inclusiones cristalinas (cristales de Reinke) o inclusiones paracristalinas, similares a las observadas en células de Leydig normales, pero en mayor número. También se encuentran otras células con abundantes cuerpos residuales y multivesiculares (Paniagua y cols., 1986). Ligado a esto, también ha sido muy estudiada y debatida la posible disminución de células de Leydig con la edad. Este aspecto se relaciona con la disminución en la producción de testosterona, ya que parece de sentido común, que una pérdida en el número de células de Leydig con la edad supondría una menor producción de testosterona y explicaría la disminución de la misma observada en sangre. Los trabajos muestran cierta disparidad de resultados. Por un lado, hay varios que determinan una disminución del número de células de Leydig en especies como el hombre o el cerdo (Kaler y Neaves, 1978; Triperi y cols., 2000), mientras que otros no observan tal disminución como en el caballo (Johnson y Neaves, 1981). En el caso del hámster sirio se ha podido determinar que ya en los animales de 18 meses existe una disminución significativa del número de las células de Leydig pero no en los animales de 12 meses (Horn y cols., 1996).

Evidentemente la posible desaparición de células de Leydig con la edad ha llevado a varios autores a preguntarse cuál es el mecanismo por el que la

población de estas células se mantiene en equilibrio y como se modifica con la edad. Al contrario que en el epitelio seminífero, los estudios sobre proliferación y apoptosis de células de Leydig y la relación entre sí de ambos fenómenos son escasos. En el hombre existe una baja tasa de recambio de células de Leydig y se plantea que la disminución de las mismas con el envejecimiento es debido más que a una desdiferenciación de estas células en fibroblastos a una degeneración de ellas con el paso de la edad (Neaves y cols., 1985). Otros autores hablan de diferentes tipos de células de Leydig –con mayor o menor actividad sintética- lo que plantea que con la edad pudiera haber un incremento del número de células con baja actividad sintética como ocurre en diversas situaciones patológicas, disminuyendo consecuentemente la producción de testosterona (Regadera y cols., 1991). Ahora bien, junto a esta eliminación o baja funcionalidad se ha observado en el hámster que las células de Leydig pueden tener un cierto recambio y que por consiguiente puede existir una población de edad heterogénea de estas células en el intersticio en condiciones normales (Shina Hikim y cols., 1988a). Tal recambio provendría de la proliferación y diferenciación de una célula madre aún por determinar. De hecho recientemente se está considerando que los pericitos que acompañan a los vasos del intersticio testicular podrían ser los primeros progenitores de las células de Leydig adultas (Davidoff., 2004, 2009). Por último, la muerte de células de Leydig por apoptosis ha sido siempre descrita en condiciones no normales o patológicas, desconociéndose si este tipo de muerte puede ser importante en el balance celular habitual del intersticio o en el desequilibrio en el número que se puede producir con la edad (Rommerts y cols., 2004).

El último aspecto al que se le ha prestado menos atención que los anteriores en relación al envejecimiento del intersticio testicular es al tejido conjuntivo del mismo. Así, en la rata Sprague-Dawley se ha observado un aumento del volumen de fibras de colágeno en el intersticio de los testículos envejecidos relacionándose con una reducción significativa en la síntesis y secreción de testosterona (Luchuan y cols., 2004). Este incremento de fibras podría deteriorar la función de la célula de Leydig. Además, se ha observado que el gen de la proteína de choque térmico (HSP-47), que está implicada en la síntesis de diversos colágenos, es localizado de forma sobreexpresada en

células de Leydig de ratas envejecidas (Syntin y cols., 2001). Así mismo, se ha observado una modificación de la esterodeinogénesis de las células de Leydig debida a la influencia de la matriz extracelular especialmente por el colágeno IV, que puede ser sintetizado por la propia célula de Leydig y su presencia regula negativamente la síntesis de testosterona por parte de ella (Díaz y cols., 2002).

Otro de los fenómenos que altera el funcionamiento del sistema reproductor al igual que el envejecimiento y que tiene lugar en la naturaleza en determinadas épocas del año en algunas especies de mamíferos, es la exposición a pocas horas de luz, es decir a un fotoperiodo corto. Algunos machos de mamíferos con reproducción estacional muestran cambios considerables en la masa testicular, estructura y función a lo largo de un ciclo anual. Así el hámster sirio también ha sido uno de los modelos más usados para los estudios del control fotoperiódico de la reproducción, ya que las diferencias estacionales en las funciones reproductoras y endocrinas son fácilmente apreciables en las poblaciones de laboratorio de esta especie cuando son expuestas a diferentes fotoperiodos. En este caso se produce una regresión testicular inducida por el fotoperiodo corto en el otoño o tras la exposición artificial del mismo en este animal, acompañado por una drástica reducción en la concentración de gonadotropinas, prolactina (PRL) y testosterona en la circulación periférica. El peso del testículo se reduce diez veces y disminuyen en número los receptores de hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH) y prolactina (PRL) (Shina Hikim y cols., 1988a). Esta regresión al contrario que la producida por el envejecimiento es de carácter reversible. Pasados unos cuatro meses en esas condiciones el testículo vuelve a su estado normal proceso denominado recrudescencia, previo a la época reproductiva del año (Sinha Hikim y cols., 1988a). Los mecanismos celulares que acompañan la regresión del testículo por fotoperiodo corto se han estudiado en estos últimos años y al igual que en el envejecimiento se ha prestado más atención al epitelio seminífero que al intersticio (Morales y cols., 2007). Con respecto al epitelio seminífero se ha podido demostrar la importancia que tiene el incremento de la apoptosis para la depleción del mismo, observándose que en el hámster, en los testículos ya

regresados, el epitelio no avanza en su diferenciación debido a la apoptosis masiva de los espermatocitos (Morales y cols., 2007). En cuanto al intersticio los estudios existentes son de carácter morfométrico o ultraestructural. Los primeros muestran una reducción importante del volumen tubular e intersticial del testículo y los segundos indican que la disminución de la testosterona en sangre se acompaña de una aparente atrofia de las células de Leydig que afecta tanto a su morfología como a sus orgánulos citoplasmáticos (Wing y Lin, 1977; Sinha Hikim y cols., 1988b). En el intersticio se aprecia una disminución del volumen de los vasos sanguíneos y un engrosamiento de la membrana basal de los mismos (Mayerhofer y cols., 1989). También se ha debatido por varios autores, especialmente en el hámster, si en el proceso de regresión se produce una disminución del número de células de Leydig, planteándose posibles hipótesis de como se renueva la población en la recrudescencia, a partir de qué tipo celular y cuál sería el proceso que llevaría a la eliminación de células de Leydig durante la regresión. En estos trabajos no se ha tenido en cuenta la posible participación de la apoptosis ni tampoco se ha evaluado como los cambios intersticiales pueden afectar a la funcionalidad de la célula de Leydig (Hardy y cols., 1987; Johnson y cols., 1987; Sinha Hikim y cols., 1988b).

Nuestro laboratorio ha estudiado con detalle la regresión del epitelio seminífero del hámster sirio debida al envejecimiento y al fotoperiodo corto mostrando las diferencias que existen entre los dos, teniendo siempre en cuenta el carácter irreversible del primero y reversible del segundo. Nuestros estudios se han centrado en la caracterización histológica óptica, morfométrica y ultraestructural así como en el estudio de los cambios de la proliferación y la apoptosis durante ambos procesos. Tanto el equilibrio entre proliferación y apoptosis como la regulación de esta última, muestran diferencias que explican el carácter irreversible y reversible de ambas regresiones epiteliales (Morales y cols., 2003; 2004; 2007; Pastor y cols., 2011).

En la presente tesis doctoral nos proponemos estudiar el intersticio testicular en el hámster (*Mesocricetus auratus*) durante el envejecimiento y

tras la exposición a fotoperiodo corto, con el fin de que al mismo tiempo que caracterizamos las diferencias celulares existentes entre ambos, esto nos permita obtener nuevos conocimientos sobre los diversos problemas que han ido surgiendo en la bibliografía a lo largo de estos años. De esta manera, abordaremos un estudio comparativo del intersticio testicular tanto en condiciones normales, envejecido y tras fotoperiodo corto. Valoraremos la actividad proliferativa y apoptótica de las principales células del mismo, y sus cambios ultraestructurales. Indirectamente estudiaremos la actividad sintética de las células de Leydig y también abordaremos algunos posibles cambios en la matriz extracelular que pueden influir en la actividad de ésta célula entre los tres grupos de estudio: normal, envejecido y tras fotoperiodo corto. Al realizar el estudio en el hámster sirio podremos también continuar investigaciones previas para explicar mejor los hechos, un tanto paradójicos, que como hemos indicado muestra esta especie en el envejecimiento, en el que por un lado, hay una disminución del número de sus células de Leydig, manteniéndose por otro, sus niveles de testosterona plasmática normales. Esperamos aportar con las técnicas utilizadas en nuestro estudio, nueva información sobre la dinámica celular de la célula de Leydig, su posible origen en estado adulto, el mecanismo de su eliminación en condiciones normales, la posible heterogeneidad de la población de células de Leydig, o la influencia del tejido conjuntivo en la esterodeinogénesis, evaluando estos dos procesos fisiológicos tan diferentes entre sí como son el envejecimiento y la regresión tras fotoperiodo corto. Al mismo tiempo esperamos explicar mejor el envejecimiento del testículo del hámster sirio al completarlo con el estudio de su intersticio.

1.2.-Objetivos

Por tanto, los objetivos que nos hemos planteado en la presente tesis doctoral son:

a) Realizar una descripción morfológica del intersticio testicular en el hámster *Mesocricetus auratus* a los 6, 12 y 24 meses y tras ser expuestos a fotoperiodo corto, con especial atención a las células de Leydig, pericitos, macrófagos y células mioides.

b) Analizar la relación porcentual de estos tipos celulares en el intersticio testicular determinando cuál de estas células es relativamente más abundante y si hay modificaciones con la edad y tras la exposición a fotoperiodo corto. Así mismo, evaluar histoquímicamente y calcular el índice de células de Leydig positivas a testosterona en animales de 6, 12 y 24 meses.

c) Determinar la actividad proliferativa (células PCNA+) y apoptótica (células TUNEL+) y sus posibles cambios con la edad y tras el fotoperiodo corto en este intersticio testicular. Para ello calcularemos el índice de proliferación y apoptosis de: pericitos, células de Leydig, macrófagos y células mioides.

d) Estudiar la ultraestructura de las células de Leydig, pericitos, macrófagos y células mioides así como los cambios que puedan observarse en ellas tras el envejecimiento y fotoperiodo corto prestando especial atención a alteraciones de sus orgánulos celulares y a la observación de posibles células en situación de muerte celular.

e) Calcular el volumen de tejido conjuntivo peritubular e intersticial tanto en los testículos de los animales de 6,12, y 24 meses como tras la exposición a fotoperiodo corto. Identificar y calcular el índice de células de Leydig positivas a la proteína HSP-47 y colágeno IV ($\alpha 5$) en animales de 6, 12 y 24 meses y animales sometidos a fotoperiodo corto con testículo totalmente regresado.

2.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- INTERSTICIO TESTICULAR

2.1.1.- Generalidades

En las secciones histológicas de los testículos de mamíferos, se observa un espacio de extensión variable que separa los túbulos seminíferos individuales denominado intersticio testicular o tejido intertubular, donde se localizan numerosos vasos sanguíneos y linfáticos de calibre variable que a menudo forman una zona central alrededor de la cual existen numerosas células de Leydig y otros constituyentes del tejido. De este modo, el tejido intertubular muestra una organización histológica acorde con una función endocrina. Una abundante vascularización en estrecha asociación con las células de Leydig que facilita el paso de los esteroides a la circulación (Kretser y Kerr, 1988).

Desde hace años el tejido intertubular es considerado histológicamente un tejido conjuntivo laxo, con fibroblastos, matriz extracelular y con unas células principales: las células de Leydig. Ahora bien, también existen otros tipos celulares en el tejido intersticial testicular como: macrófagos, pericitos, linfocitos, células plasmáticas y más raramente mastocitos (Kretser y Kerr, 1988). El tejido intertubular de testículo humano está también compuesto de tejido conjuntivo que contiene vasos sanguíneos, ocasionalmente capilares linfáticos, macrófagos, mastocitos y células de Leydig (Kerr, 1991).

Las primeras descripciones sobre la histología del tejido intertubular o intersticio testicular provienen de Leydig en 1850 quien describió que los

espacios entre los túbulos seminíferos estaban ocupados por masas de células que contenían vacuolas lipídicas e inclusiones de pigmento. Otros histólogos consideraron a las células de Leydig como un tipo celular especializado del tejido conjuntivo (Kretser y Kerr., 1988).

Aunque Berthold en 1849 demostró que el testículo secretaba sustancias en el flujo sanguíneo que influían en el crecimiento de tejidos anatómicamente diversos, la pregunta sobre que parte del testículo contribuía a la secreción permaneció sin contestar durante algunos años. Es más la consideración de que las células de Leydig eran células del tejido conectivo fue apoyada por otros autores como Ebner en 1871 y Hofmeister en 1872. Posteriormente varios hechos llevaron a considerar que las células de Leydig eran productoras de grasas, nutrientes u otras sustancias para consumo de los túbulos seminíferos. Así Loisel y Ganfini en 1902 pusieron de manifiesto que las gotas lipídicas de las células de Leydig se usaban como sustrato del cual procedían las hormonas testiculares que este sintetizaba. Este hecho llevo a Ancel en 1904 a acuñar el término de “la glándula intersticial” para las células de Leydig. Además, se demostró que las células de Leydig de testículo normal y criptorquídico eran las causantes del estímulo hormonal necesario para la producción de esperma y para el mantenimiento de las características sexuales secundarias (Kretser y Kerr., 1988).

Más tarde se demostró que las inclusiones lipídicas de las células de Leydig contenían esteres de colesterol. La demostración fue realizada por McGee en 1927, que con extractos lipídicos de testículos de bovino podía estimular el desarrollo masculino cuando los administraba a otros animales. La testosterona fue finalmente identificada en estos extractos y fue sintetizada usando colesterol como material de partida. Pasaron algunos años antes de que llegara a ser claro que las células de Leydig eran el lugar principal donde se encontraban las enzimas esteroideogénicas que constituían la principal fuente de andrógenos testiculares (Kretser Y Kerr, 1988).

2.1.2.-Intersticio testicular en mamíferos y relación porcentual de sus componentes.

El testículo está funcionalmente compartimentalizado en el túbulo seminífero y en el compartimento endocrino, donde la espermatogénesis y la biosíntesis de testosterona tienen lugar respectivamente. Anatómicamente el compartimento espermatogénico está compuesto de células de Sertoli y células germinales en varios estados de desarrollo. El compartimento endocrino es el intersticio testicular que contiene células de Leydig, responsables de la biosíntesis de la testosterona, macrófagos residentes testiculares que están en estrecha relación con las células de Leydig, los capilares sanguíneos y los vasos linfáticos que están alrededor de los componentes del intersticio (Buchanan., 2002)

Desde hace años se conoce que los elementos del intersticio testicular pueden organizarse de diferente manera en el testículo de mamíferos. Así, en 1973 Fawcett y cols., realizaron un estudio en el que compararon la organización del tejido testicular intertubular en 14 especies de mamíferos y establecieron 4 patrones de organización.

El primero se observa en algunos roedores como el cobaya y la chinchilla. En él las células de Leydig sólo ocupan una pequeña fracción del volumen testicular y dichas células están normalmente agrupadas alrededor de los vasos sanguíneos. La mayor parte del tejido intertubular está ocupado por sinusoides linfáticos peritubulares con un fino endotelio. El drenaje linfático alcanza a prominentes vasos linfáticos situados centralmente o de manera excéntrica en cada área intertubular. Junto a estos vasos linfáticos están las células de Leydig y un estroma de fibras de colágeno con fibroblastos **(Fig.A)** (Kretser y Kerr, 1988).

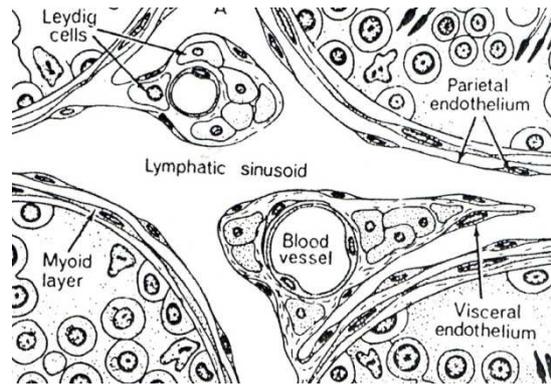


Figura A. 1^{er} patrón de organización del intersticio testicular descrito por Fawcett y cols., (1973) en especies como cobaya y chinchilla.

El segundo patrón se ha descrito en otros roedores como la rata y el ratón, las células endoteliales de los vasos linfáticos tienen escaso citoplasma por lo que permite una comunicación directa entre el tejido conectivo y el espacio linfático en la superficie cercana a los grupos de células de Leydig (**Fig.B**) (Kretser y Kerr., 1988).

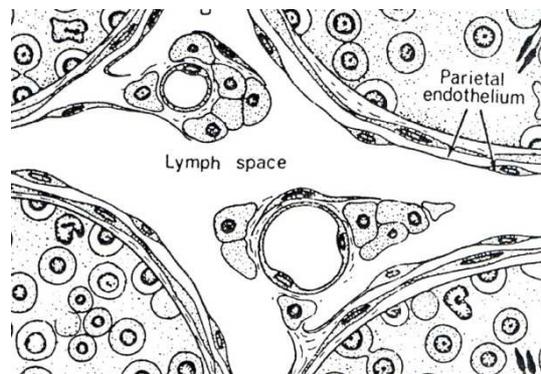


Figura B. 2^o patrón de organización del intersticio testicular descrito por Fawcett y cols., (1973) en especies como rata y ratón.

En el tercer patrón, el tejido intertubular está caracterizado por grandes áreas de tejido conectivo laxo que contienen pequeños agregados de células de Leydig asociadas con vasos sanguíneos. El drenaje linfático alcanza los grandes vasos linfáticos que ocupan centralmente cada área intertubular. Este modelo se observa en especies como el carnero, toro, elefante, mono y hombre (**Fig.C**) (Kretser y Kerr., 1988).

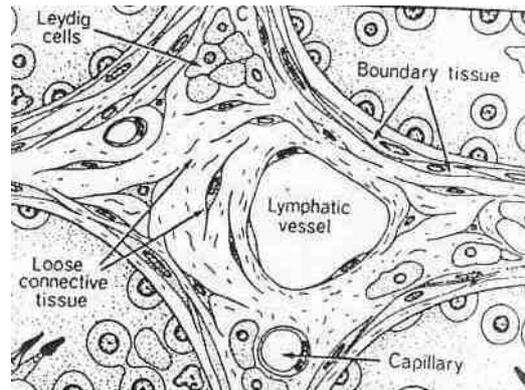


Figura C. 3^{er} patrón de organización del intersticio testicular descrito por Fawcett y cols., (1973) en carnero, toro, elefante, mono y hombre.

El cuarto y último patrón de organización del intersticio testicular observado se encuentra en ratones marsupiales como *Antechinus stuartii* y *Antechinus swainsonii*, el koala y el cerdo entre otros. En estas especies el intersticio testicular está ocupado por pequeños vasos linfáticos y sanguíneos y gran cantidad de células de Leydig que se encuentran a una distancia más cercana a los vasos sanguíneos (**Fig.D**) (Kretser y Kerr., 1988).

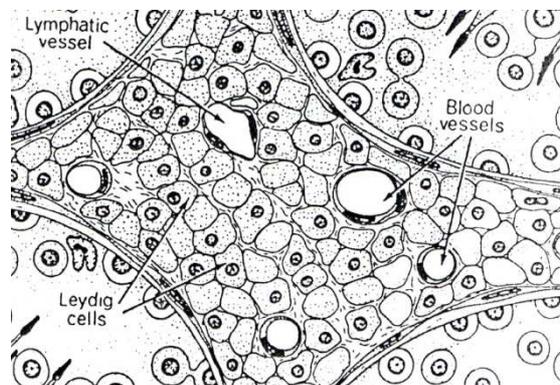


Figura D. 4^o patrón de organización del intersticio testicular descrito por Fawcett y cols., (1973) en especies como el koala y el cerdo.

En relación al porcentaje de volumen que ocupan los diversos elementos del intersticio testicular existen algunos datos. Así, Sinha Hikim y cols., (1988) en su estudio morfométrico de testículo de hámster determinaron que el 6,22% del volumen testicular está ocupado por el tejido intertubular incluyendo células de

Leydig (1.42%), vasos sanguíneos (1.49%), macrófagos (0.25%) y células del tejido conectivo (0.26%). En el mismo año Mendis-Handagama y cols. (1988) estudiaron también el porcentaje de volumen del intersticio por gramo de testículo en otras 2 especies además del hámster, en rata y en cobaya. El volumen de intersticio, de espacio linfático, de células de Leydig por gramo de testículo y la media de volumen de células de Leydig fue significativamente diferente en las tres especies. Fue más alto en cobaya (13.28%, 5.95%, 33.94%, 3.53%) intermedio en rata (9.45%, 4.44%, 24.52%, 2.55%) y más bajo en hámster (6.12%, 1.89%, 13.17%, 1.37%). En relación al volumen de vasos sanguíneos por gramo de testículo no fue significativamente diferente en las tres especies y en cuanto a la densidad de área de las células de Leydig fue similar en rata y cobaya pero más baja en el hámster. El volumen de macrófagos por gramo de testículo y la densidad de los mismos fue menor en cobaya que en rata y hámster siendo en estos últimos similar. En otro roedor como el ratón australiano *Notomys alexis* el porcentaje de volumen de intersticio que ocupan las células de Leydig es del 57.5%, los macrófagos 1.8%, los vasos sanguíneos 23.6%, los vasos linfáticos 12.4%, las células mioideas 4.6% y otros componentes 0.2% (Peirce y Breed., 1990). En otra especie de mamífero, el jaguar, alrededor del 13% del parénquima testicular es ocupado por células de Leydig, el 8.3% por tejido conectivo y el 0.3% por vasos linfáticos. Las células de Leydig ocupan una media de 0.0036% del peso del cuerpo (Prince., 1984).

2.1.3.-Célula de Leydig: identificación, tipos y origen.

Las células de Leydig están presentes en el compartimento intersticial de los testículos y su principal función es producir testosterona que es esencial para la espermatogénesis y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios (Sriraman y cols., 2000). Es el tipo celular que con más frecuencia se ha encontrado en el intersticio testicular (Russell y cols., 1990).

Estas células sintetizan y secretan andrógenos en respuesta a la hormona luteinizante y a un gran conjunto de factores que actúan de manera paracrina y/o autocrina (Díaz y cols., 2002). La producción de andrógenos por las células

de Leydig está relacionada con el tejido intersticial testicular vascularizado. La testosterona actúa tanto en el compartimento del túbulo seminífero como en los tejidos diana androgénicos extra testiculares vía circulación periférica. Debido a la naturaleza de la compartimentalización testicular (anatómica y funcional), las células intersticiales están reguladas por factores extra- e intra-testiculares. La producción de andrógenos representa el regulador decisivo de espermatogénesis y de la función de los tejidos dependientes de andrógenos (Buchanan., 2002)

Las células de Leydig representan una población heterogénea. Existen diferencias en la organización, número, forma y otras propiedades celulares de las mismas entre especies (Davidoff y cols., 2009). Regadera y cols., (1991) identifican por un lado a las células de Leydig en el intersticio testicular humano formando grupos superiores a 10 células. Aunque por otro algunas de las células de Leydig intersticiales están próximas a la lámina propia del túbulo seminífero. Estas células son designadas como células de Leydig peritubulares. Este mismo autor años más tarde identifica células de Leydig en la túnica albugínea y en el cordón espermático humano, siendo en estos dos lugares el porcentaje de estas células más bajo que en el parénquima testicular en todos los casos estudiados (adulto, joven y criptorquídico) (Regadera y cols., 1993).

Otra forma de clasificación e identificación de células de Leydig es la realizada por Qureshi y Sharpe., (1993). Estos autores muestran que las células de Leydig en testículo humano son altamente heterogéneas y consisten en células claras y oscuras tras su tinción con azul de toluidina. Estas diferencias como indica este estudio podrían estar relacionadas con su regulación y/o función. Sin embargo, los datos no muestran la idea de que las células de Leydig claras y oscuras deban diferenciarse por su capacidad esteroideogénica.

En general, las células de Leydig son identificadas por su citoplasma eosinofílico (Nistal y cols., 1986). También las células de Leydig se pueden clasificar en tres grupos acorde con la intensidad de tinción para el anticuerpo de

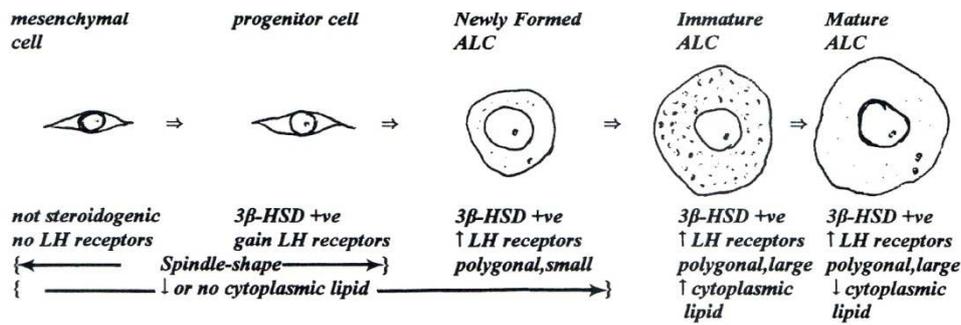
testosterona: células intensamente teñidas (T^{++}), células débilmente teñidas (T^+) y células no teñidas (T^-), siendo el número de células por ml de testículo en el hombre que contienen testosterona de 4824 ± 228 (Nistal y cols., 1986).

Regadera y cols., (1991) también clasifican a las células de Leydig por su afinidad al anticuerpo testosterona en: células intensamente teñidas (T^{++}), células débilmente teñidas (T^+) y células no teñidas (T^-) y relaciona dicha afinidad con su morfología: normal, multivacuolada y pleomórfica. En células de Leydig con morfología normal el porcentaje de células T^{++} fue del 29.4%, T^+ 57.6% y en T^- 9%. En células de Leydig multivacuoladas el porcentaje de éstas que fueron T^{++} fue del 0%, T^+ 3.1% y en T^- 0.9%. Sólo se observaron células pleomórficas en testículos con el síndrome de Klinefelter's.

Las poblaciones de células de Leydig que se diferencian prenatalmente y postnatalmente se denominan células de Leydig fetales y adultas respectivamente. La existencia de estas dos poblaciones de células ha sido documentada ampliamente en la literatura. Estas investigaciones incluyen algunas especies de mamíferos como conejo, cerdo, hurón y rata (Mendis-Handagama y Ariyaratne., 2001). Aunque esta última es la más estudiada.

Las células de Leydig fetales de rata proceden de los fibroblastos mesenquimales de los que se pueden diferenciar a nivel ultraestructural a partir del día 14,5 fetal por su forma redondeada y porque en su citoplasma hay mitocondrias túbulovesiculares, retículo endoplasmático liso y pequeñas gotas lipídicas; además expresan el receptor de LH y sintetizan 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) (Haider., 2004).

Las células de Leydig adultas de rata inician su diferenciación alrededor de la 2^o semana postnatal a partir de la proliferación de las células precursoras que sucesivamente se diferencian en: células progenitoras, células de Leydig tempranas, células de Leydig inmaduras y células de Leydig maduras o adultas (Mendis-Handagama y Ariyaratne., 2001) (**Esquema 1**).



Esquema 1. Diferenciación de células de Leydig adultas.

(Mendis-Handagama y Ariyaratne., 2001)

Las células precursoras de las células de Leydig adultas son células similares a fibroblastos no diferenciados o células mesenquimales observables en el testículo de mamíferos obtenidos de algunas especies como rata, ratón, cerdo y hombre (Baillie A.H., 1964). El primer paso en la diferenciación de la célula de Leydig adulta es la transformación de las células precursoras en progenitoras. Los mecanismos celulares o moleculares para la diferenciación no han sido completamente descritos. La diferencia más obvia entre las células progenitoras y las células de Leydig adultas tempranas es el cambio en la forma de la célula de fusiforme a poligonal. Además esta diferencia está acompañada por el movimiento de la célula al intersticio central y por ser positivas a 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11β-HSD). El tamaño de las células de Leydig adultas tempranas aumenta progresivamente con la edad, por aumento del citoplasma y pasan a células de Leydig adultas inmaduras. Estas células tienen menor cantidad de gotas lipídicas y de menor tamaño que las células de Leydig fetales pero la actividad de las enzimas de la ruta esteroidogénica: citocromo P450_{SCC}, 3β-HSD y P450_{C17}, aumentan rápidamente. Sin embargo la actividad de 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD) es más baja ya que la capacidad de producir testosterona es menor en estas células que en las células de Leydig adultas maduras. El paso final en el desarrollo de la célula de Leydig adulta es la transformación de inmadura a madura. Esta transición se caracteriza por un aumento significativo en el tamaño de la célula y desaparición de las gotas lipídicas. La capacidad de secretar testosterona aumenta significativamente en las células de Leydig maduras porque adquieren más organelas necesarias para la producción

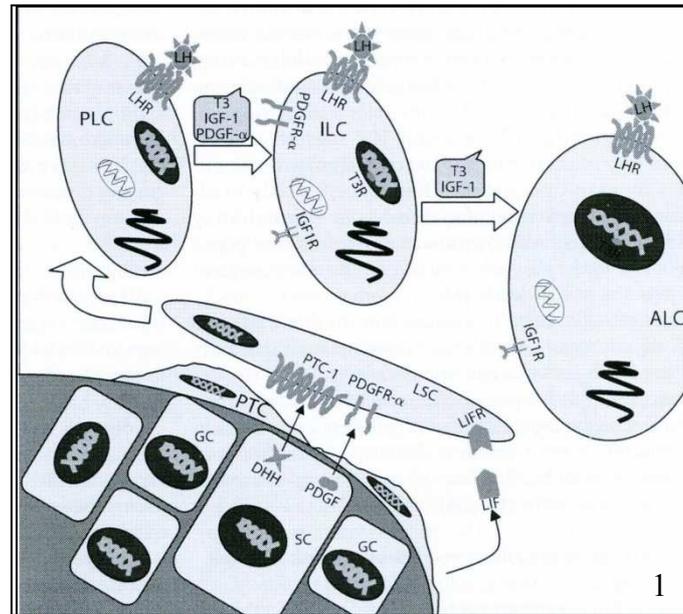
esteroidea y aumenta la respuesta a la LH circulante. También se pierden enzimas que metabolizan la testosterona contribuyendo al incremento de la capacidad secretora de testosterona (Mendis-Handagama y Ariyaratne., 2001) **(Esquema 1)**.

Recientemente los trabajos de Stanley y cols., (2011), sobre la expresión de genes durante el desarrollo de la población de células de Leydig en rata adulta ponen de manifiesto que las células de Leydig adultas (ALC) proceden de células madre (SLC) pasando por dos estados intermedios que son las progenitoras de las células de Leydig (PLC) y las células de Leydig inmaduras (ILC). PLC proliferan y secretan esteroides, principalmente androsterona. ILC tienen un alto contenido lipídico, secretan altos niveles de andrógenos 5α -reducidos junto con una alta actividad 5α -reductasa y una reducida capacidad proliferativa cuando comparamos con PLC. ALC tiene un reducido contenido lipídico y presenta niveles reducidos de enzimas que metabolizan la testosterona en comparación con ILC, además producen altos niveles de testosterona como principal producto esteroideo. Estos autores también muestran que las SLC tienen algunas características moleculares de otras células madre. El desarrollo de células de Leydig procedentes de SLC a PLC se asocia con una disminución en la expresión de genes relacionados con la esteroidogénesis. La expresión de genes entre PLC e ILC es relativamente mínima, sugiriendo que estas células son muy similares. En contraste los cambios en la expresión de genes entre SLC y ALC son diferentes (Stanley y cols., 2011).

En otras especies de mamíferos como el búfalo se identifican sólo dos poblaciones de células de Leydig en el intersticio testicular: fetales y adultas. Las células de Leydig fetales forman grandes grupos en los cuales las células están apretadas y se observan en el intersticio en todos los estados de desarrollo: 1, 3, 6, 9, 12, 15, meses de edad, disminuyendo su porcentaje a partir de los 3 meses, mientras que las células de Leydig adultas solas o en grupos aparecen en el intersticio testicular a partir de los 3 meses (Rana y Bilaspuri., 2000).

En el hombre son varios los estudios morfológicos y ultraestructurales de células de Leydig realizados durante la etapa fetal (Codesal., 1990; Holstein., 1970), neonatal (Prince., 1985), prepuberal (Prince., 1984) y adulta (Schulze., 1984). Las células de Leydig aparecen en la gónada embrionaria después de la determinación testicular y probablemente procede de múltiples tejidos embrionarios que incluyen el epitelio celómico, cresta gonadal mesenquimal y las células mesonéfricas (Habert y cols., 2001). El desarrollo de las células de Leydig fetales en el hombre es un proceso complejo que conlleva eventos celulares de: proliferación, diferenciación, involución y cambios específicos asociados a la morfología y a la función. La cerrada similitud funcional entre las células de Leydig fetales y las células adrenocorticales encontradas recientemente sugieren un origen común durante la embriogénesis. Las células de Leydig fetales incrementan su número durante los 2-3 meses iniciales después del nacimiento y están asociadas con el incremento en la testosterona plasmática durante el periodo embrionario y fetal temprano. Estas células poseen una maquinaria esteroideogénica bien desarrollada expresando el receptor de la hormona luteinizante (LHR) y las enzimas esteroideogénicas (3β HSD, P450_{SCC}, P450c17) requeridas para la biosíntesis de andrógenos (Svechnikov y cols., 2010). En síntesis, el desarrollo de células de Leydig fetales puede ser dividido en tres estados; diferenciación, maduración fetal e involución (Peliniemi y Niemi., 1969). Las células fetales se diferencian aproximadamente a la octava semana de vida intrauterina. Y su involución comienza después de la vigésimocuarta semana. Desde esta edad hasta el nacimiento el número de células de Leydig sufre una reducción del 60%. También disminuyen los niveles de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), LH y testosterona desde la vigésima semana hasta el nacimiento (Codesal y cols., 1990).

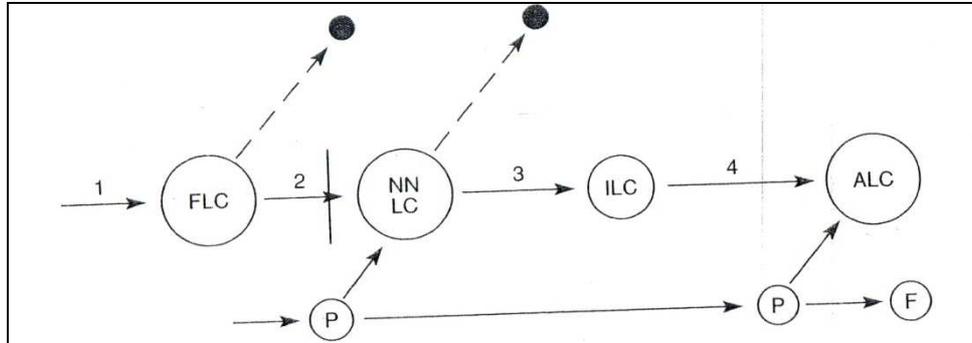
La compleja diferenciación postnatal de las células de Leydig adultas humanas envuelve una multitud de eventos celulares dando lugar a células de Leydig maduras con una maquinaria esteroideogénica bien desarrollada (**Esquema 2**).



Esquema 2. Supuesto esquema de la diferenciación de células de Leydig humanas. Células peritubulares (PTC) y células de Sertoli (SC) secretan un número de factores críticos incluyendo LIF, PDGF- α and Dhh que promueven a las células madre de Leydig a proliferar y migrar al compartimento intersticial del testículo donde se diferencian en progenitores de células de Leydig (PLC). Posteriormente, una combinación de factores de crecimiento y hormonas (LH, T₃, IGF-1 and PDFG- α) activan sus señales que promueven la transición de PLC a células de Leydig inmaduras (ILC) y finalmente en una población de células de Leydig adultas (ALC). (Svechnikov y cols., 2010)

Durante la diferenciación de células de Leydig adultas, los precursores llegan a ser más grandes; su abundante citoplasma más eosinófilo y las células adquieren características epiteliales. Todas estas alteraciones morfológicas están acompañadas por proliferación y un incremento en la expresión de enzimas esteroidogénicas y de los receptores de LH que mejoran significativamente la capacidad de producción de testosterona de estas células (Svechnikov y cols., 2010) **(Esquema 2)**.

Prince., (2001) propone una naturaleza trifásica del desarrollo de la célula de Leydig humana, diferenciándose morfológicamente tres tipos de células de Leydig: fetales, neonatales y adultas (**Esquema 3**).



Esquema 3. Tres fases del desarrollo de la célula de Leydig en humanos. En el eje horizontal: 1) Desarrollo de células de Leydig fetales (FLC) procedentes de precursores mesenquimales no diferenciados; 2) regresión de células de Leydig fetales con la correspondiente maduración en células de Leydig neonatales maduras (NNLC); la línea vertical representa el nacimiento, la línea discontinua con un círculo al final representa las células que degeneran después de la fase fetal; 3) regresión de NNLC a células de Leydig inmaduras (ILC) presentes en la infancia; 4) maduración de ILC en la pubertad a células de Leydig adultas (ALC). P, células precursoras que incluyen fibroblastos primitivos del intersticio y fibroblastos peritubulares; F, células fibroblásticas del intersticio adulto. (Prince., 2001).

Este patrón celular morfológico descrito por Prince, (2001) se corresponde con los estudios bioquímicos que claramente indican un patrón trifásico de producción de testosterona durante el desarrollo masculino. Las fases de una elevada proliferación de células de Leydig así como la máxima producción de testosterona son entre las 14-19 semanas de vida fetal, del segundo al tercer mes después del nacimiento y desde la pubertad a la vida adulta (Winter y cols., 1976).

Numerosos científicos han encontrado sustancias activas biológicamente diferentes que producen las células de Leydig y que están envueltas en la regulación de la esteroidogénesis y la comunicación entre los diferentes tipos celulares testiculares. De este modo, ha llegado a ser hoy evidente que además del control, bien conocido, por los esteroides existe un importante mecanismo de control local autocrino y paracrino de las funciones testiculares. Una nueva perspectiva sobre la naturaleza de la célula de Leydig se ha abierto durante estos últimos 20 años y permite revelar nuevas características importantes de las células de Leydig que muestran su similitud con estructuras

del sistema nervioso periférico y central. Estas incluyen la expresión de neurohormonas, neurotransmisores, neuropéptidos y antígenos de células gliales (Davidoff y cols., 2009). A finales del siglo XX Schulze y cols., (1987) observaron que después de la incubación de tejido testicular humano con un anticuerpo contra la sustancia P y otro contra metionina-encefalina, las células de Leydig son fuertemente positivas a la sustancia P y a la metionina-encefalina, a ésta última con una positividad más débil. A partir de estos resultados estos autores plantearon nuevas posibilidades sobre cuál sería el origen de las células de Leydig. Posteriormente Angelova y cols., (1991) realizaron estudios inmunocitoquímicos comparando la presencia del neurotransmisor (sustancia P) y del marcador de células neuroendocrinas (enolasa específica neuronal) en células de Leydig de tres especies de mamíferos (hámster dorado, cobaya y rata) llevadas a cabo en secciones de tejido y en cultivos de células. La inmunorreactividad a la sustancia P apareció en células de Leydig fetales y adultas en hámster y cobaya, mientras que la enolasa específica neuronal se detectó en las tres especies en todos los estados de desarrollo de la célula de Leydig. Tras estos estudios, Middendorff y cols., (1993) estudiaron un mayor número de marcadores neuronales: las enzimas tirosina hidroxilasa, ácido L-amino aromático descarboxilasa, dopamina β -hidroxilasa y feniltanolamina-N-metiltransferasa, serotonina, proteína de unión a calcio parvalbúmina, calbindina y proteína S-100, proteína 2 asociada a microtúbulo, proteína neurofilamento 200, sinaptofisina, enolasa específica neuronal, sustancia P y cromogranina A+B, en testículos de hombres entre 20 y 81 años dividiéndolos en cinco grupos: cáncer de próstata (grupo control), seminoma, terapia antiandrogénica, terapia de estradiol y criptorquidismo. Todas estas sustancias fueron encontradas en la mayoría de células de Leydig de todas las secciones independientemente de los cambios patológicos de los testículos. Cohetaneamente la positividad a enolasa específica neuronal, sustancia P, metionina-encefalina y proopiomelanocortina junto con la observación al microscopio electrónico de vesículas claras y un buen número de vesículas con el núcleo denso de diferentes tamaños (100-300nm) y diferente densidad electrónica, así como pequeños haces de microtúbulos en el citoplasma, llevaron a plantear la posibilidad de una doble naturaleza por un lado de carácter esteroideogénico y por otro de carácter

neuroendocrino de las células de Leydig de testículo humano (Davidoff y cols., 1993)

Posteriormente estas observaciones sirvieron para detectar la expresión de filamentos intermedios y verificar la existencia de sustancias marcadoras para células neuronales y neuroendocrinas dentro de las células de Leydig en testículo de roedores de laboratorio como la rata adulta, ratón, gerbo, hámster sirio y cobaya. En todas estas especies se localizaron en las células de Leydig, filamentos intermedios (vimentina, citoqueratina, neurofilamento 200 kD y proteína ácida fibrilar glial (GFAP)) y otros marcadores de sustancias que son típicas de células neuroendocrinas y gliales (Ortega y cols., 2004). Las células de Leydig muestran una reacción débil con el anticuerpo antivimentina y negativo para desmina. El neurofilamento 200 kD se expresa en células de Leydig y en paquetes de fibras nerviosas. La positividad es localizada predominantemente en la región perinuclear de las células. La inmunopositividad para GFAP está presente en su mayoría en el citoplasma mostrando una intensidad de fuerte a moderada. La expresión de estas sustancias relacionadas con los neurotransmisores o neurohormonas y otras proteínas características de células neuroendocrinas, sugieren que puede ser una célula derivada de la cresta neural (Ortega y cols., 2004). Esta idea se ha confirmado recientemente por datos que sugieren una relación de los progenitores/células madre de Leydig con células del epiblasto, neuroectodermo y la cresta neural (Davidoff y cols., 2009). Davidoff y cols., (2004), realizaron un estudio para poder responder a la pregunta sobre cuáles son las células madre/progenitores de las células de Leydig. Ellos parten del hecho, que se ha establecido en la literatura, de que las células madre/progenitores en el sistema nervioso se diferencian por la expresión de la proteína nestina. Esto les lleva a pensar que la nestina puede estar implicada en la generación de las células de Leydig. Para ello administraron EDS en ratas adultas. Éste citotóxico inicialmente eliminó la población de células de Leydig, que fue seguida por una sincronizada y completa regeneración de las mismas. El patrón de distribución principal de inmunorreactividad a la nestina en el testículo dos días después del tratamiento con EDS se localizó en la microvasculatura intertubular y peritubular y con una pronunciada actividad

mitótica al mismo tiempo en las células musculares lisas vasculares y los pericitos. Las células mioides peritubulares contráctiles no expresaron nestina ni actividad mitótica. El periodo de tiempo en el que la célula de Leydig desapareció fue caracterizado por el aumento de la positividad a nestina. La desaparición de la célula de Leydig claramente coincidió con el incremento de nestina y la reaparición de la célula de Leydig con la disminución de la expresión de nestina. Al ir adquiriendo las propiedades esteroidogénicas (expresión de citocromo p450) fueron perdiendo la expresión de nestina y finalmente se transformaron en células de Leydig típicas. Esta conversión en células de Leydig fue acompañada también por una pérdida de α -actina de músculo liso proporcionando cierta evidencia de un fenómeno de transdiferenciación. También las células de Leydig nuevamente generadas, independientemente de su sitio de generación intertubular o peritubular, rápidamente llegaron a ser inmunoreactivas para diversos marcadores neuronales como la proteína 43 asociada al crecimiento, tirosin kinasa A, factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, molécula de adhesión celular neural, enolasa neurona-específica, proteína 2 asociada-microtúbulo, sinaptofisina y neuroD, así como también para proteína ácida fibrilar glial (GFAP), 2',3'-cíclico nucleótido 3'-fosfodiesterasa y A2B5-antigen, conocidos por ser expresados por astrocitos, oligodendrocitos y células progenitoras gliales, respectivamente. Así, después de la transformación desde progenitores vasculares, las células de Leydig fueron distinguidas por la expresión de varios marcadores neuronales/gliales, indicando un notable fenotipo neural tal como ya se conocía (Davidoff y cols., 2004). Estos descubrimientos, junto con los resultados y la discusión llevada a cabo anteriormente por Davidoff y cols.,(1993) sustentan la hipótesis de un origen en la cresta neural de células de Leydig.

Evidentemente estos resultados dan lugar a una cierta contradicción con los que muchos autores han sugerido de un origen mesenquimal de las células de Leydig adultas. Sin embargo, las células mesenquimales pueden ser descendientes de todas las líneas germinales. De tal manera que el término "origen mesenquimal" no refleja una descripción específica del origen de células de Leydig. Por lo que la idea de que las células de Leydig son de

múltiples orígenes es una opinión generalizada actualmente. En este contexto un gran número de resultados contradictorios han sido publicados con respecto a estas células. Ahora bien, el descubrimiento de propiedades neuroendocrinas de las células progenitoras/células madre de Leydig da lugar a un nuevo enfoque en la búsqueda de progenitores/madre de Leydig y la localización testicular de la proteína nestina, conocida por ser expresada en células madre neurales (Davidoff y cols., 2009). Además otros estudios, demuestran que los pericitos podrían ser las células madre adultas pluripotente que proporcionaría un sistema para asegurar el mantenimiento, la reparación fisiológica y la regeneración del testículo (Davidoff y cols., 2009).

2.1.4.-Macrófago

Los macrófagos son células que primariamente residen en el tejido conectivo de muchos órganos y cuyas funciones son: 1) inmunorregulación con presentación de antígeno y funciones coestimuladoras incluyendo secreción de citoquinas; 2) fagocitosis y remodelación del tejido y 3) síntesis de prostaglandinas, factores de crecimiento, citoquinas y especies reactivas de oxígeno (Buchanan., 2002; Hutson., 2006).

Los macrófagos testiculares aparecen en el testículo durante el último periodo de gestación y proliferan desde el nacimiento a la maduración sexual en respuesta a la secreción de gonadotropina (Russell y cols., 1990). En algunas especies forman alrededor del 25% de las células del intersticio (Russell y cols., 1990).

En los testículos inmaduros, los macrófagos testiculares están dispersos en el intersticio, llegando a estar próximos a las células de Leydig, formando íntimas asociaciones con ellas (Hutson., 1990). Ya en el estudio realizado por Bergh en 1987 en testículos abdominales y escrotales de ratas mostró claramente que el tamaño y la masa total de macrófagos testiculares y por tanto posiblemente también su función, eran modificados después del tratamiento con la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) *in vivo*. Esto sugirió que el incremento inducido en la actividad de la célula de Leydig

por hCG debía influir según este autor en los macrófagos testiculares. El efecto podría ser mediado por el contacto especializado entre células de Leydig y macrófagos (Bergh., 1987). Actualmente se considera que la íntima asociación entre los macrófagos intersticiales testiculares y las células de Leydig sugiere que están funcionalmente relacionadas entre sí (Buchanan., 2002). Además en el testículo de rata los macrófagos están presentes en mayor cantidad a los 20 días de edad pero no están próximos a las células de Leydig hasta el día 30, que es cuando tiene lugar el mayor incremento en la actividad secretora de la célula de Leydig de rata, esto indica una relación entre los contactos de los macrófagos y el momento en la secreción de testosterona (Hutson., 1992). Junto a esto es interesante destacar que el número de ambos, macrófagos testiculares y células de Leydig aumenta desde el nacimiento al adulto a una razón relativamente constante (11: 12), lo que sustenta una vez más el concepto de que estos dos tipos celulares están funcionalmente acoplados (Hutson.,2006). También se sabe que los macrófagos testiculares presentan receptores para FSH y responden al tratamiento de la misma. Así mismo secretan un factor que estimula la secreción de testosterona por la célula de Leydig *in vitro*, sugiriendo que los macrófagos pueden influir en la función de la célula de Leydig (Bergh., 1987). Se ha demostrado que los macrófagos intersticiales testiculares producen y secretan 25-hidroxicolesterol que causa estimulación directa de la función esteroideogénica de la célula de Leydig. La característica más específica de los macrófagos testiculares sin embargo, es su íntima asociación con células de Leydig (Buchanan., 2002).

La influencia de los macrófagos testiculares sobre el desarrollo de las células de Leydig se ha puesto de manifiesto usando diferentes tóxicos como el ácido alquilante sulfónico ester (EDS) que actúan sobre la célula de Leydig. La regeneración de células de Leydig adultas después del tratamiento con EDS es bloqueada por la eliminación de macrófagos testiculares. Estas observaciones indican que los macrófagos son necesarios probablemente junto con la LH como precursores para las fases iniciales de la proliferación así como para la actividad proliferativa de células de Leydig inmaduras (Lejeune y cols., 1998). Además se ha observado que tras la administración de EDS a la rata, tiene lugar un aumento de actividad mitótica de los macrófagos residentes (fase de

proliferación de macrófagos) que ocurre durante la fase de recuperación, asociada con la restauración de las células de Leydig (Schlatt y cols., 1999). Se han utilizado otras drogas como el bismuto para observar la viabilidad y función de las células de Leydig y los macrófagos. Cuando las células de Leydig son tratadas durante 24 horas con bismuto (1-100 μM) no se observan cambios en la viabilidad o secreción de testosterona. Sin embargo, cuando los macrófagos testiculares son tratados con bismuto (6-25 μM) se producen cambios significativos en la función de las células de Leydig. El bismuto no tiene efectos directos en las células de Leydig, pero los niveles de testosterona disminuyen por eliminación de los macrófagos testiculares como consecuencia del tratamiento (Hutson., 2006).

Hay estudios que indican que el factor inhibitorio de migración de macrófagos (MIF), una citoquina secretada por linfocitos y macrófagos durante la inflamación y que estimula la infiltración de monocitos y su proliferación, es producida por células de Leydig adultas de rata bajo condiciones normales no inflamatorias (Meinhardt y cols., 1998). Las células de Leydig regulan la función normal espermatogénica de los túbulos seminíferos por la producción de niveles adecuados de testosterona y los túbulos seminíferos producen varias citoquinas de las que se conoce el efecto en la función del macrófago, como interleuquina-1 α (IL-1 α) y el factor de transformación del crecimiento β (TGF β). Como consecuencia las células de Leydig regularían el número de macrófagos testiculares en el testículo adulto directamente o indirectamente a través de la secreción de los túbulos seminíferos (Meinhardt y cols., 1998).

2.1.5.- Pericito

Los pericitos, también llamados células adventiciales o células perivasculares, se encuentran alrededor de los endotelios capilares y venulares. Varias observaciones según algunos autores sugieren la hipótesis de que los pericitos vasculares en realidad son células madre mesenquimales presentando las características de una célula poco especializada con un núcleo grande y heterocromático (Ross y cols., 2004).

Rana y Bilaspuri., (2000) identifican a los pericitos en el intersticio testicular de búfalo como células fusiformes localizadas rodeando el endotelio vascular. Están presentes en el intersticio de todos los estados de desarrollo que ellos examinan y observan un incremento significativo de estas células entre 1 y 6 meses, seguido de una disminución a los 12-18 meses.

En un trabajo de DeFalco y cols., (2011) en ratón donde se realiza un estudio detallado del desarrollo embrionario del compartimento testicular intersticial, se muestra que las células perivasculares proliferan rápidamente entre los días E11.5-E12.5. Algunas células que expresan la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM1) en la gónada son positivas para 5-bromo-2´deoxiuridina (BrdU). También se muestra que la vascularización es requerida para estas células intersticiales positivas-VCAM1 que migran en el testículo y que contribuyen a la formación de células de Leydig y otros tipos celulares intersticiales. Este sistema muestra algunos paralelismos con órganos o tejidos que requieren interacciones mesenquimal-vascular o epitelial-vascular durante la morfogénesis, como el pulmón, tejido adiposo, hueso, páncreas, hígado y células madre neuronales.

Como vemos en el intersticio testicular no se le ha prestado mucha atención al pericito pero como dijimos anteriormente en un estudio realizado por Davidoff y cols. (2004) se ha demostrado que estas células junto con las células musculares lisas pueden ser posibles progenitores de las células de Leydig.

2.1.6.- Célula mioide

Los túbulos seminíferos de vertebrados están rodeados por una lámina propia formada por miofibroblastos, fibroblastos, matriz extracelular con fibras de colágeno y láminas basales. La lámina propia y sus células forman la base morfológica para los movimientos peristálticos de los túbulos seminíferos descritos por Rosen-Rugen en 1951 (Christl, 1990).

En la rata adulta la lámina propia está formada por dos capas. La capa interna entre el túbulo seminífero y la célula mioide compuesta por tres

elementos: 1) la lámina basal del epitelio seminífero, 2) el tejido conectivo entre el epitelio seminífero y las células mioides y 3) la membrana basal discontinua en la superficie interna de las células mioides. La capa externa entre las células mioides y las células endoteliales linfáticas está constituida de dos elementos: 1) la membrana basal en la superficie externa de la célula mioide y 2) el tejido conectivo entre las células mioides y las células endoteliales (Yazama y cols., 1997).

La lámina propia constituye una barrera permeable para la penetración de sustancias al túbulo seminífero procedentes del intersticio (Christ, 1990). En síntesis la lámina propia o tejido peritubular del túbulo seminífero consta de un número de capas de material extracelular y de células musculares lisas modificadas o células mioides, que varía según las especies (Kerr, 1991). Estas células mioides peritubulares presentan filamentos intermedios tipo desmina y pueden ser identificadas por esta característica antes de su maduración ultraestructural (Virtanen y cols., 1986). Sin embargo, se puede considerar la célula mioide como un miofibroblasto con características ultraestructurales de células intermedias entre fibroblastos y células musculares lisas (Santamaría y cols., 1992).

Las células mioides o peritubulares se encuentran localizadas alrededor de los túbulos seminíferos en todas las especies de mamíferos estudiados y contiene abundantes filamentos de actina que se distribuyen en el citoplasma de una manera diferente según la especie. En la rata, los filamentos se distribuyen circular y longitudinalmente al eje del túbulo seminífero. La ordenación de estos filamentos en las células cambia durante el desarrollo postnatal o cuando tiene lugar la parada de la espermatogénesis, como ocurre en los animales con criptorquidía. Otras proteínas citoesqueléticas que se encuentran en estas células son: miosina y vimentina. Las células mioides son contráctiles y están implicadas en el transporte de espermatozoides y fluido testicular en el túbulo (Maekawa y cols., 1996). Además estudios *in vitro* han demostrado que estas células secretan un buen número de sustancias factor peritubular que modula la función de la célula de Sertoli (PModS), TGF β , factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I), activina-A (De Winter y cols.,

1994). Es evidente que la célula mioide además de dar un soporte estructural al túbulo, también interviene en la regulación de la espermatogénesis y la función testicular, teniendo también receptores de andrógenos (Maekawa y cols., 1996). Las células peritubulares además de contribuir a la actividad contráctil de los túbulos testiculares, mantienen una interacción mesenquimal-epitelial con las células de Sertoli mediante deposición de matriz extracelular y secreción de agonistas paracrinos (Verhoeven y cols., 2000). La célula mioide y la célula de Sertoli cooperan pues en la producción y formación de una compleja matriz extracelular. Así, las células mioides producen colágeno tipo I y IV, fibronectina y proteoglicanos (Maekawa y cols., 1996) e interaccionan con las células de Sertoli, jugando un importante papel en la fisiología del túbulo seminífero a través de una secreción paracrina sobre dicha célula (Santamaría y cols., 1995). Los estudios realizados por Kliesch y cols., (1991), en hámsters dorados adultos con espermatogénesis activa y hámsters con testículo regresado también ponen de manifiesto que la secreción de la célula mioide debe ser importante en la funcionalidad de la célula de Sertoli y la espermatogénesis in vivo.

En rata, los filamentos contráctiles de actina aparecen a los 10 días de edad y maduran a los 25 días. Estos datos indican que las células mioides deben madurar morfológicamente antes de que se concluya la espermatogénesis. La ordenación de sus filamentos de actina sugiere que estos en la célula mioide se correlacionan con la actividad espermatogénica (Maekawa y cols., 1996).

Las células mioides proceden de una población de células primitivas que dan también lugar a otras células mesenquimales intersticiales. Hay datos ultraestructurales que sugieren que las células peritubulares no pueden ser diferenciadas de otras células intersticiales durante las fases tempranas de la maduración testicular (Ross, 1967). En el testículo de ratón y en el de hombre todas las células intersticiales tienen una apariencia ultraestructural similar, esto parece indicar un origen celular común para los fibroblastos estromales y para las células mioides peritubulares (Virtanen y cols., 1986). En la vecindad de la célula mioide pueden aparecer fibras nerviosas, por lo que esto también puede sugerir un control neural de la célula (Maekawa y cols., 1991).

En el hombre, las células mioides son anormales en varias enfermedades testiculares, incluyendo desordenes congénitos como el síndrome de Klinefelter's. Las alteraciones en las células mioides probablemente son las responsables de un incremento en el espesor de la lámina propia en estos casos por un aumento en la secreción de componentes de la matriz extracelular (Santamaría y cols., 1995). En otras especies como en roedores, la célula mioide también ha sido estudiada en condiciones patológicas o alteraciones funcionales. Se ha demostrado que la proliferación de dichas células en rata tiene lugar de forma previa al aumento de la secreción de componentes de la matriz extracelular con un crecimiento de la lámina propia del túbulo seminífero entre la tercera y la octava semana tras la administración de inyecciones intra-escrotales de epinefrina durante once semanas (Santamaría y cols., 1995). Las células mioides que se encuentran alrededor de los túbulos seminíferos dañados presentan una proliferación similar a la estudiada en células de Leydig de ratas criptorquídicas sometidas al tratamiento con EDS (Santamaría y cols., 1995).

Algunos fármacos como la cimetidina usado inicialmente en el tratamiento de las úlceras gástricas y duodenales y que está registrado en "Food and Drug Administration", es un tóxico testicular y ha sido estudiado por sus efectos en la célula mioide (Franca y cols., 2000). Tras la administración de diferentes dosis de este tóxico se observa que: 1) la apoptosis de células mioides peritubulares ocurre en túbulos aparentemente normales, 2) se encuentran anomalías en la lámina basal y 3) se pierden células mioides. Estos datos sugieren que el primer suceso que tiene lugar relacionado con la cimetidina en el testículo es el daño en estas células. Este es el primer fármaco con efectos descritos cuya diana son las células mioides (Franca y cols., 2000).

2.2.-PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS EN EL INTERSTICIO TESTICULAR DE MAMÍFEROS.

El control del número de células en un organismo se consigue por el equilibrio dinámico entre crecimiento en el número celular, logrado por mitosis y diferenciación de precursores celulares y la muerte celular. Alteraciones en el balance de cada uno de estos procesos puede influir en el número total de células (Gaytan y cols., 1995; Hardy y cols., 2005). Además en los estudios celulares la determinación combinada de un tipo de muerte celular, apoptosis, y proliferación celular mejora la calidad de la información pues estima el incremento o la disminución de la población celular en los tejidos (Berensztein y cols., 2006).

La proliferación se define como el aumento del número de células, resultado del crecimiento y la multiplicación celular. Mientras que la apoptosis es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos. En el testículo, durante los periodos fetales y de recién nacido ambos procesos determinan el tamaño final del órgano en el adulto y el potencial de fertilidad de éste (Berensztein y cols., 2006).

2.2.1.-Proliferación en el intersticio testicular.

La proliferación de todas las células está controlada por moléculas que afectan activando o inhibiendo a la cascada de kinasas que regulan la transición por los puntos de control del ciclo celular. El ciclo celular es positivamente regulado por D-ciclinas (D1, D2 y D3). Las D-ciclinas se unen a las kinasas dependientes de ciclina y su complejo activo fosforila los sustratos celulares dando lugar a la síntesis de DNA y permite así que la célula entre en la fase S procedente de la fase G₁ (Sriraman y cols., 2000). De las proteínas envueltas en la síntesis de DNA, el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) es una proteína de 36 KDa, que es un componente esencial en la unión de la DNA polimerasa δ y D-ciclinas para iniciar la progresión del ciclo celular. PCNA revela una reducción dependiente de la edad en sus niveles a

medida que las células de Leydig pierden su capacidad proliferativa y se diferencian (Sriraman y cols., 2000).

Como ya hemos visto en otros apartados existen 2 generaciones de células de Leydig en roedores. La primera se desarrolla durante la vida fetal y es la responsable de la masculinización del sistema urogenital masculino. La segunda población de células de Leydig aparece durante la pubertad y se diferencia en células adultas que producen testosterona necesaria para la espermatogénesis y el mantenimiento de la función reproductora masculina (Lejeune y cols., 1998). El desarrollo postnatal de células de Leydig de rata supone su proliferación, diferenciación morfológica y la adquisición de la capacidad de producir testosterona (Sriraman y cols., 2000; 2003). Lejeune y cols., (1998) proponen un aumento de la proliferación de los precursores de células de Leydig, después del tratamiento con LH exógena o hCG. Ahora bien, la LH parece no ser esencial para la proliferación de células mesenquimales. 1º los niveles de LH en suero no aumentan con el inicio de la pubertad en ratas. 2º el hipotiroidismo neonatal transitorio inducido por tratamiento con goitrogen propiltiouracil que suprime permanentemente la LH en suero, aumenta el número de células de Leydig adultas. 3º el efecto mitogénico de LH en células de Leydig inmaduras es muy pequeño comparado con el de varios factores de crecimiento como IGF, factor de crecimiento transformante α (TGF- α) e IL-1 β . 4º ninguna supresión química por LH que no sea por hipofisectomía inhibe la proliferación celular mesenquimal observada tras el tratamiento de EDS, aunque la LH es absolutamente requerida para la conversión de estos precursores en células de Leydig. Estos estudios indican que los factores de crecimiento producidos localmente están implicados en la regulación de células mesenquimales, pero la naturaleza de estos factores es en gran medida desconocida. Aunque estudios posteriores sobre la LH aseguran que es indispensable para la diferenciación funcional y la proliferación de células de Leydig (Sriraman y cols., 2003).

La proliferación de células de Leydig en ratas adultas es menor del 0,1%, como lo muestran estudios con timidina titriada, estando el recambio de células de Leydig en un rango entre 142 a 2823 días (Teerds y cols., 1989). Esto indica

que la población de células de Leydig adultas es muy estable y se supone que la muerte celular debe compensar la pequeña proliferación para mantener el número de células de Leydig constante. También la muerte de células de Leydig podría estar compensada por la proliferación procedente de otras células intersticiales, tal como ocurre tras la destrucción selectiva de todas las células de Leydig, donde la población de estas células se regenera completamente después de 8-10 semanas (Lejeune y cols., 1998). Otros autores como Johnson y cols., (1987), observan un 0,6% de células de Leydig positivas a timidina tritiada por día en testículo activo de hámster y de 1,3% en la recrudescencia. Para estos autores la existencia de células de Leydig de varias edades explicaría la heterogeneidad de las células de Leydig in vitro. Igualmente una disminución en la división de células de Leydig podría explicar el decrecimiento en el número de ellas con la edad en el hombre. Así, Neaves y cols., (1985) la desaparición de células de Leydig por degeneración y disolución, podría no ser reemplazada por la formación de nuevas células de Leydig a partir de ellas mismas. Aunque no se descarta que haya nuevas células de Leydig que puedan proceder no solo de división de otras sino de la diferenciación de otras células, lo que está claro es que hay nuevas células de Leydig que se añaden continuamente a la población de células existentes en el hámster adulto (*Mesocricetus auratus*) (Johnson y cols., 1987). Por último, Hardy., (1987) observa un índice de unión a timidina tritiada de 0,22%, y no observa positividad cuando el hámster dorado está en la fase de regresión tras fotoperiodo corto, sin embargo tiene lugar un aumento a las tres semanas tras la recrudescencia del 4,58% que considera que se debe a un precursor más que a la división de células de Leydig resistentes y que incorporan timidina tritiada como fibroblastos, células mioides o pericitos (Hardy, 1987).

La actividad proliferativa de las células de Leydig está relacionada con otras células del intersticio como los macrófagos testiculares (Lejeune y cols., 1998) y con otros tipos celulares como la célula de Sertoli. Así Wu y Murono (1994) sugieren que las células de Sertoli secretan un factor mitogénico que estimula la proliferación de las células de Leydig. Este sistema "in vitro" proporciona un modelo para el estudio de la regulación paracrina de la proliferación de las células de Leydig por células de Sertoli. Así, el co-cultivo de células de Leydig

con células de Sertoli altera drásticamente la morfología de la célula de Leydig (Wu y Muroño., 1994).

Varios factores de crecimiento, como IGF, TGF- α , TGF- β and IL-1, aunque estimulan la síntesis de ADN en células de Leydig de ratas inmaduras in vitro, su acción local en la proliferación de las células de Leydig no ha sido aún determinada (Wu y Muroño., 1994; Mendis-Handagama y Ariyaratne., 2000). Sin embargo IGF-I es otro importante factor de crecimiento que promueve la diferenciación de la célula de Leydig y su proliferación, aumentando su nivel testicular con la pubertad. Las células de Leydig de ratón a las que se les ha eliminado el gen IGF-I permanecen funcionalmente inmaduras mostrando la necesidad de IGF-I en el desarrollo de la célula de Leydig (Sriraman y cols., 2000).

Como ya sabemos el desarrollo de una nueva población de célula de Leydig después de la administración de EDS puede ser el resultado de la diferenciación de precursores de células de Leydig y de la proliferación de células de Leydig nuevamente formadas, un proceso que muestra homología con el desarrollo de la población de Leydig tipo adulto en el testículo prepubertal. Los mismos factores parece que están implicados en la estimulación de la proliferación de la célula de Leydig en el testículo prepubertal también estimulan la proliferación de la célula de Leydig tras la administración de EDS. Así, se ha determinado que en el proceso de regeneración de la célula de Leydig los receptores de LH, 3β -HSD, TGF α pueden ser observados en el testículo de rata después de la administración de EDS (Teerds y cols., 1989).

En animales a los que se les ha realizado una capsulotomización testicular después de ésta hay un progresivo incremento en el área de las secciones de células intersticiales y el número de células de Leydig, indicando la presencia de hipertrofia e hiperplasia de las células. Sin embargo, no hay cambios en el diámetro de su núcleo, sugiriendo que la actividad de las células de Leydig no mejora. En el tejido intersticial hay más células con forma irregular y fusiforme que deben ser los precursores de las células de Leydig nuevamente formadas (Quin y Lung., 2002).

2.2.2.-Apoptosis en el intersticio testicular.

Dentro de cada linaje celular, el control del número de células está determinado por un equilibrio entre proliferación, diferenciación y muerte celular (King y Cidlowski, 1998). En estos últimos años se está estudiando más el papel central de la muerte celular y en concreto de la apoptosis como factor regulador del número de células de un tejido. Éste tipo fisiológico de muerte celular ocurre en condiciones normales o patológicas, procede de la activación de genes específicos seguido por una serie de características morfológicas y patrones bioquímicos. En concreto la apoptosis no induce la reacción inflamatoria con extravasación o acumulación de leucocitos y las células apoptóticas son rápidamente eliminadas por los macrófagos residentes en el tejido (Gaytan y cols., 1995).

La apoptosis es un proceso conservado evolutivamente por el que el número de células se reduce en tejidos y órganos, tras dispararse en las mismas rutas intracelulares. Existen 2 rutas proapoptóticas importantes que han sido descritas en células de mamíferos. Una de ellas se inicia en la superficie de la célula, la vía FasL/Fas, y la segunda tiene lugar en la mitocondria. En la vía FasL/Fas, el componente central de la maquinaria apoptótica es un sistema proteolítico formado por una familia de enzimas proteasas designadas como caspasas que son inducidas por Fas y FasL. Estas enzimas participan en una cascada que se dispara en respuesta a las señales proapoptóticas culminando en la ruptura de proteínas y en el no ensamblaje de las mismas. La caspasa-3 es responsable de la proteólisis de proteínas en la fase de ejecución de la apoptosis. Así, se ha comprobado que la inhibición de la actividad de la caspasa-3 "in vitro" reduce la frecuencia de apoptosis (Cohen, 1997). La segunda ruta tiene lugar en la mitocondria y los procesos asociados a la apoptosis están envueltos en una reducción del potencial de membrana mitocondrial y la producción de especies reactivas de oxígeno (Gao y cols., 2003).

Por un lado, en condiciones normales, no se ha descrito la apoptosis en la célula de Leydig. Así, Faria y cols., (2003) observan que en ratón, la apoptosis

no ocurre en las células de Leydig durante el periodo neonatal, prepuberal, puberal y adulto. Además sugieren, que posibles células de Leydig fetales que permanecen en el testículo neonatal se asociarían con la involución o con procesos de degeneración que se observan en algunas células de Leydig y que no son causados por un proceso apoptótico. Sin embargo, en los estadios prepuberal y puberal, la fragmentación de DNA apoptótico se detecta en las células germinales presentes en los túbulos seminíferos. Otros autores suponen que la eliminación de células fetales ocurre por muerte celular y disolución de las mismas (Sniffen, 1950) o que desaparecen por desdiferenciación en células fusiformes semejantes a fibroblastos (Gruenwald, 1946).

Por otro lado, las células de Leydig sufren apoptosis en determinadas situaciones y por diferentes agentes. Se ha observado que la ruta extrínseca dependiente de la caspasa 8 está implicada en la denervación testicular que induce la apoptosis en las células de Leydig. Así, después de la eliminación del nervio espermático en ratas también se produce la muerte de células de Leydig vía apoptosis. En consecuencia, la capacidad de los testículos denervados para producir testosterona y el número de receptores de LH localizados en las células de Leydig disminuye. Además en esta investigación se demuestra que no hay diferencias significativas en la apoptosis de la célula de Leydig entre la denervación vía nervio espermático inferior y nervio espermático superior indicando que ambos nervios son igual de importantes para la supervivencia de la célula (Gong y cols., 2009).

El bismuto provoca la muerte de la célula de Leydig por apoptosis, lo cual supone una reducción en el número de las mismas en los testículos de ratas intoxicadas con el mismo (Penderson y cols., 2003). La exposición a concentraciones muy bajas pero biológicamente relevantes de químicos medioambientales como dieldrina podría también afectar a la célula de Leydig fetal humana, reduciendo la secreción de testosterona que podría dar lugar a una sutil desregulación del desarrollo reproductivo y la fecundidad adulta (Fowler y cols., 2007).

Las situaciones de stress producidas durante la época prenatal o en el desarrollo puberal temprano, limita el número de células de Leydig por disminución de su índice de mitosis (Hardy y cols., 2005). Además, el stress aumenta los niveles de corticosterona (CORT) y glucocorticoides en suero que inducen la apoptosis de las células de Leydig en ratas (Gao y cols., 2003), así, la reducción del número de células de Leydig en el testículo implica una disminución de la producción de testosterona (Hardy y cols., 2005). Los mecanismos intracelulares por los que las elevadas concentraciones de CORT y glucocorticoides actúan sobre las células de Leydig para producir la apoptosis no están todavía aclarados, aunque los resultados indican que la activación del sistema Fas/FasL, la disminución de procaspasa-3, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y el incremento de la generación de especies reactivas de oxígeno están implicados en este proceso (Gao y cols., 2003; Hardy y cols., 2005). Por último, la exposición de las células de Leydig a H₂O₂ secretada por los macrófagos testiculares aumenta su stress oxidativo y la expresión de FasL y caspasa-3 con lo que disminuye la actividad enzimática esteroideogénica de la célula de Leydig y aumenta la apoptosis de la misma (Gautam y cols., 2006)

Como estamos viendo durante varios años se han utilizado diferentes tóxicos para el estudio de los efectos que los mismos tienen sobre el intersticio testicular y más concretamente sobre la célula de Leydig. Uno de los modelos que más se ha utilizado es la administración de diferentes dosis de EDS en roedores. Éste selectivamente elimina células de Leydig como por ejemplo en el testículo de rata adulta y hámster aunque en otras como el ratón su efecto es muy pequeño (Gray y cols., 1995). EDS dependiente de glutatión rápidamente difunde a través de los tejidos y selectivamente inhibe la biosíntesis esteroidea y destroza las células de Leydig en el testículo de ratas adultas. Diferentes concentraciones de EDS pueden provocar diferentes tipos de muerte celular (Rommerts y cols., 2004).

Después de una sola inyección intraperitoneal de EDS en ratas macho Sprague-Dawley (100mg/Kg) y un posterior análisis microscópico de luz y otro de electrónico y una evaluación in vitro de la función de células de Leydig, se concluye que el patrón esteroideogénico de regeneración de células de Leydig

en animales tratados con EDS es similar al de desarrollo de células de Leydig en animales inmaduros (Myers y Abney., 1990).

Uno o dos días después de una simple administración de EDS en ratas adultas, cobayas y hámsters, las células de Leydig muestran marcadas alteraciones ultraestructurales sugiriendo degeneración y muerte celular. Las alteraciones incluyen cariopcnosis, vesiculación citoplasmática y acumulación de inclusiones lipídicas y grandes cuerpos de lipofucsina. Fragmentos de células de Leydig necróticas suelen estar después rodeados por los macrófagos del tejido intersticial (Kerr y cols., 1988).

En relación con la participación de los macrófagos en la eliminación por apoptosis de las células de Leydig tras la administración de EDS es interesante el estudio de Gaytan y cols., (1995) en donde se inyectó intra-testicularmente a ratas adultas diclorometileno difosfonato para eliminar los macrófagos. Diez días después a los animales se les inyectó intraperitonealmente EDS para inducir la apoptosis de las células de Leydig. Las principales diferencias en respuesta a la muerte de células de Leydig en testículos donde se habían eliminado los macrófagos fueron: 1) un temprano incremento en la concentración de células mononucleares, tales como linfocitos, 2) una mayor circulación de monocitos en el testículo, 3) la existencia de varios infiltrados inflamatorios en los días 3-4 y 4) la desaparición de los monocitos infiltrados en el día 10. Tras estos resultados los autores sugirieron que los macrófagos residentes en el testículo pueden prevenir la reacción inflamatoria provocada por la muerte celular masiva de células de Leydig debida al EDS.

En ratas tratadas con EDS hay un aumento significativo en la proliferación de macrófagos positivos en el día 3, coincidiendo con el pico de infiltración y expansión de la población de macrófagos en respuesta a la destrucción de la célula de Leydig. Sin embargo, 14 días después del tratamiento con EDS, la proliferación de macrófagos es indetectable. La proliferación de macrófagos se incrementó con un pico del 55% a los 28 días y disminuyó a los 49 días (Schlatt y cols., 1999).

En rata, los efectos de una simple dosis de 100 mg/Kg de EDS elimina el 75% de células de Leydig en el intersticio testicular 24 horas después de su administración. Las células de Leydig están completamente ausentes a los 3 días. Como consecuencia de esta pérdida de células de Leydig hay un relativo incremento en la población de macrófagos. La población de células de Leydig se regenera posteriormente por la diferenciación de precursores mesenquimales similares a fibroblastos comenzando dicha regeneración a los 14 días después del tratamiento con EDS (Taylor y cols., 1998). Otros autores como Rommerts y cols., (2004) también ponen de manifiesto que las células de Leydig son eliminadas con EDS por apoptosis que está potencialmente vinculada a la activación del sistema Fas y caspasa 3.

En los animales en los cuales las células de Leydig son eliminadas por EDS y que son suplementados con testosterona tienen significativamente menos macrófagos testiculares que los animales control. Esto sugiere que las células de Leydig (pero no de la testosterona) son importantes en el mantenimiento del número normal de macrófagos en el testículo. Parece mostrar que los efectos de las células de Leydig en el número de macrófagos no están indirectamente mediados por la vía del epitelio seminífero (Hutson., 2006).

Gray y cols., (1995) realizaron un estudio en el que administraron EDS (75 y 100mg/Kg) a ratas y hámsters de 6, 12 y 18 meses de edad. La dosis utilizada causó un fuerte efecto en las ratas. Cuando los testículos fueron examinados por microscopía de luz, el número de células de Leydig disminuyó en rata mientras que en hámster sólo una tercera parte de los tratados con EDS estaban afectados, presentando una moderada reducción en el número de sus células de Leydig. En rata, los niveles de testosterona en suero comenzaron a disminuir entre 6-24 horas después de la dosis y durante 9-10 días posteriores la testosterona fue indetectable en sangre. Pasado este tiempo no se detectaron células de Leydig en el testículo de rata y los niveles de testosterona fueron también indetectables en suero, fluido intersticial y fluido del túbulo seminífero del testículo, estando la espermatogénesis y la fertilidad también reducidas. En respuesta a estos cambios testiculares, las hormonas pituitarias, LH y FSH empezaron a subir a los tres días después de la dosis de

EDS. Sin embargo, muchos de estos efectos son transitorios. A las 3 o 4 semanas después de la inyección de EDS (75 mg/Kg), las células de Leydig comienzan a repoblar el intersticio testicular, los niveles de testosterona vuelven a la normalidad y la espermatogénesis se recupera. Además los efectos reproductivos que son inducidos por EDS están claramente relacionados con la dosis del mismo. En este mismo trabajo se observó que los hámsters jóvenes, de mediana edad y viejos respondían de la misma manera al tratamiento con EDS. Solamente una tercera parte de los hámsters tratados con EDS (100 mg/Kg) presentaron una moderada disminución en células de Leydig, 3 de 10 en jóvenes (6 meses), 2 de 8 en animales de mediana edad (12 meses) y 2 de 4 en viejos (18 meses). Por el contrario las ratas tratadas con EDS estuvieron todas afectadas, 5 de 5. La reducción en la actividad del enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) en hámster tras el tratamiento con EDS fue del 35% mientras que en rata fue del 99%. En conclusión, las células de Leydig de hámster son relativamente insensibles al tratamiento con EDS (Gray y cols., 1995)

Taylor y cols., (1998), indican que los miembros de la familia de las proteínas Bcl-2, Bax y Bcl-xl no juegan un papel activo en la inducción de la apoptosis en células de Leydig en respuesta a la administración del tóxico EDS. En este estudio se evaluó el papel potencial de estos productos de genes apoptóticos en la iniciación de la apoptosis en la célula de Leydig en respuesta a EDS y se concluye que ésta en la célula de Leydig en rata está mediada por la acción del receptor Fas y su ligando. En este caso los efectos con una simple dosis de EDS (100mg/Kg) eliminaron el 75% de las células de Leydig en el intersticio después de 24 horas. Como consecuencia de la pérdida de células de Leydig se produjo un relativo incremento en la población de macrófagos. Estos autores afirman que la regeneración de la población de células de Leydig tuvo lugar mediante la diferenciación de precursores mesenquimales similares a fibroblastos.

El estudio realizado por O'Shaughnessy y cols., (2008) en rata adulta, muestra que los niveles de testosterona de las células de Leydig se recuperan a los 8 días después del tratamiento con EDS. En contraste con ratas normales

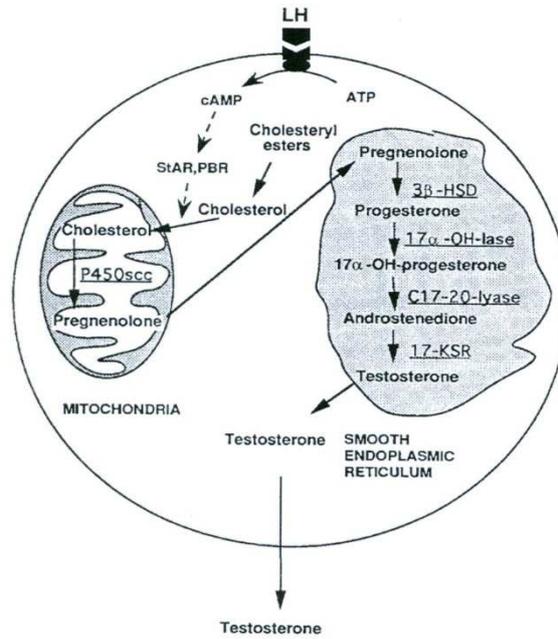
en las que los niveles de testosterona comienzan a recuperarse entre los días 14 y 21 después del tratamiento con EDS. Es conocido que la eliminación de células germinales afecta a la función de la célula de Sertoli y acelera la regeneración de células de Leydig activas en testículos libres de células germinales, lo que puede ser debido a la actividad alterada de la célula de Sertoli. LH es requerida para la regeneración de células de Leydig después del tratamiento con EDS y los niveles de LH son más altos en animales libres de células germinales tratados con EDS comparados con animales normales tratados con EDS. La regeneración más rápida de células de Leydig en animales libres de células germinales debe reflejar un incremento en la estimulación trófica del desarrollo de células precursoras (O'Shaughnessy y cols.,2008).

Por último indicar que en animales con reproducción estacional como el corzo se han encontrado células TUNEL (+) y caspasa-3 (+) dispersas dentro del compartimento intersticial durante todos los periodos estacionales. La caspasa-3 ha sido vista en células intersticiales por ser ligeramente más pronunciada que en células espermatogénicas. Los porcentajes de células apoptóticas en el tejido intertubular nunca exceden del 0,7%. Por lo tanto, no hay indicación de un aumento de la actividad apoptótica durante ninguna de las estaciones estudiadas (Blottner y Schoen., 2005).

2.3.-FUNCIONALIDAD DE LA CÉLULA DE LEYDIG

Aunque las células de Leydig se identificaron en los testículos de mamíferos y se estableció su función endocrina hacia mitad del siglo XIX, no fue hasta 1960 cuando los experimentos realizados en compartimentos de tejidos aislados (túbulo seminífero y tejido intersticial) fueron concluyentes para demostrar que la célula de Leydig era la principal fuente de andrógenos testiculares (Saez., 1994).

Las células de Leydig son las responsables de la producción de testosterona en los testículos de mamíferos. Ésta producción de testosterona depende de la estimulación de estas células por la LH que es secretada en forma de pulsos a la circulación periférica por la glándula pituitaria en respuesta a la GnRH procedente del hipotálamo. La testosterona y su producto aromatizado, estradiol, vuelven al hipotálamo y la pituitaria suprime transitoriamente la LH y por tanto la producción de testosterona. En respuesta a la disminución de testosterona, se produce de nuevo GnRH y LH. Este ciclo de feedback negativo da lugar a una secreción pulsátil de LH seguido de una producción pulsátil de testosterona (Zirkin y Chen., 2000). Como es sabido la testosterona es sintetizada a partir del colesterol contenido en dos orgánulos celulares la mitocondria y el retículo endoplásmico liso (**Esquema 4**).



Esquema 4. Formación de testosterona en la célula de Leydig.

La LH se une a sus receptores específicos en la superficie de las células de Leydig y estimula la producción de AMPc, el segundo mensajero intracelular para LH. AMPc tiene dos actividades principales en el control de la esteroidogénesis de la célula de Leydig: la primera acción del AMPc es la estimulación rápida de la biosíntesis de testosterona vía movilización y transporte de colesterol en la ruta esteroidogénica, una acción que tiene lugar en unos pocos minutos. La proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) activa la movilización de colesterol que procede del interior de la célula, de la superficie lipoproteica celular, o de la síntesis de nuevo colesterol formado a partir del acetato. A pesar de su origen, el colesterol transferido a la membrana mitocondrial interna es un proceso dependiente de AMPc que requiere la acción de la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR). La segunda acción de AMPc en las células de Leydig es una estimulación prolongada de la expresión de los genes de las enzimas esteroidogénicas y una sobrerregulación de su actividad. Una vez que el colesterol es transferido a la mitocondria, se convierte en pregnenolona mediante la división de la cadena lateral del colesterol por P450 que reside en la cara interna de la matriz mitocondrial. La pregnenolona difunde al retículo endoplásmico liso donde es convertida en progesterona vía la acción de 3β-hidroxiesteroide

deshidrogenasa- Δ^4 - Δ^5 isomerasa (3β -HSD). La progesterona a su vez es convertida a 17α -hidroxiprogesterona y en androstenediona por la acción de 17α -hidroxilasa/ C_{17-20} liasa (P450c17). La androstenediona es convertida a testosterona a través de la acción de 17β -HSD. Bajo condiciones fisiológicas, la transferencia de colesterol a P-450_{scc} es generalmente el paso limitante en la síntesis esteroidea, este paso más que el nivel de estas enzimas es la etapa limitante (Saez., 1994). Además la secreción testicular de andrógenos depende del número de células de Leydig y también de la actividad de las mismas (Sriraman y cols., 2003; Wang y Stocco., 2005). Siendo la enzima 3β -HSD un marcador aceptado universalmente para todas las células secretoras de esteroides (Ortega y cols., 2004).

En cuanto a la función de la célula de Leydig, históricamente la primera evidencia de la comunicación entre los túbulos seminíferos y las células de Leydig fue descrita por Johnson y Ewing (1971), quienes investigaron que la FSH aumentaba la producción de testosterona significativamente en testículos de conejo perfundidos expuestos a concentraciones máximas de LH. Apoyando la acción de la FSH, en el desarrollo de la célula de Leydig existe también una cerrada asociación entre los niveles de FSH en suero y la respuesta esteroideogénica de LH/hCG durante la maduración sexual en humano y rata. Algunos resultados experimentales han indicado que los productos secretados por el túbulo seminífero modulan también la función de la célula de Leydig (Saez., 1994). De hecho, la parada experimental de la espermatogénesis, inducida por irradiación-x, criptorquidia provocada, deficiencia de vitamina A y ligación del conducto deferente, da lugar a cambios morfológicos y funcionales de las células de Leydig. En muchas de estas condiciones experimentales, hay un incremento de los niveles plasmáticos de FSH y LH, pero los cambios en la célula de Leydig no se deben a estos incrementos, ya que la implantación local de antiandrógenos en el testículo produce daños de áreas locales del epitelio seminífero adyacente pero existen áreas no afectadas en el mismo testículo. Estos resultados indican también la existencia de mecanismos locales que controlan la función de la célula de Leydig (Saez., 1994)

La LH es necesaria para la diferenciación funcional de las células de Leydig, aunque la repoblación de precursores de células de Leydig es independiente de LH y en cambio es importante el papel de la FSH en la regulación de la función de la célula de Leydig (Sriraman y cols., 2003).

Ni la hCG secretada por la placenta ni la LH están envueltas en la regulación de la fase inicial de la diferenciación de la célula de Leydig humana. Sin embargo, la LH estimula la producción de testosterona después de 7 semanas de gestación, indicando que hCG/LH son requeridas para el mantenimiento de esta producción en estados posteriores. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que los fetos humanos anencefálicos tienen un reducido número de células de Leydig y carecen de esteroidogénesis testicular sugiriendo el control endógeno de gonadotropinas en la esteroidogénesis fetal (Svechnikov y cols., 2010).

La constante presencia de receptores de andrógenos en células de Leydig está en concordancia con la hipótesis de que los andrógenos influyen en la función y diferenciación de la célula de Leydig de una manera paracrina y autocrina (Weber y cols., 2002).

La célula de Leydig es particularmente sensible a la disminución de las hormonas pituitarias. Es conocido que cantidades bajas de hormonas pituitarias afectan a la estructura de la célula de Leydig. Esto puede ocurrir por una disminución de hormonas pituitarias, por administración de hormonas, neutralización de hormonas pituitarias por anticuerpos específicos, o destrucción de células de Leydig por químicos y/o fotoperiodo corto. En todos los casos los mecanismos son similares y las situaciones pueden compararse entre sí (Russell y cols., 2006)

La función de la célula de Leydig puede ser regulada así mismo también por la célula de Sertoli y por otras células presentes en el compartimento intersticial, como son las células mioideas o peritubulares y los macrófagos. Se sabe que hay una activa cooperación entre células de Sertoli y las células peritubulares o mioideas. Sin embargo, no hay evidencias de que exista un efecto directo de las células peritubulares o de sus proteínas secretadas en la

función de la célula de Leydig. Sin embargo, las proteínas secretadas por las células peritubulares, en particular P-Mod-S, regulan la función de la célula de Sertoli. De esta forma las células peritubulares regularían indirectamente la función de la célula de Leydig a través de células de Sertoli (Lejeune y cols., 1998).

El co-cultivo de células de Leydig con células de Sertoli altera la morfología de la célula de Leydig. Así se produce un cambio en su forma pasando de una delgada célula mesenquimal ramificada a una célula poliédrica epiteloide con abundante citoplasma aunque no aparecen procesos de diferenciación celular. Las células de Sertoli in vitro secretan un factor mitogénico que estimula el crecimiento de células de Leydig inmaduras. La célula de Sertoli causa una actividad mitogénica en la célula de Leydig lo que supone la disminución de la biosíntesis de testosterona en estas células. La capacidad de respuesta de la célula de Leydig al factor mitogénico disminuye con la edad, mientras que la secreción de esta proteína mitogénica por células de Sertoli no es afectada por la misma. La disminución en la respuesta de la célula de Leydig con la edad debe estar relacionada con su estado de diferenciación en los diferentes estadios de maduración (Wu y Muroso 1994).

2.3.1.-Síntesis de testosterona y cambios de la célula de Leydig con la edad y la exposición a fotoperiodo corto.

Como comentamos el envejecimiento se puede definir como un proceso multifactorial que es natural y propio de la biología del organismo, que incluye eventos como acortamiento de telómeros, daños en el ADN, stress oxidativo, mutaciones que dan lugar a la inestabilidad del genoma, alteraciones en lípidos y metabolismo de carbohidratos (Malisan y Testi., 2002), pudiendo ir acompañado de enfermedades y cambios patológicos pero que no es una consecuencia de los mismos. La teoría de radicales libres sobre el envejecimiento propone que el desequilibrio entre pro-oxidantes y el sistema de defensa antioxidante da lugar a un daño oxidativo en los procesos celulares (Luo y cols., 2006).

La manifestación del envejecimiento en los diferentes sistemas del organismo puede ser diferente. En el aparato reproductor de la mayoría de especies de mamíferos el envejecimiento va asociado a una disminución en los niveles de testosterona. En el hombre además una disminución en la potencia sexual ha sido relacionada con un aumento de la edad. Ésta disminución de los niveles de testosterona con el envejecimiento está relacionada con un aumento de los niveles de gonadotropina en suero (Paniagua y cols., 1991). Algunos autores (Rubens y cols., 1974) sugieren que la involución testicular que tiene lugar con el envejecimiento es un fallo testicular primario y no secundario por un fallo de la hipófisis o del hipotálamo. Por el contrario, otros investigadores (Harman y Tsitouras, 1980) que han estudiado la función endocrina en hombres jóvenes y envejecidos han encontrado resultados similares en ambos en cuanto a los niveles de testosterona basal y de estradiol. Ésta divergencia de opiniones debe ser consecuencia de los sujetos sometidos a estudio y de los múltiples factores que pueden influir en la variación de los resultados como: stress, dieta, estilo de vida, actividad física etc, (Paniagua y cols., 1991). Estudios más recientes también ponen de manifiesto la disminución de los niveles de testosterona en el hombre con la edad. Esta disminución de testosterona está asociada con alteraciones como disminución de la longitud del músculo, función física, reducción en la función sexual y disminución cognitiva. Esta disminución de testosterona es compleja y envuelve factores intrínsecos y extrínsecos de la célula de Leydig. Éstas células de Leydig envejecidas mantienen su capacidad para ser estimuladas por LH, pero la eficacia de esta estimulación disminuye (Midzak y cols., 2009).

Desde el punto de vista hormonal la LH y la FSH pueden estar más elevada en hombres viejos y ambas se correlacionan positivamente con la edad en todos los hombres. La producción de esperma disminuye en un 50% en hombres viejos y se correlaciona negativamente con la edad. (Neaves y cols., 1984).

En la rata Norway el envejecimiento está asociado con la disminución del colesterol disponible para la esteroidogénesis y la expresión de receptor periférico de la benzodiacepina, sugiriendo que estos dos eventos contribuyen

a la disminución observada de la testosterona con la edad. La corrección de cualquiera de estos factores terapéuticamente puede llevar a una mejora en la producción de testosterona pero no es una recuperación total de los niveles de testosterona presentes en individuos jóvenes (Culty y cols., 2002).

El envejecimiento masculino en la rata Norway aparentemente es caracterizado tanto por fallo testicular como por deficiencia hipotalámica-pituitaria (Grzywacz y cols., 1998). Ahora bien los niveles de testosterona tanto en suero como intratesticularmente están disminuidos, existiendo una reducida capacidad del testículo para producir testosterona en esta especie. La disminución en la producción de testosterona asociada con la edad en esta rata no se puede explicar por cambios en el número de células de Leydig, niveles de LH en suero o contenido de células germinales del testículo. Ésto sugiere que la disminución en la producción de testosterona en estas ratas envejecidas puede resultar de defectos específicos en la célula de Leydig, causados como consecuencia de factores que son extrínsecos o intrínsecos a las células de Leydig (Chen y cols., 1996). Las razones que causan la hipofuncionalidad de las células de Leydig no están claras. Sin embargo estos estudios dan lugar a resultados distintos a los de los hombres, ya que en la rata Norway los niveles de LH disminuyen y en hombres se incrementan con la edad (Ruffoli y cols., 2001).

Luo y cols., (2006) estudiaron tres componentes críticos de la ruta esteroidogénica AMP_c, StAR y P450_{scc} en relación a la disminución de la producción de testosterona relacionada con la edad. La reducción en testosterona se correlacionó con reducciones en StAR, P450_{scc} mRNA y PBR. Se produce una disminución significativa en la LH estimulada por los niveles de AMP_c intracelular vistos a los 9 meses antes de que se produzcan reducciones significativas en testosterona, StAR y P450_{scc}. Los niveles de AMP_c disminuyen entre los 15-20 meses. Algunos estudios de células de Leydig de rata Norway han demostrado que el envejecimiento está acompañado por un déficit funcional de las células de Leydig individuales (Luo y cols., 2006). La supresión experimental de los niveles de LH en esta especie da lugar a una disminución en el volumen de la célula de Leydig y de la producción de testosterona,

características que también muestran las células de Leydig envejecidas (Chen y cols., 2009).

Por otro lado, estudios realizados en la rata Sprague-Dawley se observa que en los ejemplares envejecidos disminuye la secreción de LH y testosterona. Esta disminución se relacionaría con modificaciones en el número de receptores para LH (Limonta y cols., 1987).

En el hámster dorado envejecido, a diferencia de otras especies no se producen cambios significativos en los niveles de testosterona, LH y FSH con la edad. Como se demuestra en el estudio realizado por Swanson y cols., (1982) donde no hay una disminución seria en la función reproductora, ni tampoco en el comportamiento. Estos datos han sido confirmados en relación a la testosterona en estudios posteriores de nuestro laboratorio (Horn y cols., 1996; Calvo y cols., 1992)

En animales con reproducción estacional durante la regresión testicular debida a fotoperiodos cortos, la disminución de LH, FSH y PRL liberadas da lugar a una disminución en la producción de testosterona por las células de Leydig. El hámster dorado es un roedor estacional típico de fotoperiodo largo. La exposición a fotoperiodo corto después de un fotoperiodo largo da lugar a una disminución de las concentraciones en plasma de gonadotropinas y testosterona y la espermatogénesis es también interrumpida con una regresión testicular (Kawazu y cols., 2003). Las células de Leydig de testículos involucionados de hámsters muestran una baja producción de testosterona y una respuesta reducida a la estimulación de hCG. Sin embargo, si el hámster es tratado con LH o LH/FSH, la producción basal de testosterona se eleva (Niklowitz y cols., 1989). Las células de Leydig disminuyen en volumen pero no en número (Sinha Hikim y cols., 1988). Aunque por el contrario otros autores como Hardy y cols., (1987) indican que el número de células de Leydig se reduce significativamente en testículos regresados, alrededor de un 50%.

Otro hámster estudiado con reproducción estacional es *Phodopus sungorus*. La influencia de fotoperiodos cortos exhibe cambios fisiológicos que incluyen

sus funciones reproductivas. Los testículos involucionan en tamaño y el epitelio seminífero está formado solamente por espermatogonias con unos pocos espermatoцитos y células de Sertoli. Las células de Sertoli y las células de Leydig cambian su morfología, reflejando inactividad funcional. Los niveles de FSH y LH descienden durante estos fotoperíodos cortos (Kliesch y cols., 1991).

En otras especies sometidas a un periodo de hibernación como el murciélago, la actividad tanto de los túbulos seminíferos como del intersticio testicular durante el ciclo anual se modifica. Durante el periodo de hibernación (Octubre-Abril) las células de Leydig involucionan y están quiescentes. Además, en esta fase y especialmente durante el periodo periarousal, se identifican células fuertemente sudanofílicas como macrófagos en el intersticio testicular (Gustafson., 1987)

2.3.2.-Influencia de la matriz extracelular en la funcionalidad de la célula de Leydig.

La matriz extracelular (ECM) juega un papel crucial en la formación de los tejidos durante la organogénesis. Las proteínas de la matriz extracelular forman una mezcla compleja tanto desde el punto de vista funcional como estructural de macromoléculas que juegan un importante papel en los procesos de remodelación del tejido: morfogénesis, angiogénesis, reparación y tumorigénesis (Vernon y cols., 1991; Lee y cols., 2006). En el testículo actúa como barrera entre las células de Leydig intersticiales productoras de andrógenos y las células de Sertoli intratubulares y las células germinales. Además la lámina propia de los túbulos seminíferos posee ECM que es producida conjuntamente por las células de Sertoli y las células peritubulares (Weber y cols., 2002).

Las células de Leydig en cultivo son capaces de sintetizar proteínas de matriz extracelular y expresan receptores de estas proteínas (integrinas) y moléculas de adhesión como N-CAM y N-caderina (Denduchis y cols., 1996). Las células de Leydig in vitro se adhieren firmemente a la laminina, fibronectina y colágeno

IV y las alteraciones de estas proteínas causan alteraciones funcionales en las células de Leydig (Weber y cols., 2002)

La forma, asociación, proliferación y expresión de productos de genes por células de Leydig puede estar significativamente afectada in vitro por la alteración de la composición del sustrato extracelular. La alteración de la composición bioquímica o propiedades mecánicas de la superficie de cultivo causa una modulación significativa de la forma de la célula de Leydig, de la asociación intercelular, proliferación y expresión de productos de genes específicos de las mismas (Vernon y cols., 1991). Díaz y cols., (2002) tras cultivar células de Leydig aisladas de ratas adultas en placas con recubrimiento y sin recubrimiento con diferentes concentraciones de laminina-1, fibronectina o colágeno tipo IV en presencia o ausencia de hCG de 3 a 24 horas, encontraron que la célula de Leydig se une firmemente al colágeno tipo IV, fibronectina o laminina. En sus condiciones experimentales, la laminina-1, fibronectina o colágeno tipo IV promueven cambios en la forma de la célula que son coherentes con el incremento en la adherencia y crecimiento celular, comparada con las células cultivadas en placas sin recubrimiento. Estos resultados se suman a los obtenidos anteriormente por Vernon y cols., (1991) que observaron una difusión más lenta en células cultivadas en placas de plástico con películas delgadas de colágeno tipo IV. Los finos mecanismos por los que las proteínas de la matriz extracelular modulan la forma de la célula son todavía materia de estudio, pero sin duda suponen la reorganización del citoesqueleto celular en unión con receptores específicos.

El colágeno IV inhibe la producción de testosterona en células de Leydig por unión a las integrinas, activación de quinasa regulada por señales extracelulares (ERK $\frac{1}{2}$), disminución en la producción de AMP_c y expresión de StAR. Además cuando se cultivan células de Leydig con colágeno tipo IV aumenta su adhesión celular y su expresión de integrina y dichos cambios están acompañados por una reducción en la producción de testosterona (Díaz y cols., 2005). Así producen menos testosterona bajo la estimulación de LH cuando las cultivamos en placas con componentes de la matriz extracelular (Guittot y cols., 2008).

Las células de Leydig tienen contactos con varios componentes de la matriz extracelular, aunque no sintetizan una lámina basal continua (Guittot y cols., 2008). La lámina basal participa en múltiples funciones, incluyendo proliferación, migración, supervivencia y diferenciación. En las células de Leydig dicha membrana no las rodea de forma continua en el testículo adulto, pero presentan fragmentos de laminina y colágeno IV en la superficie de la célula (Kuopio y cols., 1989). Estas proteínas se encuentran en la superficie de células de Leydig o entre células de Leydig adyacentes (Vernon y cols., 1991).

Kuopio T. y cols., (1989) observaron la inmunolocalización mediante microscópica electrónica de colágeno tipo IV y laminina en la superficie de células de Leydig en el testículo fetal. Las células fetales maduras de Leydig presentaron pequeños parches positivos en su superficie. Después del nacimiento éstos se encontraron primero por fuera de las superficies de los grupos de células de Leydig y después entre las células adyacentes dentro de los grupos.

Como ya sabemos el colágeno tipo IV es el componente mayoritario estructural de todas las láminas basales, está compuesto de tres cadenas α ensambladas en una triple hélice. Hay 6 cadenas α genéticamente distintas. Los genes que codifican las cadenas α_1 y α_2 están localizados en el cromosoma 13 humano, α_3 y α_4 ordenados en el cromosoma 2, α_5 y α_6 están codificados por genes en el cromosoma X (Hudson y cols., 1993). Solamente hay 3 promotores específicos α_1 α_1 α_2 , α_3 α_4 α_5 y α_5 α_5 α_6 . En ratón los cordones seminíferos llegan a separarse del mesénquima sólo por una lámina basal depositada en la base del epitelio seminífero que comienza alrededor del día embrionario 12,5. Se ha demostrado que la primera lámina basal contiene laminina, colágeno tipo III, colágeno tipo IV (preferentemente cadenas (α_1/α_2) fibronectina y proteoglicano heparan sulfato (Enders y cols., 1995). En rata la formación inicial del testículo y del ovario incluye la aparición de las cadenas α_1/α_2 (IV) en el blastema gonadal. Además de la diferenciación del epitelio de las gónadas, las cadenas α_1/α_2 (IV) llegan a estar localizadas en todas las membranas basales. Las cadenas de colágeno tipo IV α_3 , α_4 y α_5 no se

detectan ni en el testículo ni en el ovario de rata prenatal. Con la diferenciación postnatal del testículo de rata las cadenas $\alpha 3$ - $\alpha 5$ aparecen gradualmente y se localizan en la membrana basal de los cordones testiculares y túbulos seminíferos, células mioideas, superficie epitelial, células de Leydig y algunos vasos sanguíneos. Las cadenas $\alpha 3$ - $\alpha 5$ de colágeno IV están menos distribuidas que $\alpha 1/\alpha 2$ y son sintetizados mucho más tarde en el desarrollo (Fröjdman y cols., 1998).

Las células productoras de colágeno expresan una proteína inducible por el calor que es la HSP-47. Esta proteína es importante en la síntesis, procesamiento y secreción de colágeno en varios tipos de células (Sato y cols., 1996). HSP-47 es una glicoproteína de unión al colágeno, la síntesis de esta proteína disminuye después de la transformación celular y se localiza en el retículo endoplasmático liso (Nakai y cols., 1989). Como hemos dicho la HSP-47 es indispensable en la biosíntesis de colágeno, como lo muestra el análisis del ratón HSP47^{-/-}. Esta mutación es letal durante el desarrollo embrionario y los embriones carecen de fibrillas de colágeno y de membrana basal en sus tejidos (Sato y cols., 2002).

En testículo de ratón durante los primeros días tras el incremento de la expresión de mRNA del colágeno tipo XXVI se observa expresión genética de HSP-47 (Sato y cols., 2002).

Anteriormente Syntin y cols., (2001) habían demostrado que HSP-47 se expresa genéticamente en células de Leydig en rata Norway y que es una proteína inducible por el stress, aumentando su expresión genética en células de Leydig de testículo envejecido regresado con atrofia testicular, respecto a las células de Leydig de testículo envejecido sin atrofia testicular. Durante el envejecimiento la matriz extracelular se acumula en el intersticio y en las proximidades de la célula de Leydig (Mendis-Handagama y Gelber., 1995). Así Ichiara y cols., (1993) ya observaron que en la rata Wistar envejecida hay aumento en el volumen intersticial que va acompañado de un aumento del volumen de los vasos linfáticos y sanguíneos y de las fibras de colágeno intersticiales con una disminución del volumen ocupado por las células de

Leydig y las células peritubulares. A través de un estudio genético con microarrays en la rata Norway envejecida, las células de Leydig incrementan la expresión de inhibidores de las proteasas (metaloproteasa 3 e inhibidor del factor del plaminógeno) de tal forma que la destrucción proteolítica se ve interferida por lo que la matriz es probable que se altere siendo esta la causa del incremento o acumulación de la misma que afectaría negativamente la función de la célula de Leydig, por ejemplo por acumulación de colágeno IV (Chen y cols., 2007).

Con respecto a cambios del intersticio testicular durante la regresión debida a fotoperiodo corto existe poca información y se relaciona más con los cambios que suceden en la vascularización del intersticio. Durante la recrudescencia después de la regresión existe una angiogénesis de nuevos vasos y prolongación de los anteriores que habían sufrido regresión. De hecho en la matriz extracelular del intersticio de testículos regresados de hámster tras el fotoperiodo corto es fácil encontrar la presencia de restos de membrana basal que sobrevive a la muerte de las células endoteliales. En la regresión el volumen de los vasos disminuye en un 85% con respecto al valor de los animales activos (Mayerhofer y cols., 1989). Así mismo en la regresión ya establecida tanto el volumen del intersticio testicular como la cantidad de tejido conectivo disminuye de una forma drástica (Shina Hikim y cols., 1988a). Por último, indicar que con el comienzo de la recrudescencia empieza a aumentar el volumen intersticial (Shina Hikim y cols., 1993).

2.4.-ULTRAESTRUCTURA DE LA CÉLULA DE LEYDIG, MACRÓFAGO Y CÉLULA MIOIDE

2.4.1.- Célula de Leydig

Las células de Leydig tienen el núcleo de forma redondeada u oval con numerosas indentaciones y suele ser excéntrico (Lejeune y cols., 1998). El citoplasma contiene los orgánulos característicos de las células secretoras de esteroides como son gran cantidad de retículo endoplasmático liso, mitocondrias con crestas tubulares o túbulo-vesiculares y numerosas vacuolas (gotas) lipídicas. El retículo endoplasmático liso se dispone por todo el citoplasma o bien sus túbulos y cisternas interconectadas se localizan en la periferia celular o rodeando a las mitocondrias y a las gotas lipídicas (Kretser y Kerr, 1988). Estas características ultraestructurales diferencian a las células de Leydig fetales de los fibroblastos mesenquimales del intersticio testicular.

En las ratas, las células de Leydig fetales son grandes, redondeadas con un núcleo esférico y en el citoplasma tienen un aparato de Golgi poco desarrollado, abundante retículo endoplasmático liso, mitocondrias y algunas gotas lipídicas. La membrana plasmática tiene protusiones que contienen filamentos del citoesqueleto y muestran un espesor constante de 50-60nm con un espacio de 25nm entre membranas de dos protusiones adyacentes. Las células de Leydig fetales se unen entre sí y a las células endoteliales vasculares por uniones comunicantes (GAP) y desmosomas. Rodeando a los grupos de células de Leydig fetales inmaduras hay una membrana basal continua formada por colágeno de tipo IV y laminina (Haider y cols., 2007). Postnatalmente, sin embargo la membrana basal llega a ser discontinua y parcheada. En el hombre, ultraestructuralmente las células de Leydig fetales tienen el núcleo redondo u oval y heterocromático y un nucléolo que se localiza centralmente. En el citoplasma hay abundante retículo endoplasmático liso, numerosas mitocondrias polimórficas con crestas tubulares, gránulos electrodensos (probablemente lisosomas) y algunas gotas lipídicas. No se observan cristales de Reinke (Codesal y cols., 1990).

Las células de Leydig inmaduras adultas de rata son ovales más o menos redondeadas y con citoplasma acidófilo. El núcleo es heterocromático, grande y redondo con uno o dos nucléolos. El citoplasma contiene grandes cantidades de retículo endoplasmático liso, un alto número de mitocondrias con crestas túbulo-vesiculares, un aparato de Golgi bien desarrollado, pocas gotas lipídicas y numerosas vesículas de pinocitosis. En la membrana plasmática se observan evaginaciones e invaginaciones (Haider y cols., 2007) y áreas especializadas con numerosas microvellosidades que se extienden dentro de invaginaciones de la membrana plasmática de los macrófagos testiculares que han sido denominadas en la literatura como “coated pits” o digitaciones (Hutson, 1992; Buchanan, 2002; Tran y cols., 2006).

Las células de Leydig adultas tienen en el citoplasma numerosas mitocondrias, cuyo tamaño y número varía según la especie. En el hombre son pequeñas, numerosas y con crestas vesículo-tubulares. En ratón, las crestas tubulares son de tamaño uniforme (Mori y cols., 1982).

El aparato de Golgi se localiza en ratón y gato en la región yuxtannuclear, mientras que en el hombre sus componentes son numerosos y están dispersos por todo el citoplasma. Se sabe que el aparato de Golgi está encargado de la concentración de gránulos secretores en las células productoras de proteínas, síntesis de polisacáridos en las células que elaboran carbohidratos y acumulación de lípidos absorbidos en las células de la mucosa intestinal. Sin embargo no está claro el papel que juega en la producción y secreción de esteroides (Mori y cols., 1982).

Las gotas lipídicas varían mucho en número y tamaño según la especie. En ratón son numerosas y de tamaño uniforme, en cobaya son grandes en tamaño pero escasas y en rata las células de Leydig tienen pocas gotas lipídicas. En el hombre son relativamente escasas. Probablemente su relación con el retículo endoplásmico liso debe facilitar la transferencia de materiales entre estas dos organelas. Además, hay un número considerable de lisosomas en las células de Leydig. En algunas especies como en el hombre, estos se sitúan cerca del área de Golgi (Mori, 1984).

Las inclusiones cristalinas descritas por Reinke en 1896 aparecen solamente en células de Leydig humanas, estos cristales se aprecian cuando las células de Leydig cesan en la producción de esteroides. También se han encontrado inclusiones paracristalinas de diversas formas en otros mamíferos como el hámster Chino (Payer y Parkening, 1983), sin embargo estas inclusiones aparecen solamente cuando los animales alcanzan la madurez sexual y se establece la producción de esteroides (Werner y Moutairou, 1998).

Para Nistal y cols., (1986) las células de Leydig adultas maduras humanas son similares a las células de Leydig fetales, pero con un complejo de Golgi más desarrollado, con gránulos de lipofucsina y menor cantidad de retículo endoplasmático rugoso. Estos mismos autores describen un tipo de célula de Leydig infantil, que presenta un núcleo irregular multilobulado con cantidades más pequeñas de heterocromatina que los fibroblastos intersticiales y peritubulares y los miofibroblastos. El citoplasma contiene abundante retículo endoplasmático liso pero menos desarrollado que en las células de Leydig fetales, algunas gotas lipídicas, mitocondrias y algunas cisternas de retículo endoplasmático rugoso. En el intersticio testicular del hombre Codesal y cols., (1990) han descrito ultraestructuralmente células de Leydig multivacuoladas que parecen células degeneradas. Muestran un núcleo oscuro y un citoplasma electrodenso que contiene poco retículo endoplasmático liso, cuerpos residuales y grandes gotas lipídicas.

En otra especie de mamífero no roedor como es el caso del cerdo, las observaciones microscópicas muestran una forma irregular u oval de las células de Leydig que normalmente están asociadas con pequeños vasos sanguíneos. Presentan un núcleo grande y ligeramente alargado así como un complejo de Golgi pequeño, unas pocas mitocondrias con crestas tubulares y laminares y un denso retículo endoplasmático liso de túbulos interconectados (Triperi y cols., 2000).

Las células de Leydig del hámster han sido descritas ultraestructuralmente tanto en condiciones normales de fotoperiodo o durante el fotoperiodo corto. En

los animales activos las células tienen abundante citoplasma, un núcleo irregular y presentan un prominente nucléolo. El retículo endoplasmático es la organela más abundante, presentándose en forma de cisternas aplanadas más que de forma reticular. Estas cisternas pueden ser parcialmente de retículo endoplasmático liso o rugoso, cerca de las mitocondrias suelen carecer de ribosomas. En ocasiones el retículo endoplasmático forma estructuras concéntricas y raramente se encuentran áreas del citoplasma compuestas por túbulos interconectados de retículo endoplásmico liso. Esta disposición es característica en las células de Leydig de hámsters neonatales o juveniles y de células de Leydig maduras de otras especies (Wing y cols., 1977). Las células de Leydig tienen abundantes mitocondrias, escasa gotas lipídicas, aparatos de Golgi, glucógeno, lisosomas, peroxisomas y áreas amorfas con alto contenido de filamentos (Shina Hikim y cols., 1988). Las mitocondrias son redondeadas o elongadas con crestas tubulares, el aparato de Golgi está formado por varios dictiosomas alrededor del núcleo y se pueden observar algunos centriolos. La membrana plasmática de la célula presenta pliegues. Las células de Leydig suelen estar separadas por un espacio de variable anchura, aunque hay prolongaciones de algunas células que se invaginan en el citoplasma de otras. Entre las membranas adyacentes de las células pueden observarse uniones GAP (Wing y cols., 1977).

Mori y cols., (1982), realizaron un análisis morfométrico de las células de Leydig, poniendo de manifiesto diferencias entre especies sobre la cantidad de retículo endoplásmico liso. Hay especies con abundante retículo endoplásmico liso como por ejemplo cobaya y zarigüeña mientras que otras presentan un menor desarrollo de este orgánulo como es el caso del hámster. Otras especies presentan abundancia intermedia de retículo endoplásmico liso como son la rata y el hombre. Éste autor demostró que la cantidad de retículo endoplásmico liso es proporcional a los niveles de secreción de testosterona por gramo de célula de Leydig. En ratón, el retículo endoplasmático liso es la organela más desarrollada en las células de Leydig y su membrana tiene un área de 2.428 cm^2 por cm^3 de tejido testicular que es 8,5 veces superior a la superficie de área de membrana plasmática y constituye el 56,9% de las membranas totales en células de Leydig. La mitocondria ocupa el 10,1% del

volumen de célula de Leydig o 11,4% del volumen citoplasmático. Las células de Leydig tienen numerosas gotas lipídicas con una media de 147 por célula y ocupan el 5,1% del volumen celular (Mori y cols., 1982).

Mendis-Handagama y cols. (1988) también pusieron de manifiesto la relación entre la secreción de testosterona, volumen de organelas y superficie en la célula de Leydig de hámster, rata y cobaya. La secreción de testosterona por gramo de testículo y por célula de Leydig fue significativamente diferente en las tres especies: más alta en cobaya, intermedia en rata y más baja en hámster. Así, el porcentaje en volumen de mitocondrias en hámster (16,84%) es superior al de las otras dos especies estudiadas, rata (12,93%) y cobaya (13,95%) así como el porcentaje de retículo endoplásmico rugoso en hámster (34,66%), rata (1,01%) y cobaya (1,25), ribosomas en hámster (2,81%), rata (0,54%) y cobaya (0,88%) y aparato de Golgi.

2.4.1.1.- Ultraestructura de la célula de Leydig durante el envejecimiento

En el hombre, la atrofia testicular con el envejecimiento lleva consigo alteraciones ultraestructurales de las células germinales que progresivamente llevan a su desaparición (Horn y cols., 1996). Además, las células de Sertoli acumulan lípidos y glucógeno en el citoplasma y en el citoplasma de las células de Leydig disminuye la cantidad de retículo endoplasmático liso y el número y tamaño de mitocondrias a la vez que se acumulan pigmentos, lípidos y cristales de Reinke (Paniagua y cols., 1991). La función de estos cristales en las células de Leydig no es conocida en el hombre pero aumentan durante el envejecimiento (Kerr, 1991).

Paniagua y cols., (1986) describieron 5 tipos de células de Leydig en función de su patrón ultraestructural en el testículo de hombres envejecidos:

- 1) Células de Leydig con una ultraestructura madura aparentemente normal como aquella que se observa en testículo joven adulto.

2) Células de Leydig con anomalías en el número o localización de inclusiones cristalinas. Estas células presentan un citoplasma no alterado y se diferencian de las células de Leydig normales sólo por la presencia de varios cristales citoplasmáticos de Reinke, cristales de Reinke intranucleares o numerosas inclusiones citoplasmáticas o intranucleares paracristalinas.

3) Células de Leydig multivacuoladas con el citoplasma lleno de vacuolas lipídicas. Tienen escasas organelas citoplasmáticas, incluyendo retículo endoplásmico liso. Las mitocondrias son pequeñas y escasas. El núcleo es más irregular y denso que los de células de Leydig normales. Algunas células de Leydig multivacuoladas presentan numerosos cristales de Reinke o inclusiones paracristalinas.

4) Células de Leydig que presentan un pobre desarrollo del retículo endoplásmico liso y de las mitocondrias. Estas células normalmente presentan numerosos gránulos de lipofucsina. En estados más avanzados de dediferenciación, los nucleolos son más pequeños o están ausentes. Algunas células muestran numerosas inclusiones paracristalinas o cristales de Reinke.

5) Células de Leydig bi- o trinucleadas. Algunas de estas células muestran una apariencia ultraestructural normal, muchas de ellas presentan un pobre desarrollo del retículo endoplásmico liso y pequeñas mitocondrias y son similares a las células de Leydig dediferenciadas. Se observa con frecuencia cristales de Reinke o inclusiones paracristalinas. Estas células multinucleadas se estudiaron con más detalle en testículo normal humano, utilizando testículos de 65 hombres adultos con edades comprendidas entre 21 y 89 años. El examen ultraestructural mostró células de Leydig con 2 o más núcleos, su número se incrementaba con la edad (Nistal y cols., 1986).

Hace años en humanos se observó la presencia de células de Leydig en proceso de degeneración en un estudio sobre el envejecimiento de esta célula, proponiéndose que esto podría ser la causa de la disminución del número de estas células con la edad. Las observaciones con microscopía de luz durante la cuantificación de las poblaciones celulares pusó de manifiesto la posible

degeneración y disolución de células de Leydig. Las observaciones con microscopía electrónica de estas células mostraron un citoplasma característico. Habían residuos tubulares en áreas de disolución citoplasmática, así como largas vacuolas en otros lugares de la célula, que sugerían un citoplasma que previamente había sido rico en retículo endoplasmático liso (Neaves y cols., 1985)

En otros mamíferos también se ha estudiado el efecto del envejecimiento en la ultraestructura de la célula de Leydig. Así, en ratones envejecidos un aumento de los gránulos de lipofuscina probablemente sea consecuencia de cambios metabólicos que tienen lugar con la edad. La acumulación de los mismos se asocia con una reducción de otras organelas, sugiriéndose que estos gránulos influyen negativamente en la función celular (Giannessi y cols., 2005). En el cerdo con el envejecimiento, las células de Leydig se caracterizan por tener un número bajo de mitocondrias y se observan numerosos gránulos con una organización de tipo paracristalino, que es típica de cristales de Reinke (Triperi y cols., 2000). Por último en el caballo, los estudios realizados con ejemplares cuya edad oscilaba entre 2-20 años, muestran que en el tejido intersticial aumenta el número de células de Leydig y que en el citoplasma de estas células se acumulan gránulos de lipofuscina aislados o agrupados (Jhonson y Neaves, 1981; Almahbobi y cols., 1988)

Además de estos estudios ultraestructurales, existen estudios morfométricos que demuestran que la disminución del volumen testicular con la edad es debida a una disminución en el volumen ocupado por los túbulos seminíferos más que por cambios en el intersticio. Los túbulos seminíferos aumentan en longitud con la edad, mientras que el diámetro del túbulo disminuye significativamente con la misma en el hámster dorado (Morales y cols., 2004). En esta especie *Mesocricetus auratus* se ha estudiado la variación en el número de células de Leydig con la edad. Entre 6 y 12 meses no se observa disminución del número. Por el contrario a los 18 meses se evidencia una disminución significativa de estas células respecto a los animales de 6 y 12 meses (Horn y cols., 1996).

En otros roedores como la rata Wistar, durante el envejecimiento (aproximadamente a los 2 años), la mayoría de las células de Leydig son más pequeñas en tamaño que las de ratas jóvenes y su forma es más alargada e irregular. El volumen medio de célula de Leydig disminuye de $1364 \mu\text{m}^2$ a $637 \mu\text{m}^2$, pero el número de células de Leydig en ambos testículos se incrementa desde 53×10^6 a 113×10^6 . Las mitocondrias son más numerosas y pequeñas. El volumen absoluto de peroxisomas por célula de Leydig está correlacionado significativamente con la concentración de testosterona que disminuye en sangre y con el volumen de retículo endoplásmico liso por célula de Leydig (Ichihara y cols., 1993).

En el hombre mediante diferentes técnicas morfométricas se ha comprobado que el volumen total de célula de Leydig por individuo disminuye con la edad, y que depende del volumen individual de la célula de Leydig y del número de células de Leydig. Éste último también disminuye significativamente con la edad (Kaler y Neaves, 1978).

Otros autores como Neaves y cols., (1984) realizaron su investigación sobre el número de células de Leydig, producción de esperma diario y niveles de gonadotropina en suero en hombres envejecidos. Tras el análisis ultraestructural determinaron que la media del número total de núcleos de células de Leydig disminuyó en un 44% en las muestras de testículo envejecido. El volumen del núcleo tendió a incrementarse con la edad, pero no fue significativo. El volumen total medio del citoplasma de la célula de Leydig disminuyó en un 39% en hombres envejecidos comparado con los jóvenes. Así mismo el citoplasma de la célula de Leydig por individuo disminuyó significativamente con la edad.

En otras especies como el gallo, el tejido intersticial a las 110 semanas de edad contiene pocas células. El espacio intercelular contiene algunos fragmentos de células y material fibroso disperso, algunas de las células tienen una apariencia como el fibroblasto con un perfil plano y largas proyecciones citoplasmáticas. El citoplasma es electro-denso y las organelas escasas (Rosenstrauch y cols., 1998).

2.4.1.2.- Ultraestructura de la célula de Leydig como consecuencia de la exposición a fotoperiodo corto.

Existen algunas especies de roedores como *Lagostomus maximus maximus* (*viscacha*) donde se ha estudiado los cambios ultraestructurales que afectan a la célula de Leydig durante el fotoperiodo corto. En época reproductiva, las células de Leydig tienen el núcleo central y presenta una forma redondeada o ligeramente oval, con una delgada banda de heterocromatina periférica junto a la membrana interna de la envoltura nuclear. El nucleolo está bien desarrollado. Durante este periodo las células muestran hipertrofia citoplasmática y distribución de orgánulos de forma regional. Las organelas dominantes son el retículo endoplásmico liso y las mitocondrias. El retículo endoplásmico liso aparece como una red de vesículas, cisternas y túbulos interconectados, que están íntimamente relacionados con mitocondrias, inclusiones lipídicas y cuerpos densos. Las mitocondrias varían en tamaño y forma, son ovales, redondas, como una varilla y con abundantes crestas tubulares. El aparato de Golgi está bien desarrollado y formado por sáculos paralelos y pequeñas vesículas. Las inclusiones lipídicas son más abundantes en este periodo, son homogéneas y están distribuidas irregularmente en grupos. Es común observar cuerpos densos como lisosomas en diferentes estadios así como centriolos. Estas células presentan desmosomas focales y uniones GAP con otras células de Leydig vecinas. Las características ultraestructurales de las células de Leydig de *viscacha* varían en la regresión y se observan células en diferentes fases de involución. Las células de Leydig muestran una evidente hipertrofia y un aumento en el número de cuerpos densos durante la regresión gonadal. En estas células el núcleo es redondeado oval o irregular y heterocromático. El retículo endoplásmico liso es escaso y hay pocas mitocondrias. Los espacios intercelulares entre células de Leydig son irregulares y muestran numerosas dilataciones con microvellosidades cortas (Muñoz y cols., 1996).

En el hámster dorado sometido a fotoperiodo corto de 6:18 (6 horas de luz: 18 horas de oscuridad) durante 10 semanas, se ha observado que las células

de Leydig en los hámsters control tienen un tamaño de $1167 \pm 43 \mu\text{m}^3$ con un citoplasma oscuro teñido por azul de toluidina. Su núcleo tiene forma redondeada con un borde de heterocromatina a lo largo del margen interno de la membrana nuclear. En contraste, las células de Leydig en hámsters regresados tienen $573 \pm 120 \mu\text{m}^3$ (50% más pequeñas que los controles) y con un núcleo de forma irregular. El citoplasma teñido por azul de toluidina y la apariencia de heterocromatina en el núcleo es similar para las células de Leydig de ambos grupos. Este autor encontró que no hay evidencia de que a las 10 semanas de fotoperiodo (6:18) este tratamiento cause tal desdiferenciación de las células de Leydig que estas lleguen a ser morfológicamente irreconocibles como tales (Hardy y cols., 1987)

Posteriormente se realizó un estudio que midió el volumen medio de la célula de Leydig en hámster activos gonadalmente. Este fue de $1092 \mu\text{m}^3$ y el volumen del núcleo de $1977 \mu\text{m}^3$, que representan el 18,1% del volumen celular. En testículos regresados, las células de Leydig disminuyen notablemente de tamaño. Los valores medios para núcleo, citoplasma y volumen celular son 49,9%, 25,9% y 30,3% respectivamente de los valores medidos en animales gonadalmente activos. Los cambios en el volumen del núcleo de la célula de Leydig son menores que los cambios que tienen lugar en el volumen citoplasmático durante esta regresión testicular inducida por fotoperiodo corto (Sinha Hikim y cols., 1988a). Además, en los animales regresados las células de Leydig del hámster dorado tienen una reducción de la razón citoplasma/núcleo.

Morfológicamente el núcleo tiene un perfil muy irregular con numerosos pliegues y abundante heterocromatina. Muestran en el citoplasma una disminución en el volumen de retículo endoplasmático liso, complejo de Golgi y peroxisomas y una disminución en el área de superficie de la membrana mitocondrial interna y del retículo endoplasmático rugoso, sugiriendo que los cambios en la célula de Leydig están restringidos a las organelas asociadas con la biosíntesis esteroidea (Sinha Hikim y cols., 1988b).

Respecto a la disminución del número de células de Leydig en el hámster dorado tras fotoperiodo corto existe controversia. Algunos autores indican una disminución del número (Hardy y cols., 1987; Sinha Hikim y cols., 1993) mientras que otros autores piensan que no hay fluctuaciones (Johnson y cols., 1987).

En el estudio realizado por Kliesch y cols., (1991) en el hámster (*Phodopus sungorus*) con involución testicular después de ser hipofisectomizados o sometidos a fotoperiodo corto, se encontró una disminución en el área de la célula de Leydig en un 40% y en el tamaño nuclear de un 20% en comparación con las células de Leydig adultas de testículos de hámster fértiles sometidos a largos fotoperiodos. El examen ultraestructural muestra un núcleo con invaginaciones y forma irregular y un nucleoplasma heterocromático. En el citoplasma el retículo endoplasmático liso es escaso ya que desaparecen las disposiciones concéntricas de cisternas y las formas vesiculo-tubulares están notablemente reducidas. No se encuentran cambios en las mitocondrias, el aparato de Golgi ni en la degeneración de células de Leydig.

En la especie *Clethrionomys glareolus* S. (*topillo rojo*) la eliminación de la luz induce una marcada disminución en el volumen citoplasmático y nuclear y en la cantidad de retículo endoplasmático liso, retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias e inclusiones lipídicas en las células de Leydig. El número de cuerpos de mielina y cuerpos densos es más alto en células de Leydig de animales regresados (Tähkä., 1988).

Por último en la especie *Myotis lucifugus lucifugus* (*murciélago*) la regresión significativa de células de Leydig comienza a ocurrir a finales de Agosto. En Septiembre, las células de Leydig experimentan una profunda disminución de su tamaño y cantidad de citoplasma y su núcleo se encoge y muestra un pleomorfismo considerable (Gustafson., 1987).

2.4.2.- Macrófago y célula mioide: ultraestructura y cambios con el envejecimiento y el fotoperiodo corto

Los macrófagos testiculares de todas las especies de mamíferos estudiados se localizan en el compartimento intersticial en condiciones normales, son menos numerosos que las células de Leydig y su morfología varía desde más o menos redondeada u ovoide en ratas, perros y cobayas a heterogénea en ratón (Hutson, 2006). Con microscopía electrónica muestran un núcleo con numerosas indentaciones y un citoplasma de baja electrodensidad que contiene numerosos lisosomas y cuerpos residuales polimórficos, abundantes mitocondrias y escaso retículo endoplasmático rugoso (Miller y cols., 1992; Wing y cols., 1977).

El rasgo ultraestructural más interesante de los macrófagos testiculares son sus microvellosidades o digitaciones (Hutson., 2006). Las microvellosidades proceden de la superficie de los macrófagos y se extienden en el espacio intersticial y frecuentemente entran en contacto con otros salientes procedentes de las células de Leydig. Además, existen amplias áreas de la superficie de los macrófagos testiculares que están estrechamente unidos con las células de Leydig (Giannessi y cols., 2005), observándose contactos especializados entre células de Leydig y macrófagos, demostrándose que se dan entre sí con un índice de 4:1(Leydig: macrófago) en testículo normal de rata (Kretser y Kerr., 1988). Las asociaciones de membrana especializadas entre macrófagos y células de Leydig han sido denominadas también como digitaciones o “coated pits”. Esta cerrada asociación física sugiere que estas células están funcionalmente relacionadas (Miller y cols.,1992; Buchanan., 2002; Hutson, 2003).

Los macrófagos se han descrito también ultraestructuralmente en el hámster dorado, son menos numerosos que las células de Leydig y poseen un citoplasma con baja electrodensidad que contiene numerosos cuerpos residuales y mitocondrias. El retículo endoplásmico rugoso está poco desarrollado. Los macrófagos están cercanos a las células de Leydig (Wing y

cols., 1977). Durante el periodo de regresión los macrófagos presentan una disminución de su tamaño y de su diferenciación (Wing y cols., 1977).

La información sobre los cambios que sufren los macrófagos testiculares durante el envejecimiento es limitada. Hace unos años Giannesi y cols., (2005) realizaron un estudio sobre la ultraestructura de los macrófagos testiculares en ratón envejecido. Como ya hemos mencionado los macrófagos testiculares mantienen una estrecha relación con las células de Leydig en los ratones jóvenes adultos, que por el contrario no se encuentran o disminuye en los macrófagos y células de Leydig de animales envejecidos. En el citoplasma de los macrófagos se observan además gránulos de lipofuscina similares a los que se encuentran en el citoplasma de las células de Leydig de los ratones envejecidos. Estos gránulos están ausentes en macrófagos testiculares de ratón joven adulto. El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi están poco desarrollados y hay pocas vesículas revestidas así como mitocondrias, que disminuyen en número con la edad aunque no se modifica su ultraestructura. En síntesis en estos macrófagos de ratón la acumulación de gránulos de lipofuscina se asocia con una involución funcional. Este estudio además demuestra la desaparición de digitaciones en los macrófagos de ratones envejecidos, apoyando la idea de que estas estructuras pueden ser la expresión morfológica de interacciones relacionadas con la secreción de testosterona, por parte de las células de Leydig. En conclusión, en el macrófago de ratón durante el envejecimiento la acumulación de gránulos de lipofuscina está asociada con una involución funcional (Giannesi y cols., 2005).

Las células mioides se localizan en la lámina propia de los túbulos seminíferos. En el hombre está formada por una lámina basal y varias capas aparentemente discontinuas de células peritubulares o mioides embebidas en fibras de colágeno. La célula mioide tiene forma alargada con pocas proyecciones citoplasmáticas. En el citoplasma los orgánulos más abundantes son las cisternas de retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias, vesículas de pinocitosis y uno o dos complejos de Golgi que se localizan principalmente alrededor del núcleo (Santamaría y cols., 1992).

Durante el envejecimiento la lámina propia aparece más engrosada en rata, encontrándose numerosos paquetes de fibrillas de colágeno entre esta lámina basal engrosada y la delgada membrana plasmática de las células mioides peritubulares (Ichiara y cols., 1993). Esto también ocurre en el hámster sirio durante el envejecimiento, en el que también aumenta la lámina basal y hay una mayor cantidad de tejido conectivo entre las células peritubulares y la lámina basal (Morales y cols., 2004).

Por el contrario la célula mioide en la regresión sufre pocos cambios. El volumen de muchas organelas no cambia y solo se observa un leve pero significativo aumento del volumen nuclear y una ligera disminución en el volumen de la célula. También disminuye la cantidad de vesículas pinocíticas con la regresión (Kurohmaru y cols., 1990). En síntesis aunque la célula mioide tiene receptores para la testosterona hay pocos cambios ultraestructurales en la misma durante la regresión debida al fotoperiodo corto. Algo que no sucede en las células de Sertoli o en las células de Leydig que muestran cambios más importantes (Shina Hikim y cols., 1988b).

3.-MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- ANIMALES

En este estudio hemos utilizado un total de 46 hámsters sirios dorados machos (*Mesocricetus auratus*) distribuidos en cuatro grupos:

Primer grupo: 13 animales de 6 meses de edad (jóvenes)

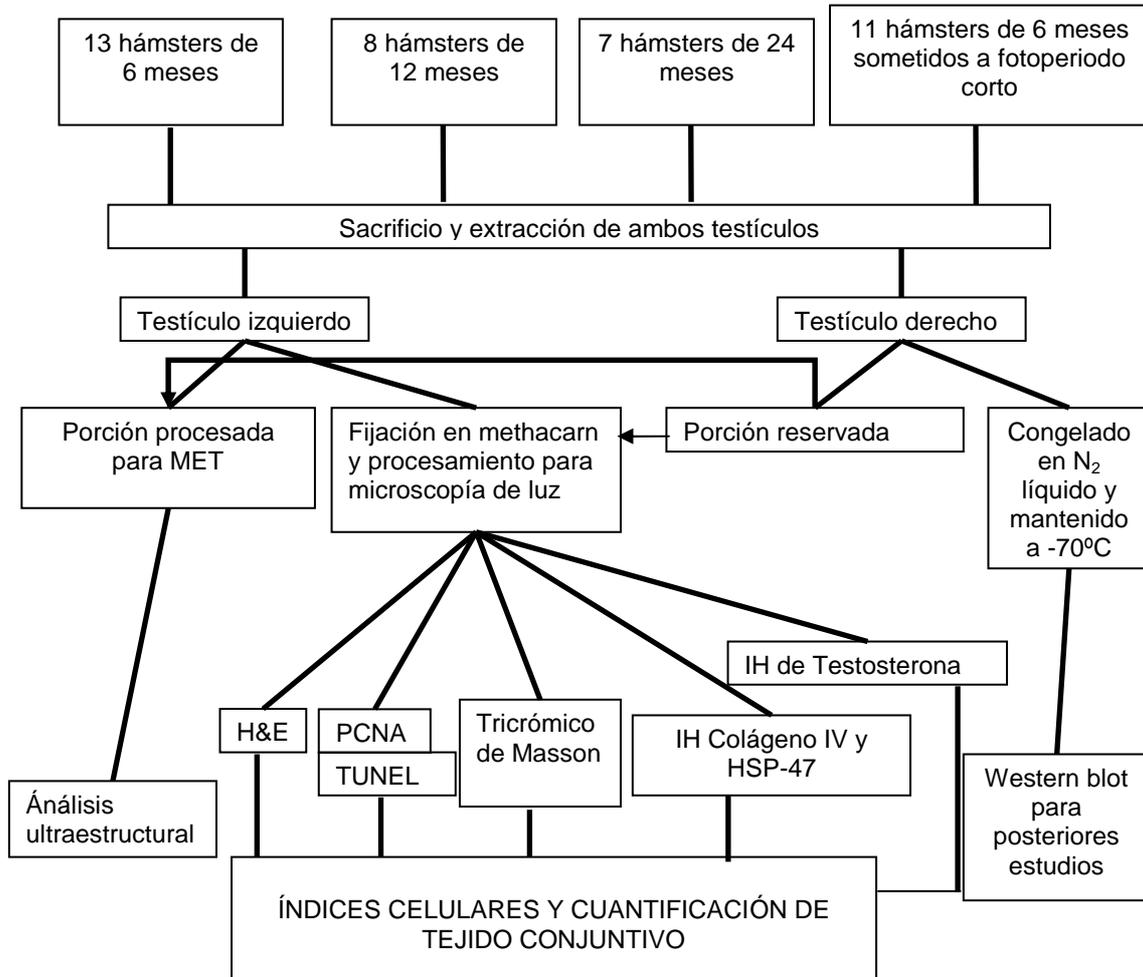
Segundo grupo: 8 animales de 12 meses de edad (adultos)

Tercer grupo: 7 animales de 24 meses de edad (envejecidos)

Los animales de estos tres grupos estuvieron siempre expuestos a un fotoperiodo largo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

El cuarto grupo estaba formado por 11 animales de 6 meses de edad, a los que se les sometió a un fotoperiodo corto de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, regulado por un programador, de forma que estos animales tuvieron un ciclo de luz/oscuridad durante dos meses. A todos los animales se les proporcionó alimentación y agua “ad libitum” y fueron mantenidos a temperatura constante en las instalaciones del estabulario en la Universidad de Murcia.

Esquema 1: Planificación experimental de la presente tesis doctoral



3.2-SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

El sacrificio se realizó en una cubeta desecadora con pastillas de CO₂ (Fig. 1A) según la normativa vigente sobre protección de animales de laboratorio (R.D. 1201/2005). Posteriormente se pesó al animal y se abrió el escroto, para extraer los testículos (Fig. 1B y 1C) midiendo en cada uno de ellos su diámetro mayor y menor. Antes de iniciar el procesamiento se pesaron los testículos por separado.



Figuras1: A) Sacrificio del animal en una cubeta desecadora con pastillas de CO₂. B) Extracción del aparato genital masculino del hámster. C) Separación del epidídimo y el testículo.

3.3-PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS (Esquema 1)

La mayor parte del testículo izquierdo y una porción del derecho se trocearon en secciones para su fijación en methacarn (metanol: cloroformo: ácido acético, 6:3:1) durante 8 horas y posterior realización de las técnicas de microscopía de luz.

Un pequeño fragmento de cada uno de ellos se reservó para su procesamiento según las técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET) y su posterior estudio ultraestructural. El resto del testículo derecho se congeló en N₂ líquido y se guardó a -70° para futuros estudios.

3.3.1.-Microscopía de luz

Tras la fijación en methacarn, las secciones cortadas de diversos tamaños y de diferentes zonas se pasaron a alcohol de 50% y se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol (70%, 96%, 100%) y después de su paso por tolueno, se sumergieron en paraplast plus toda la noche, en un

procesador automático tipo Fischer. Se hicieron los bloques de paraplás plus y se realizaron cortes de 5 µm con un microtomo de rotación Leitz tipo 1512. Después de su estiramiento en agua caliente, los cortes se montaron en portas a los que previamente se les había depositado polilysina. Posteriormente se realizó la técnica de tinción clásica de Hematoxilina & Eosina en 5 portas elegidos al azar de cada uno de los animales.

3.3.1.1.-Histoquímica de proliferación y apoptosis

3.3.1.1.1.-Técnica de detección de células en proliferación (PCNA)

Para poner de manifiesto las células intersticiales que se encuentran proliferando utilizamos la detección del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), mediante la aplicación del anticuerpo correspondiente. Este antígeno es una proteína de 35 kDa que forma parte de la polimerasa δ , y participa de forma activa en la regulación del ciclo celular. En la fase de síntesis se produce un aumento en los niveles de esta proteína a nivel nuclear. Así, cuando ponemos de manifiesto su presencia en los núcleos de las células, detectamos aquellas que se encuentran en la fase G1/S o G2 del ciclo celular.

Se seleccionaron 5 secciones de 5 µm al azar del testículo izquierdo de cada animal y se realizó el siguiente protocolo inmunohistoquímico con las mismas:

- a) Desparafinación en xilol e hidratación en una cadena de alcoholes de concentraciones decrecientes (100%, 96%, 70%).
- b) Realizar tres lavados de 5 minutos cada uno en tampón PBS (Solución Salina Fosfatada de Dulbecco).
- c) Bloqueo de la peróxidasa endógena mediante incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos en solución de peróxido de hidrógeno al 1% en PBS.
- d) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- e) Incubación con suero de conejo (Jackson Immuno Research, 60354) 1,5% en PBS durante 1 hora.
- f) Tres lavados de 5 minutos en PBS.

- g) Incubación en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario PCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen) (Biomeda, V1006) diluido en PBS/BSA 1:250 al 1%.
- h) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- i) Incubación con inmunoglobulina de conejo anti-ratón biotinilada (Chemicon International, E0354) durante 45 minutos a temperatura ambiente, en una solución PBS/BSA 1:200 al 1%.
- j) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- k) Incubación con Estreptavidina conjugada con peroxidada (DAKO, P0397) durante 30 minutos a temperatura ambiente, diluyendo la estreptavidina en una solución PBS/BSA 1:300 al 1%.
- l) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- m) Inmersión durante 3 minutos en una solución de TBS con H₂O₂ y diaminobenzidina (DAB).
- n) Lavado en agua destilada y contraste con hematoxilina.
- o) Deshidratación en alcoholes de concentraciones crecientes (70%, 96%, 100%), posteriormente aclarado en xilol y montaje de las preparaciones con DPX.

La especificidad del proceso inmunohistoquímico se comprobó mediante la incubación de las secciones con suero no inmune en lugar del antígeno primario.

3.3.1.1.2.-Técnica de detección de apoptosis “in situ” (TUNEL)

Se aplicó el kit “TACS in situ” (R & D System, Inc., Minneapolis, MN, USA) para la detección “in situ” de la muerte celular (reacción TUNEL) [in situ cell death detection kit, POD (Tunel reaction)]

Se seleccionaron 5 secciones de 5 µm al azar del testículo izquierdo de cada animal. Todas las muestras fueron desparafinadas con O-xilol. Posteriormente se hidrataron en alcoholes de concentraciones decrecientes (100%, 96%, 70%) se lavaron en agua libre de Dnasa y se transfirieron a PBS.

El protocolo de la técnica fue el siguiente:

- a) Incubación de las muestras en cámara húmeda durante 15 minutos con proteinasa K.
- b) Lavado en agua libre de Dnasa
- c) Incubación durante 5 minutos en solución de peróxido de hidrógeno al 3%.
- d) Lavado en la solución 1XTdT labelling buffer.
- e) Incubación con 50 µl de la solución anterior más 50x Mn²⁺ (1 µl), más Enzyme TdT (1 µl) y 1 µl TdTNTP Mix en cámara húmeda a 37° durante una hora.
- f) Detención de la reacción con TdT stop buffer.
- g) Lavado en PBS.
- h) Incubación con solución de Estreptavidina (1 µl Estreptavidina-HRP + 750 µl blue Estreptavidina-HRP diluyente) durante 10 minutos a una temperatura entre 18°-24° C.
- i) Lavado en PBS.
- j) Aplicación de la tinción "Tacs blue label".
- k) Tras lavado en agua destilada, incubación con la solución de contraste (Red Nuclear Fast)
- l) Lavado en agua y deshidratación en una cadena de alcoholes de concentraciones crecientes (70%, 96%, 100%).
- m) Lavado en O-xilol y montaje con DPX.

Durante la realización de la técnica se llevaron a cabo los siguientes controles:

-Un control negativo de forma que una de las muestras no fue sometida al tratamiento con la solución de proteinasa K.

-Un control positivo mediante la incubación de una de las muestras con la solución de trabajo de la nucleasa (1µl TACS-nuclease+50µl de TACS nuclease buffer).

-Un control no marcado, para lo cual una de las muestras no fue incubada con TdT enzima.

3.3.1.2. -Identificación histoquímica de células positivas a testosterona

Se seleccionaron 4 secciones de 5 µm al azar del testículo izquierdo de cada animal y se realizó el siguiente protocolo con las muestras:

- a) Desparafinación en xilol e hidratación en una cadena de alcoholes de concentraciones decrecientes (100%, 96%, 70%).
- b) Tres lavados de 5 minutos cada uno en tampón PBS.
- c) Bloqueo de la peróxidasa endógena mediante incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos en solución de peróxido de hidrógeno al 1% en PBS.
- d) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- e) Incubación en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario Rabbit Anti-Testosterona (MP Biomedicals, LLC, 69351) diluido en PBS/BSA 1:250 al 1%.
- f) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- g) Incubación con inmunoglobulina de cabra anti-conejo biotinilada (Chemicon International, AP132B) durante 45 minutos a temperatura ambiente, en una solución PBS/BSA 1:500 al 1%.
- h) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- i) Incubación con Estreptavidina conjugada con peroxidada (DAKO, P0397) durante 30 minutos a temperatura ambiente, diluyendo la Estreptavidina en una solución PBS/BSA 1:300 al 1%.
- j) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- k) Inmersión durante 3 minutos en una solución de TBS con H₂O₂ y diaminobenzidina (DAB).
- l) Lavado en agua y contraste con hematoxilina.
- m) Deshidratación con concentraciones crecientes de alcohol (70%, 96%, 100%), aclarado en xilol y montaje de las preparaciones con DPX.

La especificidad del proceso inmunohistoquímico se comprobó mediante la incubación de las secciones con suero no inmune en lugar del antígeno primario.

3.3.1.3.-Identificación histoquímica de tejido conjuntivo y proteínas relacionadas

3.3.1.3.1.-Tinción de Tricrómico de Masson (Kiernan., 2008)

Se seleccionaron 3 secciones de 5 µm al azar de cada animal y se realizó el siguiente protocolo con las muestras para poner de manifiesto el tejido conjuntivo presente en el área intersticial y peritubular del testículo:

- a) Desparafinar y lavar los cortes en agua
- b) Hematoxilina de Weigert (PANREAC) durante 5 minutos
- c) Lavado abundante en agua durante 10 minutos
- d) Fucsina Ponceau durante 5 minutos [Fucsina ácida (Kuhlmann) +Solución Ponceau B.S (Kuhlmann)]
- e) Dos lavados de 5 minutos cada uno en ácido fosfomolibdico al 1%
- f) Verde luz durante 10 minutos (Fluka AG, Buchs S.G)
- g) Dos lavados en alcohol de 96°
- h) Un lavado en alcohol absoluto
- i) Aclarado en xilol y montaje de las preparaciones con DPX

3.3.1.3.2- Identificación inmunohistoquímica de células que expresan Heat Shock Protein 47 (HSP-47)

Se seleccionaron al azar 4 secciones de 5 µm de cada animal y se realizó el siguiente protocolo:

- a) Desparafinación en xilol e hidratación en una cadena decreciente de alcoholes (100%, 96%, 70%).
- b) Dos ciclos, uno de ellos de 5 minutos y otro de 2 minutos en tampón para desenmascaramiento de antígenos (DAKO, sc 2367) a 95° en microondas.
- c) Tres lavados de 5 minutos cada uno en tampón PBS.
- d) Bloqueo de la peróxidasa endógena mediante incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos en una solución de peróxido de hidrógeno al 1% en PBS.
- e) Tres lavados de 5 minutos en PBS.

- f) Incubación en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario de HSP-47 (Santa Cruz Biotechnology, sc-8352) diluido en PBS/BSA 1:100 al 1%.
- g) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- h) Incubación con inmunoglobulina de cabra anti-conejo biotilada (Chemicon International, AP106B) durante 45 minutos a temperatura ambiente, diluyendo la Estreptavidina en una solución PBS/BSA 1:300 al 1%
- i) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- i) Incubación con streptavidina conjugada con peroxidada (DAKO, P0397) durante 30 minutos a temperatura ambiente, diluyendo la estreptavidina en una solución PBS/BSA 1:300 al 1%.
- k) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- l) Inmersión durante 3 minutos en una solución de TBS con H₂O₂ y diaminobenzidina (DAB).
- m) Lavado en agua y contraste con hematoxilina.
- n) Deshidratación en concentraciones crecientes de alcohol (70%, 96%, 100%), posteriormente aclarado en xilol y montaje de las preparaciones con DPX.

La especificidad del proceso inmunohistoquímico se comprobó mediante la incubación de las secciones con suero no inmune en lugar del antígeno primario.

3.3.1.3.3.-Técnica de detección inmunohistoquímica de colágeno IV ($\alpha 5$)

Se seleccionaron al azar 4 secciones de 5 μ m de cada animal y se realizó el siguiente protocolo:

- a) Desparafinación en xilol e hidratación en una cadena de alcoholes de concentraciones decrecientes (100%, 96%, 70%).
- b) Tres lavados de 5 minutos cada uno en tampón PBS.
- c) Bloqueo de la peróxidasa endógena mediante incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos en solución de peróxido de hidrógeno al 1% en PBS.

- d) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- e) Incubación en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario de colágeno IV policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-11360) diluido en PBS/BSA 1:50 al 1% .
- f) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- g) Incubación con inmunoglobulina de cabra anti-conejo biotinilada (Chemicon International, AP106B) durante 45 minutos a temperatura ambiente, diluyendo la estreptavidina en una solución PBS/BSA 1:500 al 1%
- h) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- i) Incubación con streptavidina (DAKO, P0397) conjugada con peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente, diluyendo la estreptavidina en una solución PBS/BSA 1:300 al 1%.
- j) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- k) Inmersión durante 3 minutos en una solución de TBS con H₂O₂ y diaminobenzidina (DAB).
- l) Lavado en agua y contraste con hematoxilina.
- m) Deshidratación en alcoholes crecientes, posteriormente aclarado en xilol y montaje de las preparaciones con DPX.

3.3.2.-Microscopía electrónica

Los fragmentos procedentes de cada uno de los testículos y destinados al estudio ultraestructural, se seccionaron en fragmentos de 1mm³ de espesor y se fijaron en glutaraldehído al 3,5% en tampón cacodilato 0,1M durante 4 horas a 4°C. Seguidamente se lavaron durante 30 minutos en una solución de cacodilato-sacarosa al 0,85% como paso previo a la postfijación, que se realizó en tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1% en tampón cacodilato 0,1M durante 2,5 horas a 4°C. Tras un nuevo lavado en tampón cacodilato-sacarosa, las secciones se deshidrataron con soluciones de alcohol de concentraciones crecientes (50%, 70%, 96%, 100%) y se incluyeron en Epon 812 (Serva, Heidelberg, Alemania), previo paso por óxido de propileno. Una vez obtenidos los bloques, se realizaron cortes semifinos de 0,5-1mm de espesor con un ultramicrotomo Reichert ultracut y se tiñeron con azul de toluidina al 0,3% en solución acuosa.

Seleccionada el área de estudio, se talló el bloque y se obtuvieron secciones ultrafinas cuyo espesor oscilaba entre 50-70nm con un ultramicrotomo Reichert ultracut. Los cortes se recogieron en rejillas de cobre y se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo. La observación y la obtención de fotografías se realizaron en un microscopio Zeiss EM-10 CR y en un microscopio JEOL JEM 1011.

3.4.-ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO

3.4.1.- Porcentaje de células intersticiales

En las preparaciones de H&E se calculó el porcentaje celular de los siguientes tipos celulares del intersticio testicular: célula de Leydig, pericito y macrófago. Para ello se utilizó el número de las células contadas de cada tipo, en un campo exclusivamente de intersticio testicular, respecto al número total de la suma de todos los tipos celulares multiplicando por 100 para obtener el porcentaje. Se analizaron 25 campos en cinco secciones testiculares elegidas al azar de cada animal. Se excluyó el conteo de la célula peritubular o mioide ya que esta puede alterar la relación porcentual del intersticio debido a que podría aumentar con el envejecimiento o en el fotoperiodo corto como consecuencia de la disminución del diámetro del túbulo seminífero que se da en esas situaciones, lo que podría dar lugar a un porcentaje intersticial celular no comparable con los grupos sometidos a fotoperiodo largo de 6 y 12 meses. Se utilizó un microscopio Leitz y el objetivo de 40x.

3.4.2.-Porcentaje de los tipos de células de Leydig

Se eligieron al azar 5 secciones de H&E de cada animal. En cada sección se seleccionaron 25 campos de intersticio testicular y se diferenciaron dos tipos de células de Leydig (tipo A y tipo B). Para calcular el porcentaje de cada tipo de célula de Leydig se utilizó el número total de células de Leydig de cada tipo frente al número total de células de Leydig contadas. Se consideraron células de Leydig de tipo A las que presentarán una morfología normal, sin signos aparentes de deterioro o necrosis. El tipo B incluyó células de Leydig que presentarán síntomas de deterioro que se manifiestan principalmente en el núcleo y en la relación de este con el citoplasma. Se utilizó un microscopio Leitz y el objetivo de 40x.

3.4.3.-Índices celulares de proliferación y apoptosis

Para cuantificar la proliferación y apoptosis celular en el intersticio testicular se seleccionaron cuatro tipos celulares importantes del mismo: célula de Leydig, pericito, macrófago y célula mioide.

Para la obtención de estos índices. Se eligieron al azar cinco secciones testiculares por animal. En cada sección se eligieron 25 campos de intersticio testicular entre túbulos seminíferos. Se utilizó un microscopio Leitz y el objetivo de 40X.

Para cuantificar la actividad proliferativa, en cada campo de estudio se contabilizó el número de células positivas a PCNA de cada tipo celular respecto al número total de células (positivas + negativas) de los siguientes tipos celulares: célula de Leydig, pericito, macrófago y célula mioide, multiplicando por 100 para determinar el porcentaje

Para cuantificar la actividad apoptótica del intersticio testicular se contabilizó en cada campo de estudio el número de células TUNEL positivas frente al número de células totales (positivas + negativas) de cada uno de los tipos celulares multiplicando por 100 para determinar el porcentaje.

Así se obtuvieron los índices de proliferación y apoptosis siguientes:

- 1) Índice de proliferación de células de Leydig: % de células de Leydig positivas
- 2) Índice de proliferación de pericitos: % de pericitos positivos
- 3) Índice de proliferación de macrófagos: % de macrófagos positivos
- 4) Índice de proliferación de células mioides: % de células mioides positivas
- 5) Índice de apoptosis de células de Leydig: % de células de Leydig TUNEL-positivas
- 6) Índice de apoptosis de pericitos: % de pericitos TUNEL-positivos
- 7) Índice de apoptosis de macrófagos: % de macrófagos TUNEL-positivos
- 8) Índice de apoptosis de células mioides: % de células mioides TUNEL-positivas

3.4.4.-Índice de células de Leydig positivas a testosterona.

Para la obtención de este índice se eligieron al azar cuatro secciones testiculares por animal. En cada sección se eligieron 25 campos de intersticio testicular entre túbulos seminíferos. Se utilizó un microscopio Leitz y el objetivo de 40X.

Para cuantificar la expresión de testosterona se contabilizó en cada campo el número de células de Leydig positivas a testosterona frente al número de células de Leydig totales multiplicando por 100 para determinar el porcentaje.

Se obtuvieron los siguientes índices:

- 1) Índice de células de Leydig positivas a testosterona
- 2) Índice de células de Leydig de tipo A positivas a testosterona
- 3) Índice de células de Leydig de tipo B positivas a testosterona

3.4.5.- Índice de células de Leydig positivas a HSP-47.

Se eligieron al azar 4 secciones testiculares de cada animal. En cada sección se estudiaron 25 campos de intersticio testicular entre túbulos seminíferos. Se utilizó un microscopio Olympus BX51, una cámara Olympus DP25 y el objetivo de 60x.

Para cuantificar la expresión de HSP-47 se contabilizó en cada campo el número de células de Leydig positivas a HSP-47 frente al número de células totales multiplicando por 100 para determinar el porcentaje.

Se obtuvo el siguiente índice:

Índice de células de Leydig positivas a HSP-47.

3.4.6.- Índice de células de Leydig positivas a colágeno IV ($\alpha 5$)

Se eligieron al azar 4 secciones testiculares de cada animal. En cada sección se estudiaron 25 campos de intersticio testicular entre túbulos seminíferos. Se utilizó un microscopio Olympus BX51 y el objetivo de 60x.

Para cuantificar la expresión de colágeno IV ($\alpha 5$) se contabilizó en cada campo el número de células de Leydig positivas a colágeno IV ($\alpha 5$) frente al número de células totales multiplicando por 100 para determinar el porcentaje. Se obtuvo el siguiente índice:

Índice de células de Leydig positivas a colágeno IV ($\alpha 5$).

3.5.-DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE TEJIDO CONJUNTIVO TESTICULAR

En las secciones de los grupos de estudio, se realizó un análisis morfométrico tras la tinción de Tricrómico de Masson. Se utilizaron 3 secciones al azar de cada animal y se realizó un muestreo de 15 campos/sección con un objetivo de 20x.

Para ello se utilizó un programa específico denominado cell D (Olympus). Este programa cuantificó el área ocupada por tejido conjuntivo. Para ello se captaron las imágenes con una cámara Olympus DP25 insertada en un microscopio Olympus BX51. El tejido conjuntivo tras esta tinción es de color verde a diferencia del resto de tejido que es de color lila por el contraste con hematoxilina. La realización de la determinación del volumen fue semiautomática. Se seleccionó el color verde y el programa midió automáticamente la densidad de área del campo que tiene ese color seleccionado frente al área total de referencia. A continuación de manera manual se eliminó la zona de tejido peritubular para poder calcular la densidad de área intersticial. Se operó de la misma manera para el cálculo de la densidad del área peritubular, pero en este caso eliminando la zona de tejido intersticial. El volumen total de tejido conjuntivo intersticial o peritubular se calculó multiplicando la densidad de área intersticial o peritubular por el volumen testicular ($V=4/3 \cdot r^1 \cdot r^2 \cdot r^3$).

3.6.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó contrastes de igualdad de medias mediante análisis de varianza de dos vías. En aquellos casos en que se comprobó diferencia entre medias, se completó el análisis mediante la realización de los tests estadísticos de DMS y Bonferroni, teniendo en cuenta el número total de animales y el número de componentes de cada uno de los grupos. Para la realización de esta tarea se contó con la colaboración de la Unidad Docente de Bioestadística de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia.

4.-RESULTADOS

4.1.-RESULTADOS CUALITATIVOS

4.1.1.-Microscopía de luz convencional

4.1.1.1.-Animales jóvenes, adultos y envejecidos (6, 12 y 24 meses)

El intersticio testicular está localizado en el espacio que delimitan los túbulos seminíferos. En el hámster sirio está formado por pequeños vasos sanguíneos alrededor de los cuales se distribuyen grupos de células de Leydig, un pequeño número de macrófagos y otras células intersticiales principalmente pericitos y fibroblastos. Todas ellas están rodeadas por un laberinto de sinusoides linfáticos irregulares (Fig. 1A, 1B, 1C).

El tejido intersticial de los animales de 6, 12 y 24 meses no presenta diferencias histológicas importantes y se caracteriza por su abundante celularidad (Fig. 1B, 1D y 1E). En todas las imágenes de microscopía de luz la célula mayoritaria observada es la célula de Leydig. Habitualmente estas se dispone en pequeños grupos alrededor de los vasos sanguíneos, aunque se pueden localizar junto a la pared tubular (Fig. 1D, 1E, 1F, 1G, 1H). Las células endoteliales que revisten la pared de los vasos sanguíneos tienen un núcleo aplanado y curvo para adaptarse a la forma tubular del vaso (Fig. 1B).

Tras la observación detenida de las células de Leydig que se encuentran en el intersticio en las secciones histológicas estudiadas hemos diferenciado

morfológicamente dos tipos de células de Leydig que hemos denominado tipo A y tipo B. La célula de tipo A es más grande y presenta una forma poliédrica, con abundante citoplasma, el núcleo suele ser eucromatínico más o menos esférico y de escasa basofilia. El tamaño de la célula puede variar pero no su morfología (Fig. 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H). Las células de Leydig de tipo B suelen ser de menor tamaño. Su citoplasma es escaso y su núcleo es marcadamente irregular y casi picnótico (Fig. 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F). Estos dos tipos celulares se observan en los animales de 6, 12 y 24 meses, siendo aparentemente la célula de Leydig de tipo A la más abundante en los tres grupos (Fig. 2B, 2C, 2D, 3E). La localización de ambos tipos de células de Leydig tanto alrededor de los capilares sanguíneos como cerca de la pared de los túbulos seminíferos es similar en todos los animales (Fig. 2A, 2E, 3C, 3E).

En la pared de los túbulos seminíferos se encuentran las células mioides que por su localización peritubular y morfología fusiforme se identifican fácilmente (Fig. 1G, 2B, 3A).

En la pared de los capilares sanguíneos, rodeando externamente a las células endoteliales están los pericitos que se caracterizan habitualmente en las secciones por tener un núcleo alargado ligeramente curvado con abundante heterocromatina y poco citoplasma (Fig. 2F, 3E).

En los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, de animales jóvenes, adultos y envejecidos se puede apreciar mejor las características morfológicas de los diferentes tipos celulares observados en las tinciones de H&E. Se diferencian los dos tipos de células de Leydig descritos anteriormente. En el citoplasma de la célula de Leydig de tipo A se aprecian gotas lipídicas y un núcleo eucromatínico (Fig. 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F). Las células de Leydig de tipo B tienen menor cantidad de citoplasma y muestran algunos síntomas de necrosis celular y acúmulos de heterocromatina en su núcleo (Fig. 4A, 4D).

Los macrófagos también se encuentran en el intersticio testicular pero su identificación con el microscopio de luz en las secciones de H&E es difícil salvo que exhiban indicios obvios de actividad fagocítica, es decir material

incorporado visible dentro de su citoplasma. Los macrófagos se diferencian de los demás tipos celulares porque en su citoplasma hay numerosos gránulos densos que se tiñen con el azul de toluidina. Su núcleo es eucromático (Fig. 4A, 4B, 4E). Aunque la identificación de estas células se realiza mejor en las secciones inmunohistoquímicas, utilizadas para el conteo de células positivas al antígeno celular de proliferación nuclear, ya que los gránulos que el macrófago posee en su citoplasma se tiñen inespecíficamente con la diaminobencidina utilizada en esta técnica.

Las células mioides en esta especie como en otros roedores se distribuyen en una sola capa en la pared del túbulo seminífero, su morfología fusiforme está adaptada a la forma tubular. La pared tubular rodea a los túbulos y dentro de ella están las células mioides que en las secciones aparecen con un delgado citoplasma que es más grueso en la zona donde se encuentra el núcleo (Fig. 3A, 3F, 4A, 4B, 4D).

4.1.1.2.-Animales sometidos a fotoperiodo corto

Como ya es conocido, los testículos de animales sometidos a fotoperiodo corto se caracterizan por una marcada disminución de volumen, mostrando una importante reducción tanto del tamaño del diámetro del túbulo seminífero, como del volumen del intersticio testicular (Fig. 5A, 5B). Una de las alteraciones que tiene lugar en el intersticio testicular más evidente como consecuencia de la disminución anteriormente mencionada es un aumento visual del número de células intersticiales por área. Las células mioides parecen más numerosas en la pared del túbulo como consecuencia de la disminución del diámetro tubular (Fig. 5A, 5B).

Las células de Leydig presentan menor tamaño por reducción de la cantidad de citoplasma y del volumen del núcleo sin observarse alteraciones celulares importantes (Fig. 5B). En estos animales no hemos podido diferenciar los dos tipos de células descritas en los animales sometidos a fotoperiodo largo, ya que todas las células de Leydig presentan características similares cuando las observamos con microscopía de luz.

En los cortes de seminifinos de animales con testículo totalmente regresado se observa un aumento por área de vasos y agrupaciones de células, la mayoría son células de Leydig con características similares a las descritas anteriormente sin ninguna alteración celular relevante, y como hemos indicado con una disminución del tamaño de la célula (Fig. 5C). Los macrófagos presentan las características típicas descritas anteriormente en los animales de 6, 12 y 24 meses. Su núcleo aparece con forma arriñonada y con un citoplasma lleno de gránulos densos (Fig. 5D).

4.1.2.-Análisis cualitativo de la proliferación celular.

Mediante el uso de la técnica de detección de PCNA se estudió la actividad proliferativa del intersticio testicular. Las células PCNA positivas fueron identificadas por presentar un núcleo de color marrón.

4.1.2.1.-Animales jóvenes, adultos y envejecidos (6, 12 y 24 meses)

En los animales de 6 meses se observó actividad proliferativa en el compartimento del túbulo seminífero y en el intersticio testicular, tanto en las células de Leydig como en los pericitos (Fig. 6A). En los animales de 12 meses y 24 meses también se observó actividad proliferativa en los dos compartimentos testiculares. (Fig. 6B, 6C, 6D).

4.1.2.2.- Animales sometidos a fotoperiodo corto

Se observan células positivas al antígeno nuclear de proliferación celular en el intersticio testicular y en el epitelio seminífero (Fig. 6E)

4.1.3.-Análisis cualitativo de las células apoptóticas

La actividad apoptótica se estudió mediante la técnica de TUNEL. Las células TUNEL positivas tienen el núcleo de color azul-negro.

4.1.3.1.-Animales jóvenes, adultos y envejecidos (6, 12 y 24 meses)

Se observaron células apoptóticas en los diferentes tipos de células germinales en el epitelio seminífero principalmente espermatogonias y espermatocitos (Fig. 7A, 7D). En el intersticio testicular también había células de Leydig, pericitos y células mioide TUNEL positivas tanto en animales jóvenes como adultos (Fig. 7A, 7C, 7D). En animales envejecidos se observaron células TUNEL positivas en el intersticio testicular como pericitos (Fig. 7B).

4.1.3.2.- Animales sometidos a fotoperiodo corto

No se observó actividad apoptótica en el intersticio testicular de animales con testículo regresado totalmente a diferencia de lo que ocurre en el túbulo seminífero (Fig. 7E).

4.1.4- Análisis cualitativo de las células de Leydig productoras de la hormona testosterona.

Las células de Leydig positivas a la hormona testosterona mostraron un citoplasma de color marrón aunque no todas las células de Leydig fueron positivas.

4.1.4.1.- Animales jóvenes, adultos y envejecidos (6, 12 y 24 meses)

Se observaron células positivas a la hormona testosterona en los dos tipos (A y B) de células de Leydig descritas anteriormente en animales de 6 y 12 meses, siendo más frecuente ver células de Leydig positivas de tipo A (Fig. 8A, 8B, 8C, 8D). Las células de tipo B presentaron un citoplasma positivo pero la intensidad del color marrón fue menor que la observada en las células de tipo A (Fig. 8B, 8E). Al igual que en animales jóvenes y adultos, encontramos los dos tipos de células de Leydig positivos a testosterona en animales envejecidos siendo aparentemente más abundantes las de tipo A (Fig. 8F).

4.1.5.-Análisis cualitativo del tejido conjuntivo (Tricrómico de Masson)

4.1.5.1.-Animales jóvenes, adultos, envejecidos (6, 12 y 24 meses) y sometidos a fotoperiodo corto.

En la sección testicular de todos los animales estudiados podemos observar el tejido conjuntivo laxo teñido de color verde debido a la tinción con Tricrómico de Masson. La distribución de este tejido es similar en todos los animales y se localiza alrededor de los túbulos seminíferos en la pared tubular y en el intersticio testicular (Fig. 9A, 9B, 9C, 9D, 9E y 9F).

4.1.6.-Análisis cualitativo de células productoras de HSP-47

Las células de Leydig positivas a HSP-47 mostraron un citoplasma de color marrón.

4.1.6.1.-Animales jóvenes, adultos y envejecidos (6, 12 y 24 meses)

Se observaron células de Leydig positivas a la proteína HSP-47 en todos los animales estudiados (Fig. 10A, 10B, 10C).

4.1.6.2.-Animales sometidos a fotoperiodo corto

Se observaron células de Leydig positivas a la proteína HSP-47 (Fig. 10D).

4.1.7.-Análisis cualitativo de colágeno IV ($\alpha 5$)

4.1.7.1.-Animales jóvenes, adultos, envejecidos (6, 12 y 24 meses)

Las células de Leydig positivas a colágeno IV ($\alpha 5$) mostraron un citoplasma de color marrón (Fig. 11A, 11B, 11C, 11D, 11E). También se observó una débil positividad en la pared tubular (Fig. 11B, 11C).

4.1.7.2.-Animales sometidos a fotoperiodo corto

Se observaron células de Leydig positivas a colágeno IV ($\alpha 5$) en el intersticio testicular de estos animales (Fig. 11F).

4.1.8.-Microscopía electrónica de transmisión

4.1.8.1.- Animales jóvenes, adultos y envejecidos (6, 12 y 24 meses)

El intersticio testicular situado entre los túbulos seminíferos en los animales de 6 y 24 meses no muestra alteraciones ultraestructurales significativas. Está formado por tejido conjuntivo laxo con vasos sanguíneos alrededor de los cuales se agrupan las células de Leydig, pericitos y macrófagos (Fig. 12A, 12B).

Las células de Leydig tienen abundante retículo endoplasmático liso que se distribuye por todo el citoplasma en forma de cisternas o túbulos cortos (Fig. 13B, 13C, 13E) o en largas cisternas paralelas y dispuestas concéntricamente (Fig. 13D). El retículo endoplasmático rugoso es menos abundante y está formado por pequeñas vesículas distribuidas por todo el citoplasma (Fig. 13C, 13E). Las mitocondrias son numerosas de tamaño variable y pueden ser filamentosas o redondeadas y con crestas tubulares, se localizan por todo el citoplasma (Fig. 13A, 13B, 13C) aunque en ocasiones se suelen agrupar en las proximidades del núcleo (Fig. 13E, 13F). El aparato de Golgi está bien desarrollado en esta especie y se localiza por todo el citoplasma, los dictiosomas están formados por 3 ó 4 cisternas paralelas aplanadas, cortas y ligeramente curvadas, rodeadas de pequeñas vesículas (Fig. 13C). En algunas células de Leydig podemos encontrar en el citoplasma gránulos de lipofuscina (Fig. 13A) y vacuolas (Fig. 13F).

La membrana plasmática de la célula de Leydig es irregular, con numerosas prolongaciones a través de las cuales establecen contacto mediante interdigitaciones y uniones comunicantes (GAP) con otras células de Leydig (Fig. 14A, 14B, 14C, 14D, 14E). Muestran membrana basal discontinua en

forma de fragmentos o pequeños acúmulos siempre cercanos a la superficie de la célula de Leydig (Fig. 15A, 15B, 15C).

En los tres grupos estudiados observamos además otras células de Leydig con signos de degeneración celular (Fig. 16A, 16B, 16C, 16D, 16E, 16F). Las células son electrolúcidas de menor tamaño y en su citoplasma hay menor cantidad de mitocondrias (Fig. 16B) y aumenta el número de lisosomas en ellas (Fig. 16B, 16D, 16F).

Como característica especial, este tipo de células tienen su citoplasma vacuolizado. En las imágenes se observa el deterioro progresivo de menor a mayor extensión en la célula de Leydig (Fig. 16B, 16D, 16F). En las células que tienen mayor grado de degeneración se rompe la membrana plasmática pero el contenido citoplasmático permanece aún unido (Fig. 16F). El núcleo de estas células presenta cambios caracterizados por signos necróticos. Inicialmente el núcleo es eucromático (Fig. 16A) y progresivamente aumenta la heterocromatina formando acúmulos por todo el núcleo (Fig. 16C). En un estado más avanzado de degeneración, el núcleo muestra una morfología más irregular y con numerosos acúmulos de cromatina (Fig. 16E, 16F).

Los pericitos son células que están asociadas a los capilares sanguíneos y su lámina basal está fusionada con la de las células endoteliales, tienen forma más o menos alargada y pueden emitir prolongaciones. Su citoplasma es escaso y con pocas organelas (Fig. 17A, 17B).

Los macrófagos se caracterizan por presentar numerosas prolongaciones citoplasmáticas y un núcleo ligeramente arriñonado y heterocromático. En el citoplasma hay lisosomas y cuerpos residuales y las mitocondrias son escasas (Fig. 18A, 18B, 18C). Las uniones entre macrófagos y células de Leydig tienen lugar a través de proyecciones citoplasmáticas procedentes de las células de Leydig localizadas en invaginaciones citoplasmáticas de los macrófagos (Fig. 19A). Se observa con frecuencia simples contactos entre las membranas de las células de Leydig y macrófagos en zonas en las que ambas están desprovistas de prolongaciones (Fig. 19B, 19C, 19D).

Las células mioides forman parte de la lámina propia que rodea los túbulos seminíferos. Son células fusiformes con una zona central más gruesa que contiene al núcleo. En el citoplasma son abundantes los filamentos y las vesículas de pinocitosis. (Fig. 20A, 20B, 20C, 20D y 20E). Con la edad el perfil de la célula se hace irregular junto con su membrana basal (Fig. 20D).

4.1.8.2.-Animales sometidos a fotoperiodo corto

La distribución de las células en el intersticio testicular de estos animales es similar a la de los animales sometidos a fotoperiodo largo, pero con la diferencia de que al disminuir el volumen testicular aparecen más cantidad de células por área. Las células de Leydig disminuyen de tamaño y su citoplasma es escaso y más electrodenso (Fig. 21A, 21B). El núcleo es más pequeño, heterocromático y con numerosas indentaciones profundas que le dan un aspecto lobulado (Fig. 21B, 21C y 21E) como consecuencia de la disminución de tamaño. Las mitocondrias filamentosas o redondeadas con crestas tubulares, son abundantes y más electrodensas y el retículo endoplasmático liso está poco desarrollado (Fig. 21D, 21E).

Las células muestran prolongaciones citoplasmáticas y siguen presentando contactos entre ellas, aunque no se observan uniones GAP (Fig. 21E, 21F). Suelen aparecer acúmulos de colágeno con restos de membrana basal alrededor de las células de Leydig (Fig. 21D).

Los macrófagos también disminuyen de tamaño pero su ultraestructura es similar a la de los macrófagos encontrados en animales no regresados (Fig. 22A), sin embargo no se observan proyecciones citoplasmáticas de la célula de Leydig en invaginaciones de los macrófagos.

En la pared del túbulo seminífero se encuentran las células mioides de contorno irregular por la disminución del diámetro tubular con un patrón más uniforme. El núcleo es indentado y en el citoplasma se encuentran pequeños grupos de vesículas cerca de la membrana plasmática (Fig. 22A, 22B). Se

observan también restos de fibras de colágeno próximas a la célula mioide (Fig. 22A y 22B). Entre la célula mioide y el epitelio seminífero se aprecia el engrosamiento de la capa de tejido conjuntivo de la lámina propia del túbulo (Fig. 22A, 22B).

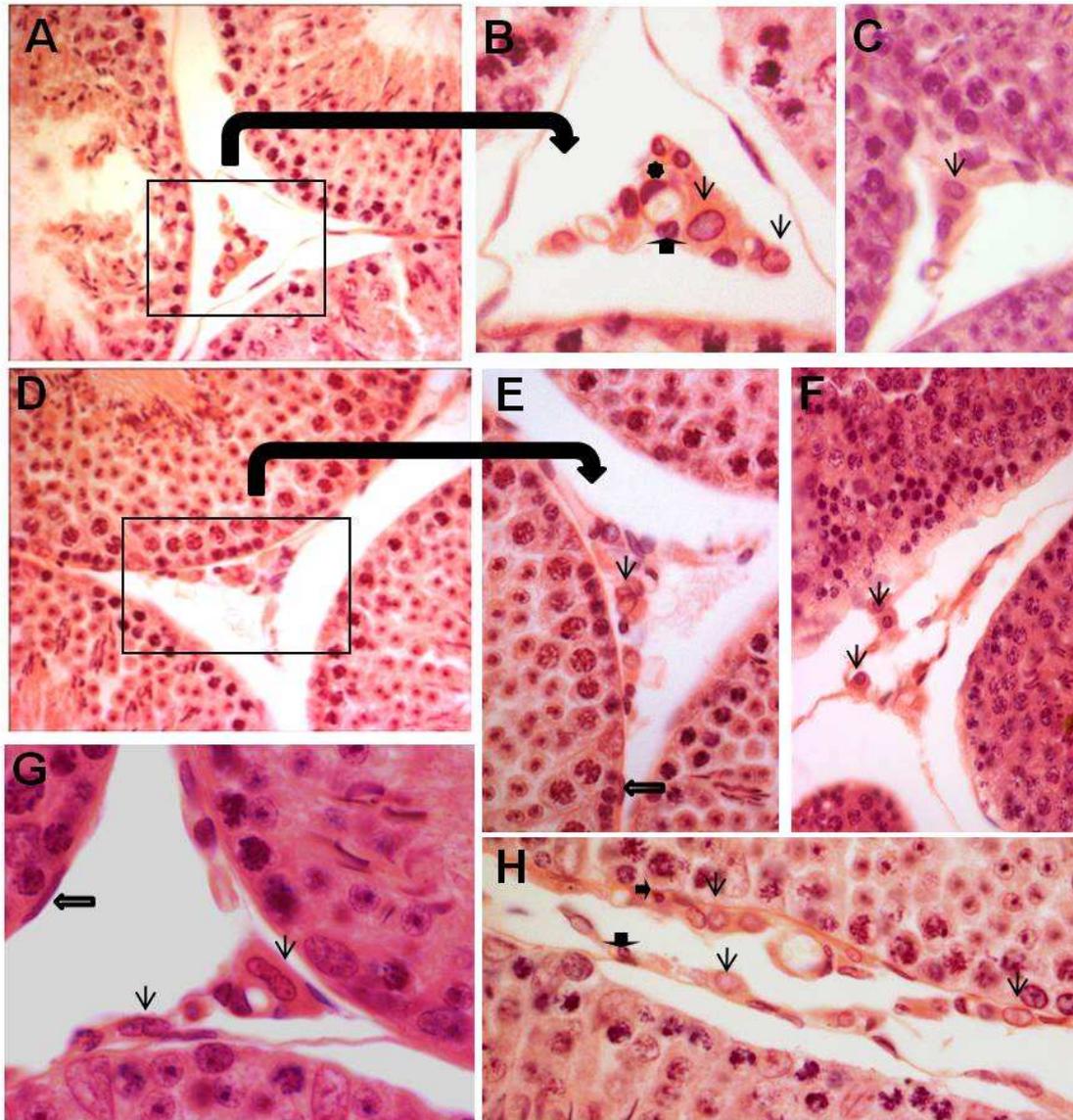


Figura 1. A-H) Secciones de testículo que muestran la organización del intersticio testicular y los diferentes tipos celulares que lo forman en el hámster Sirio dorado (*Mesocricetus auratus*). Teñidas con hematoxilina eosina. **A-E)** Secciones testiculares de animales de 6 meses. **A-B)** Se observa la localización central del intersticio testicular entre el espacio que forman los túbulos seminíferos. Las células se disponen alrededor de un vaso sanguíneo en cuya pared se observa una célula endotelial (asterisco), pericito (flechas gruesas), células de Leydig (flecha fina). **C-E)** Las células de Leydig del intersticio testicular adoptan una localización más cercana al túbulo seminífero. Células de Leydig (flecha fina) y células mioides (flecha hueca). **F-G)** Intersticio testicular de animal de 12 meses donde se observan células de Leydig (flecha fina) y célula mioide (flecha hueca). **H)** En el intersticio testicular de un animal de 24 meses también se observan las células de Leydig (flecha fina) como tipo celular predominante con una morfología similar a las encontradas en animales de 6 y 12 meses. Pericitos (flecha gruesa). **A)** X200; **B)** X400 **C)** X400; **D)** X200; **E)** X400 ; **F)** X200; **G)** X500; **H)** X400.

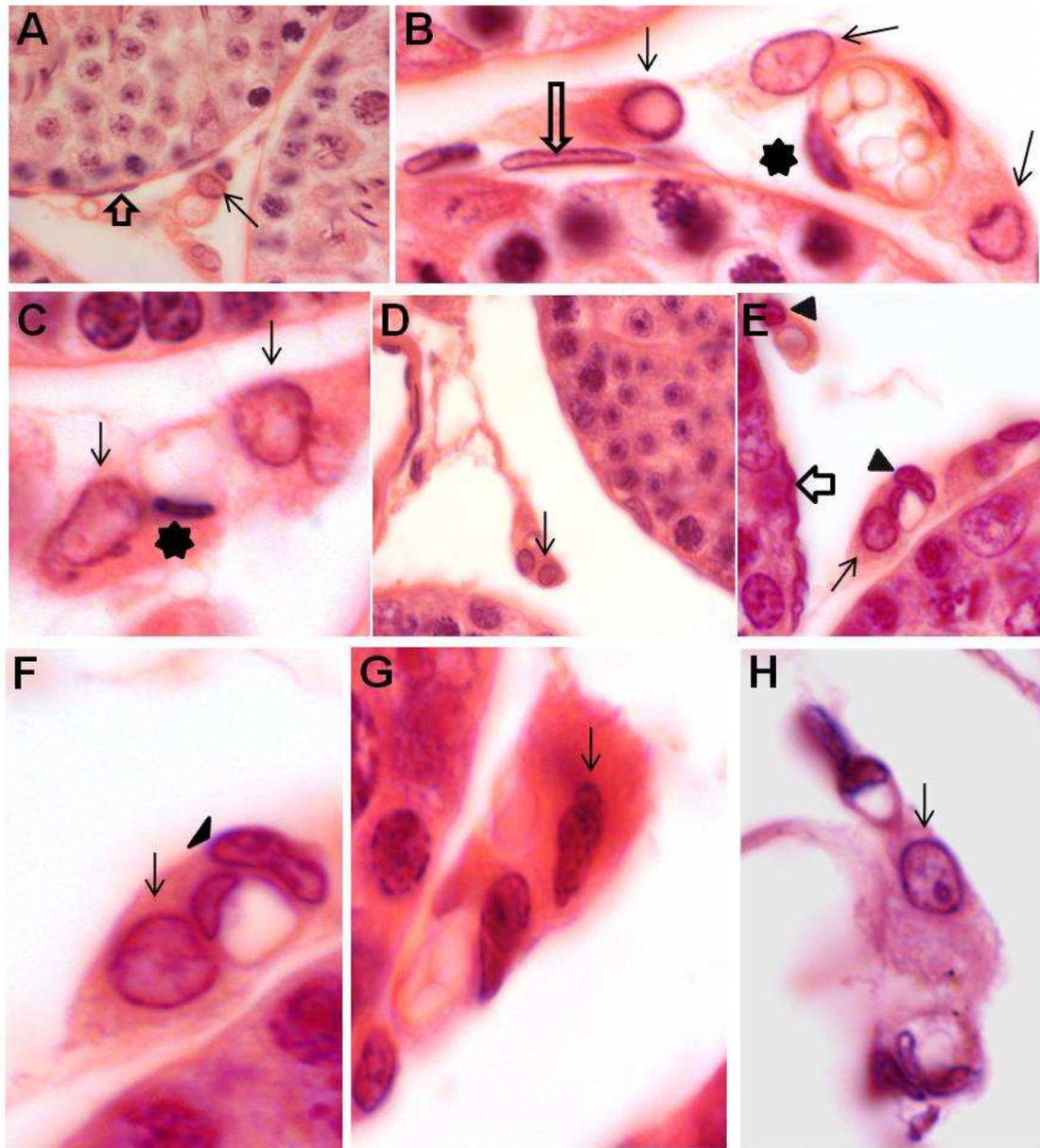


Figura 2. Intersticio testicular de animales de 6 meses (A-C), 12 meses (D-G) y 24 meses (H). Teñidas con hematoxilina eosina. A-C) Las células de Leydig (flecha fina) de tipo A tienen abundante citoplasma y su núcleo muestra escasa basofilia. Las células mioides (flecha hueca) se sitúan en la pared del túbulo seminífero. Las células endoteliales (asterisco) se localizan en la pared de los vasos sanguíneos. D-G) En los animales de 12 meses también encontramos células de Leydig de tipo A (flecha fina), pericito (punta de flecha) y células mioides (flecha hueca). H) Célula de Leydig de tipo A en animales de 24 meses (flecha fina). A) X400; B) X1000; C) X1000 ; D) X400; E) X600; F) X1300; G) X1000; H) X1000.

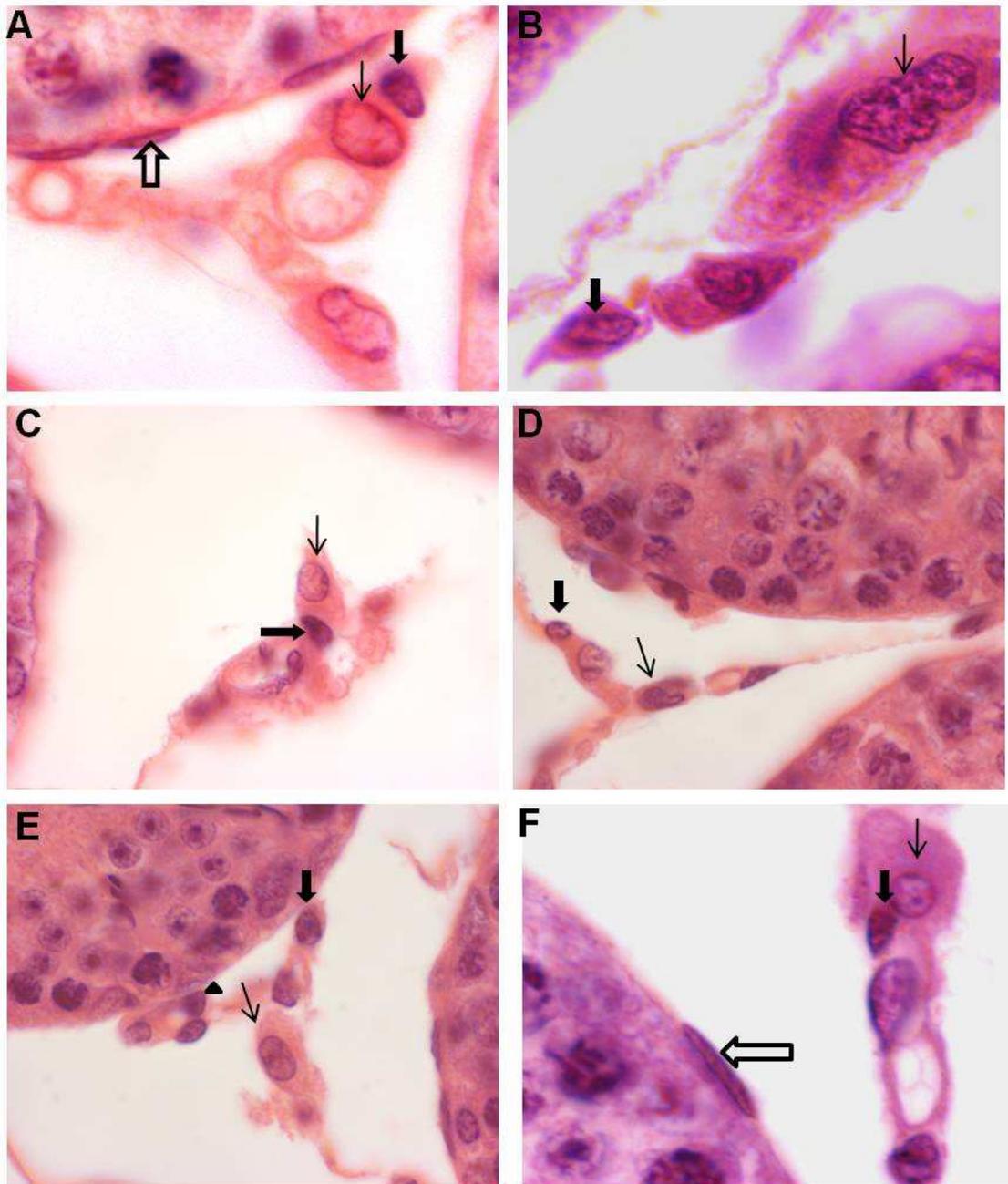


Figura 3. A-F) Secciones de intersticio testicular de animales de 6 meses (**A-C**), 12 meses (**D-E**) y 24 meses (**F**). Teñidas con hematoxilina eosina. **A-F)** Células de Leydig de tipo A (flecha fina) con un núcleo grande y abundante citoplasma, al lado células de Leydig de tipo B (flecha gruesa) con morfología nuclear deteriorada y de menor tamaño. Células mioides (flecha hueca). Pericito (punta de flecha). **A)** X1000; **B)** X1300; **C)** X500; **D)** X400 ; **E)** X500 ; **F)** X1000 .

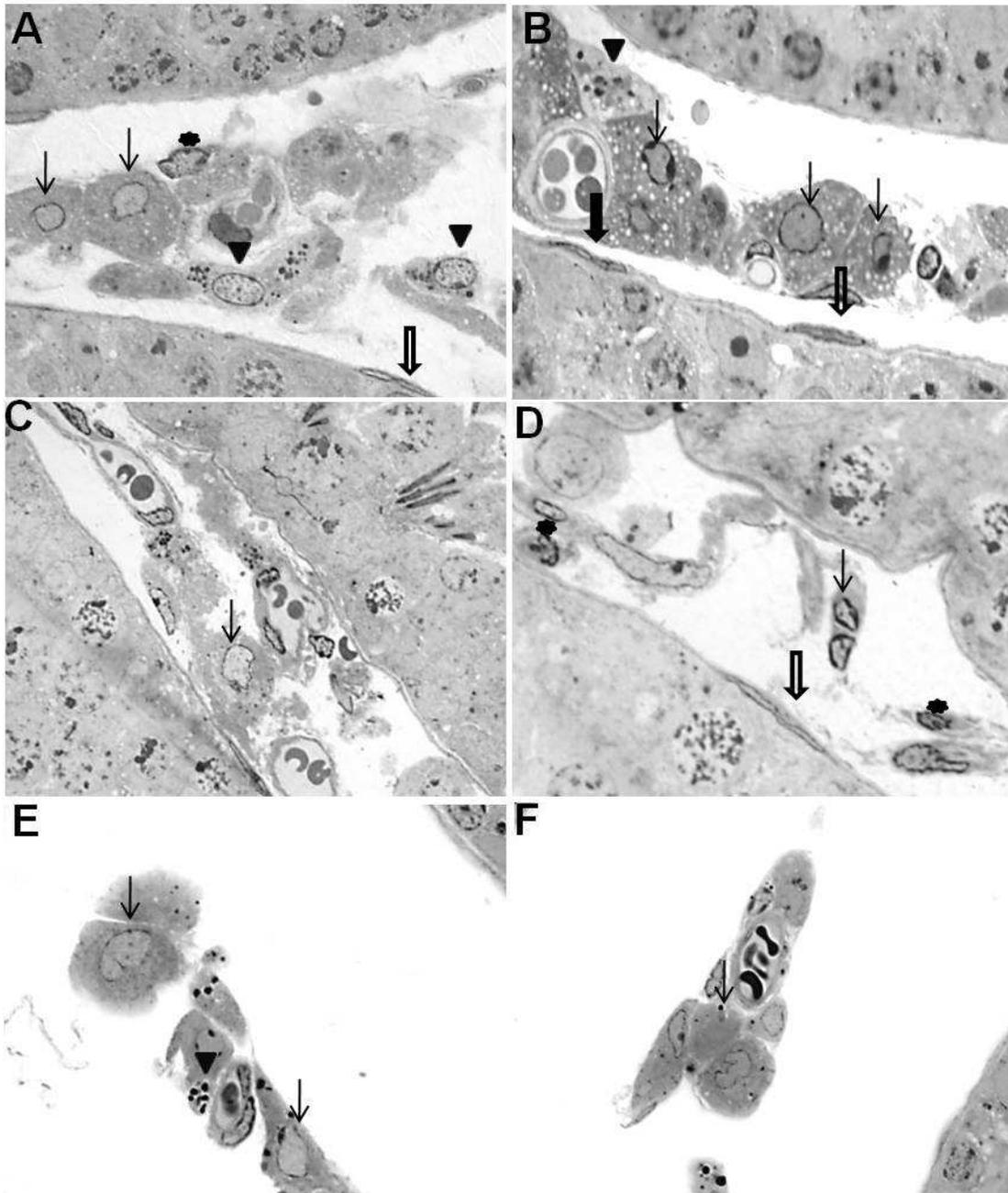


Figura 4. Cortes semifinos de intersticio testicular de animales de 6 meses (A-B), 12 meses (C-D), 24 meses (E-F) teñidos con azul de toluidina. A-D) Se observan los diferentes tipos celulares del intersticio testicular: macrófago (punta de flecha) con abundantes gránulos densos en su citoplasma, células de Leydig de tipo A (flecha fina) de forma poliédrica y con abundante citoplasma que contiene gotas lipídicas y célula de Leydig de tipo B (asterisco). En la pared tubular hay células mioides (flecha hueca). E-F) En animales de 24 meses se observan células de Leydig de tipo A (flecha fina) con morfología similar a las que aparecen en animales de 6 y 12 meses. Macrófago (punta de flecha). A) X1000; B) X1000; C) X1000; D) X1000; E) X1000; F) X1000.

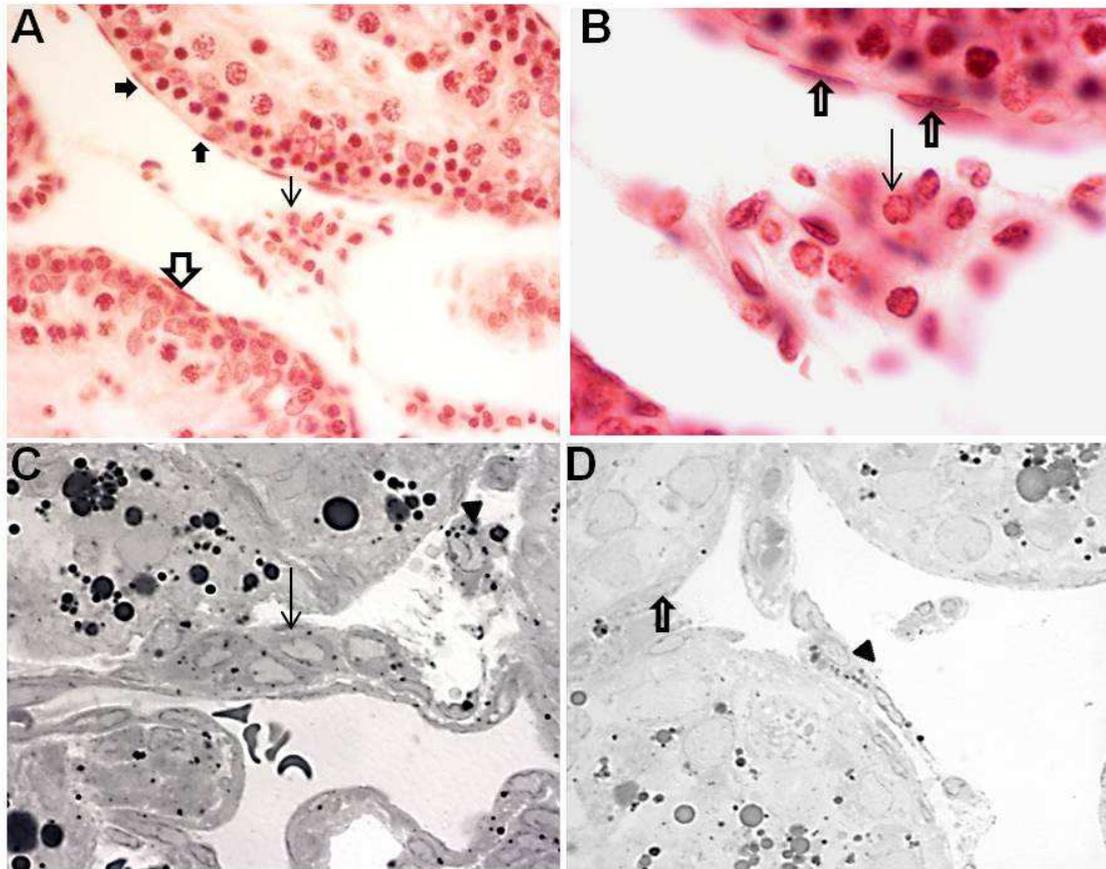


Figura 5. Intersticio testicular de animales sometidos a fotoperiodo corto con testículo totalmente regresado. **A-B)** Aumento por área del número de células de Leydig (flecha fina) teñidas con H&E y células mioides (flecha gruesa). **C-D)** Semifino del intersticio testicular teñido con azul de toluidina donde observamos células de Leydig (flecha fina) con morfología normal pero de menor tamaño, por disminución tanto de la cantidad de citoplasma como del núcleo y macrófagos (punta de flecha). **A)** X200; **B)** X400; **C)** X1000; **D)** X1000.

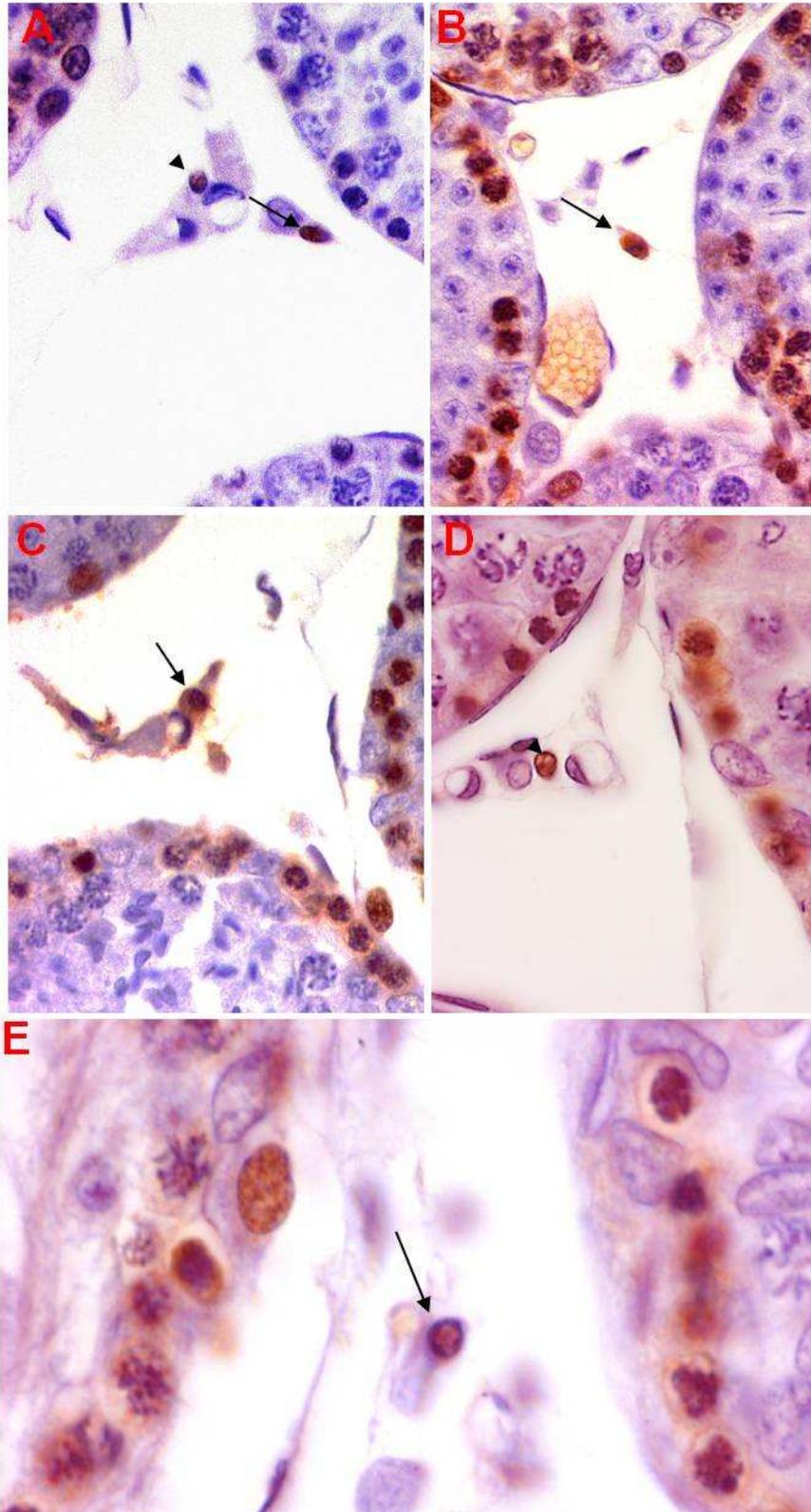


Figura 6. Células intersticiales PCNA positivas en hámsters de 6 meses (A), 12 meses (B-C), 24 meses (D) y sometidos a fotoperiodo corto (E). Contrastadas con hematoxilina. A-E) Células de Leydig PCNA positivas (flecha fina). Pericitos PCNA positivos (punta de flecha). A) X400 ; B) X400; C) X400; D) X400; E) X600.

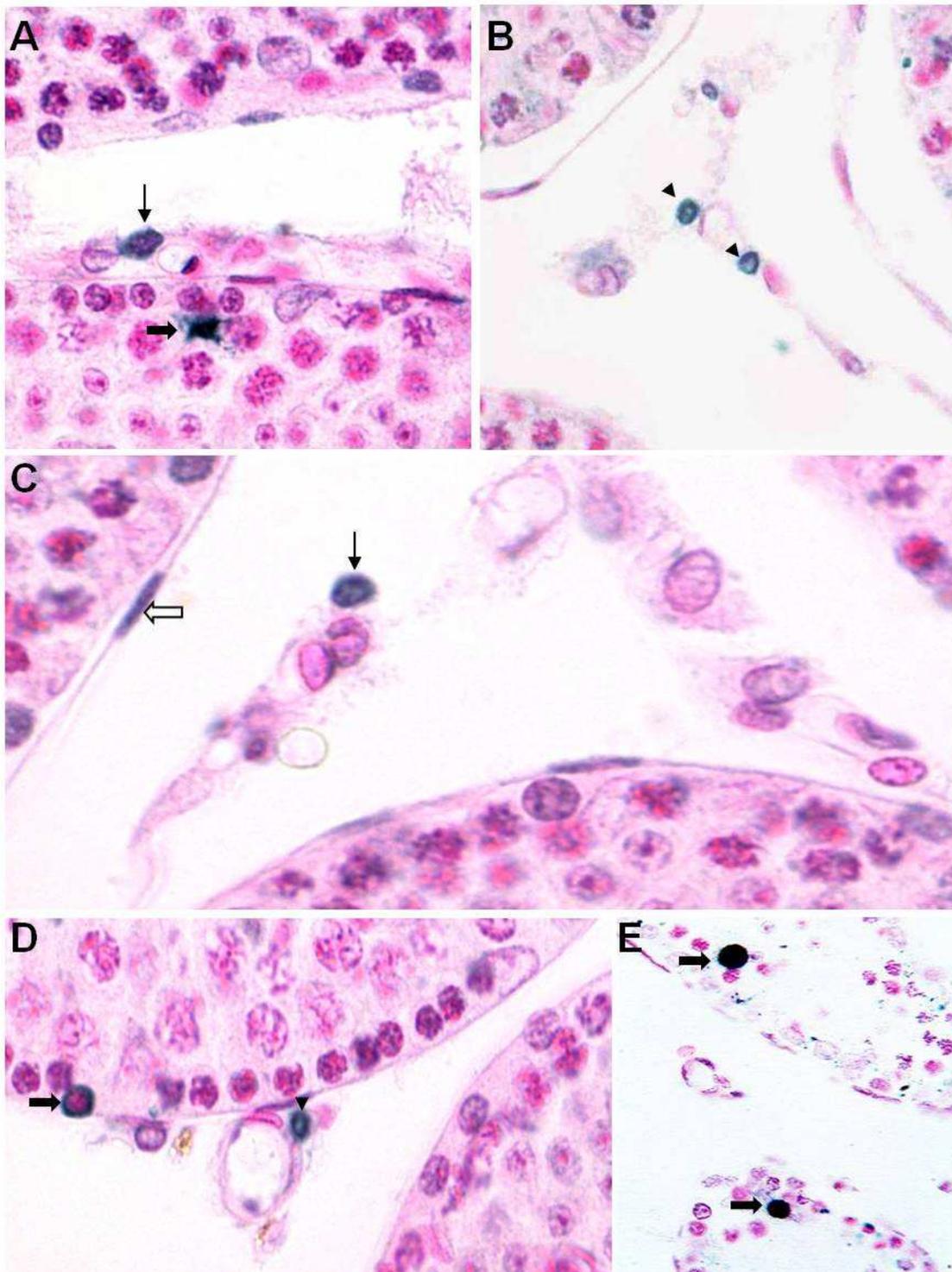


Figura 7. Detección "in situ" de células intersticiales en apoptosis en hámsters de 6 meses (A y C), 12 meses (D) y 24 meses (B) y sometidos a fotoperiodo corto (E). A-E) Célula de Leydig TUNEL positiva (flecha fina). Pericito TUNEL positivo (punta de flecha). Célula mioide TUNEL positiva (flecha hueca). Espermatocito TUNEL positivo (flecha gruesa) (A) y espermatogonia TUNEL positiva (flecha gruesa) (D). En animales con testículo regresado (E) no se observan células TUNEL positivas en el intersticio testicular a diferencia de lo que ocurre en el epitelio seminífero, espermatozoides TUNEL positivos (flecha gruesa). A) X400; B) X400; C) X700; D) X400; E) X400

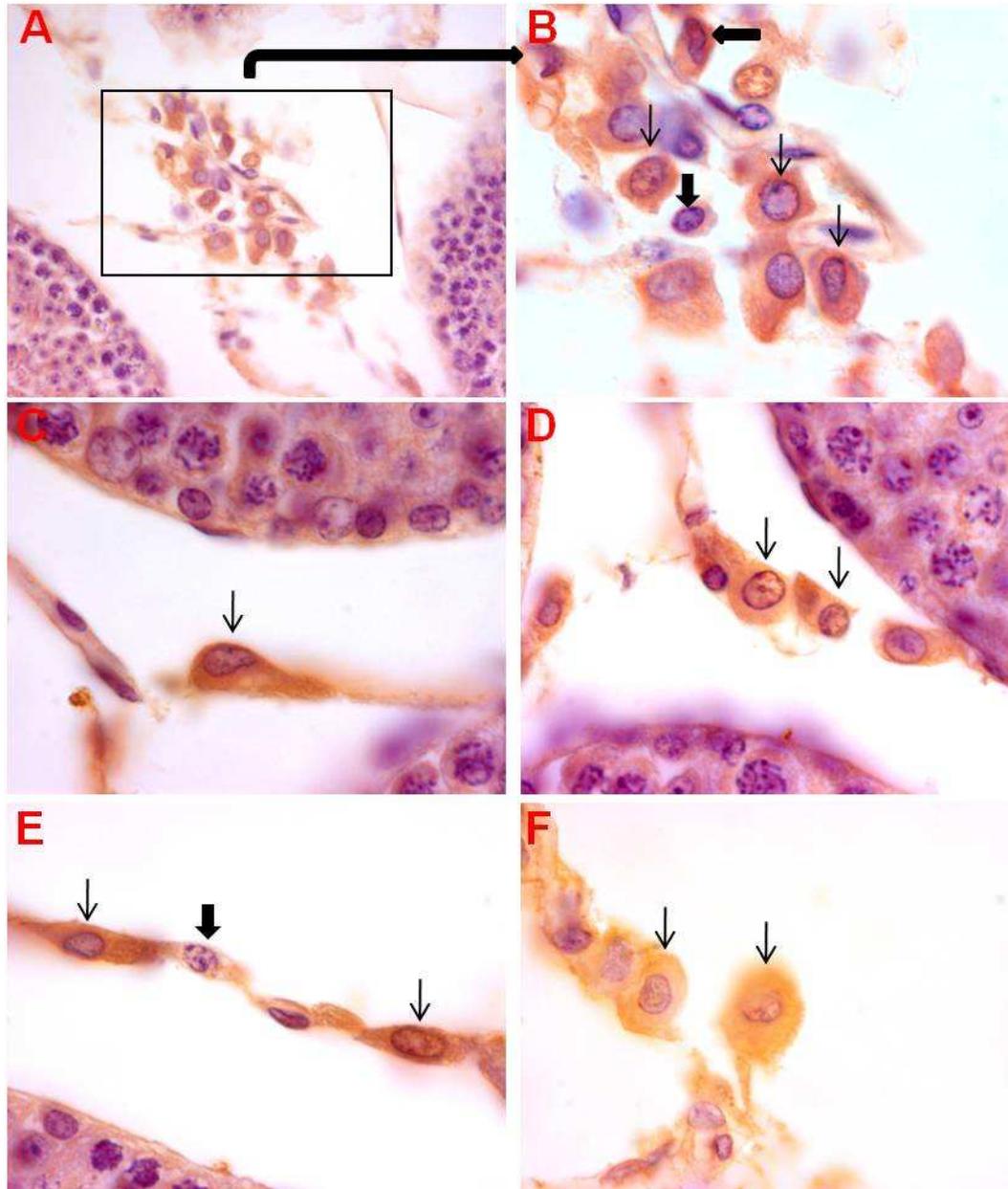


Figura 8. Detección inmunohistoquímica de testosterona en el intersticio testicular de hámsters de 6 meses (A-B), 12 meses (C-E) y 24 meses (F). Contrastadas con hematoxilina. A-F) Cualitativamente se observa mayor número de células de Leydig de tipo A positivas a testosterona (citoplasma marrón) (flecha fina). B y E) Células de Leydig de tipo B positivas a testosterona con menor intensidad de color en su citoplasma y con un núcleo más pequeño y denso (flecha gruesa). A) X400; B) X800; C) X800; D) X800; E) X800; F) X800.

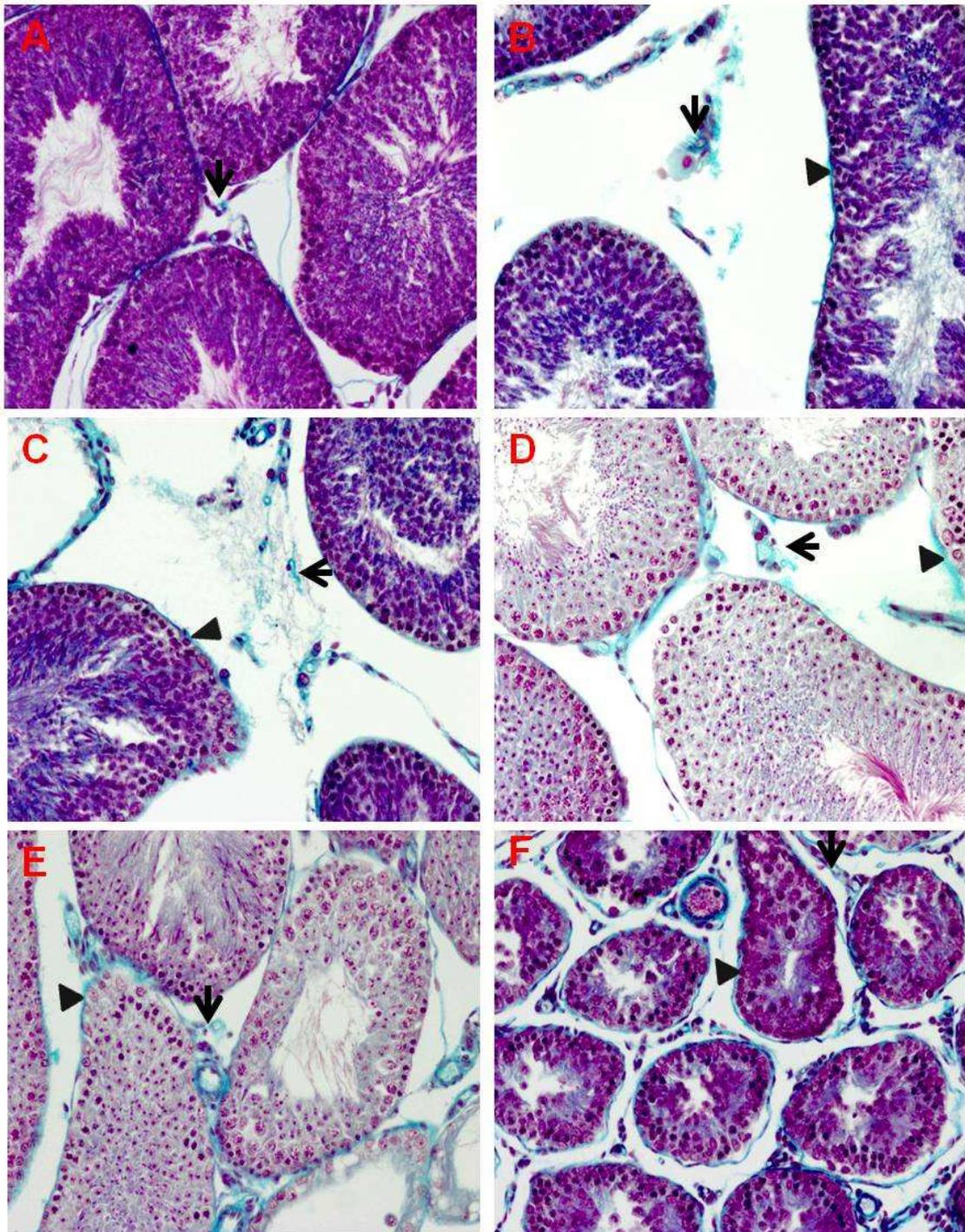


Fig. 9. Intersticio testicular teñido con la tinción de Tricrómico de Masson de hámsters de 6 meses (A), 12 meses (B y C), 24 meses (D y E) y animales sometidos a fotoperiodo corto (F). A-F) El tejido conjuntivo se tiñe de color verde y se observa en el intersticio testicular (flecha) y en la pared de los túbulos seminíferos (punta de flecha). A-F) X20.

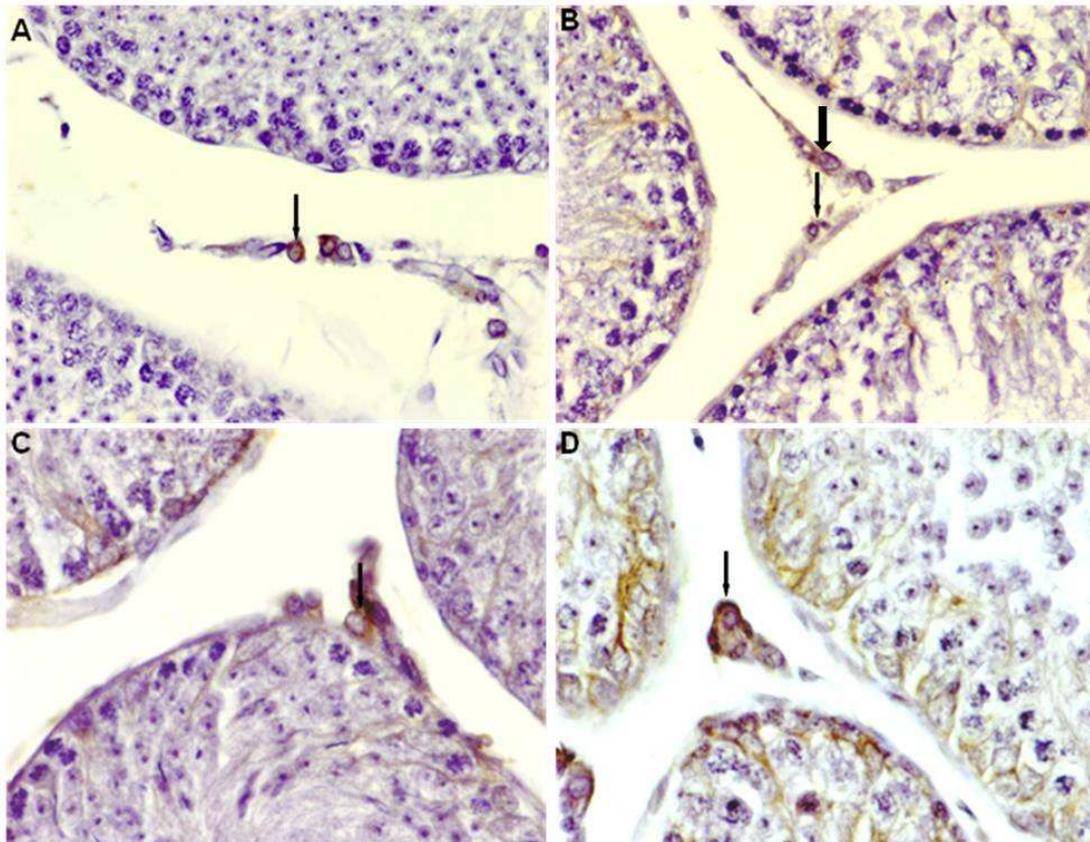


Figura 10. Detección de HSP-47 en la célula de Leydig de hámsters de 6 meses (A), 12 meses (B), 24 meses (C) y sometidos a fotoperiodo corto (D). A-D) Se observa la positividad de las células de Leydig a HSP-47 por su citoplasma de color marrón (flecha). A) X400; B) X400; C) X600; D) X600.

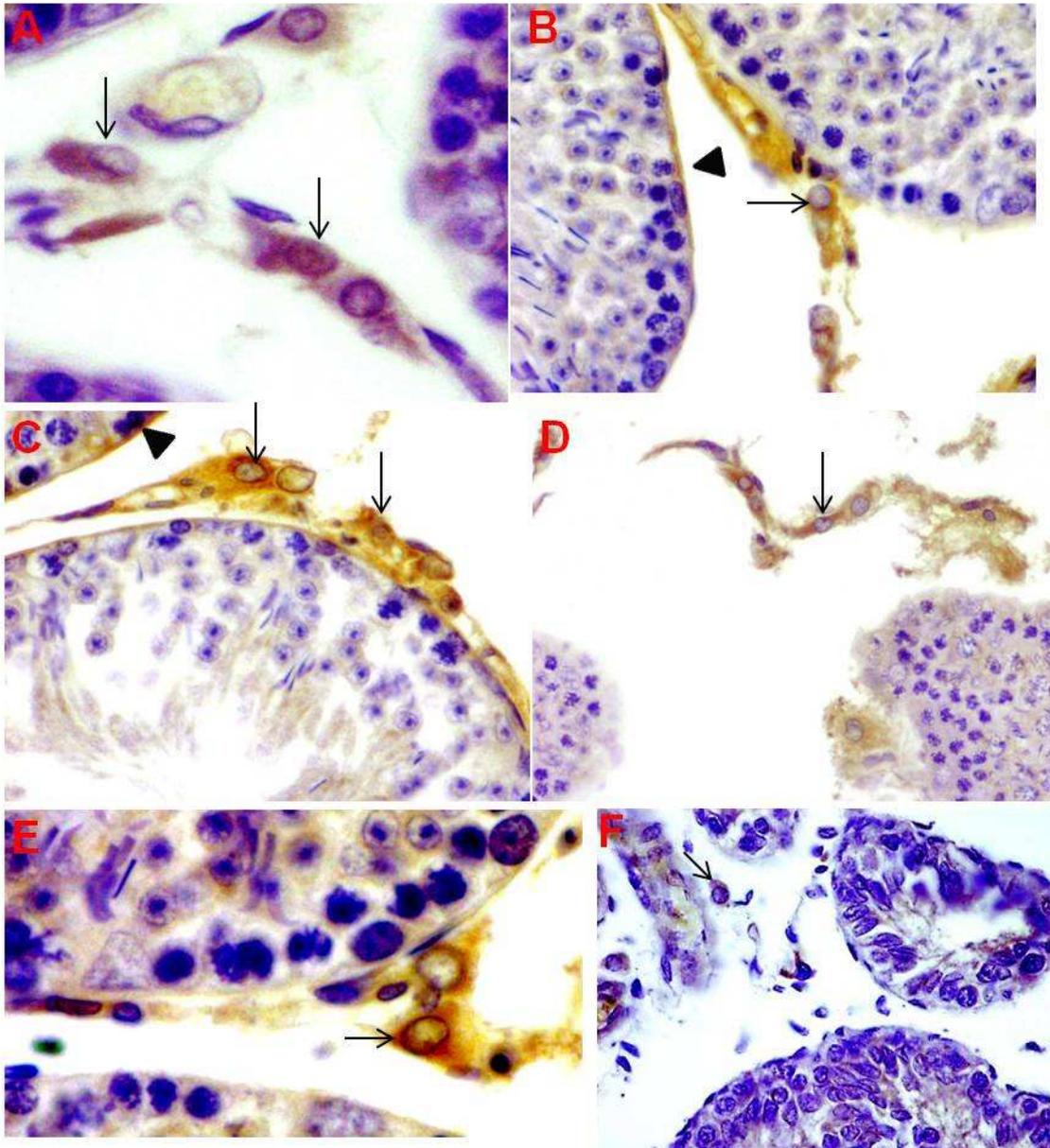


Figura 11. Detección de colágeno IV ($\alpha 5$) en el intersticio testicular de hámsters de 6 meses (A), 12 meses (B, C y E), 24 meses (D) y sometidos a fotoperiodo corto (F). A-F) Las células de Leydig positivas a colágeno IV ($\alpha 5$) presentan un citoplasma de color marrón (flecha fina). También se observa una débil positividad en la pared tubular (punta de flecha). A) X648; B) X400; C) X400; D) X200; E) X648; F) X600.

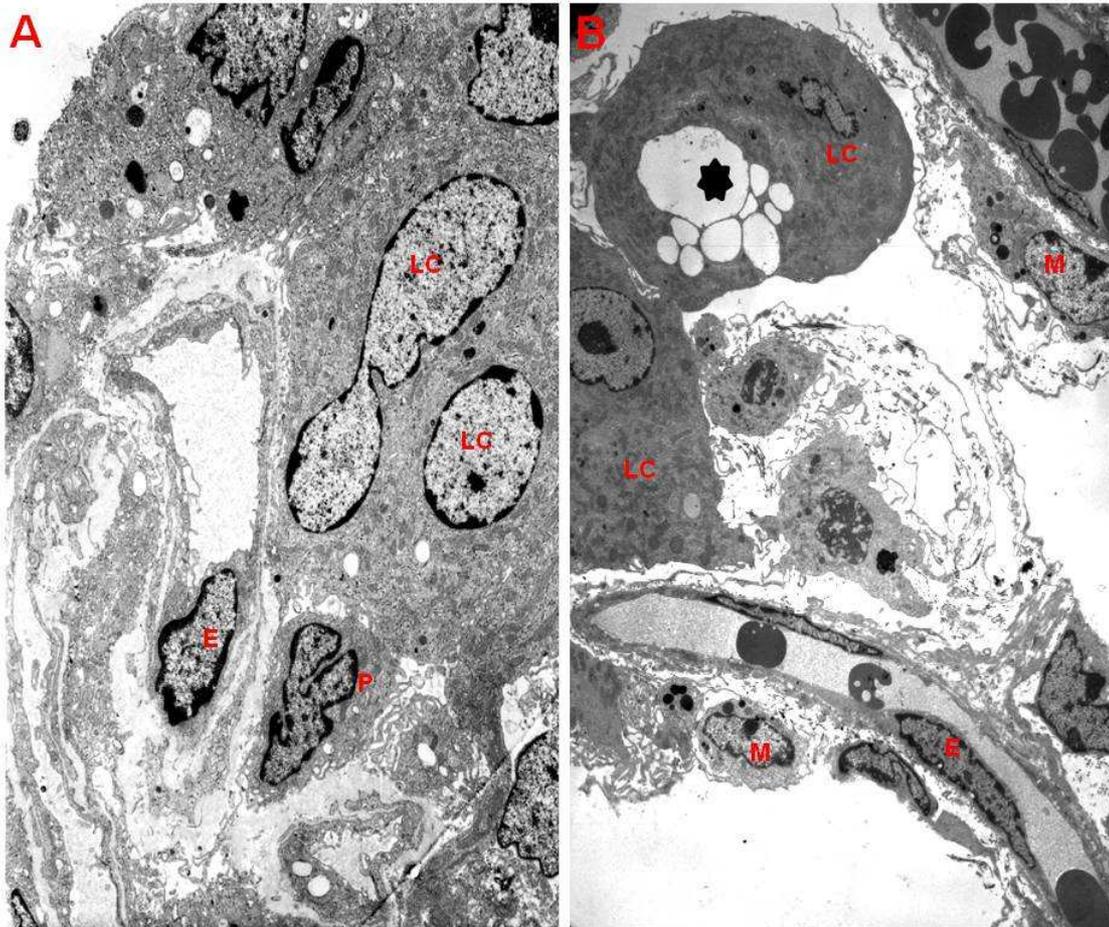


Figura 12. A) Ultraestructura del intersticio testicular de un animal de 6 meses. Las células de Leydig (LC) forman agrupaciones que rodean a los vasos sanguíneos revestidos por células endoteliales (E) y pericitos (P). B) Intersticio testicular de un animal de 24 meses. La organización celular es similar a la de 6 meses. Células de Leydig (LC) con vacuolas lipídicas en su citoplasma (asterisco), macrófago (M) y células endoteliales (E) que revisten la luz del vaso sanguíneo. A) X3150; B) X2500.

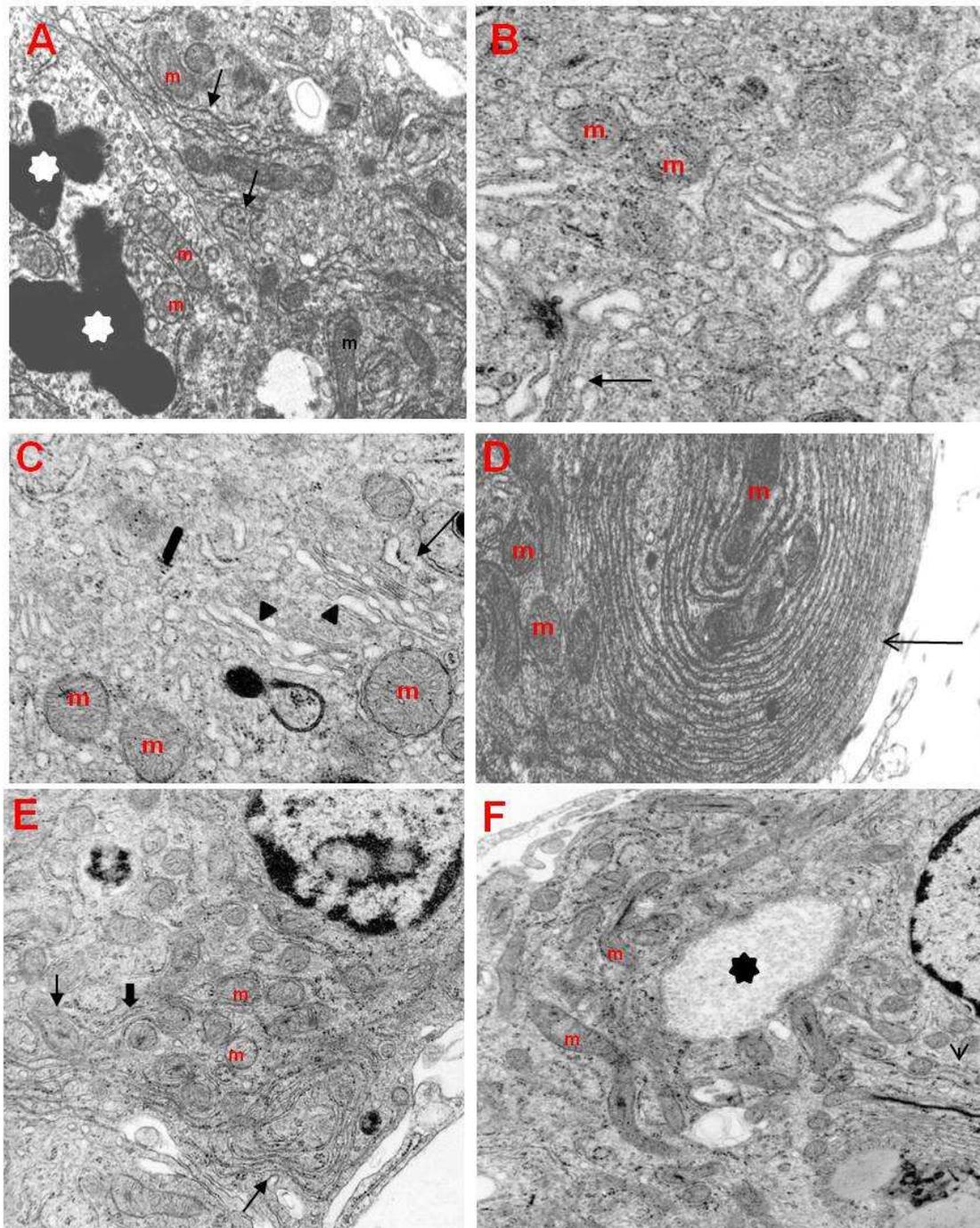


Figura 13. Detalle del citoplasma de célula de Leydig de animales de 24 meses (A, B, C, D y F) y 6 meses (E). A-F). Se observa abundante retículo endoplasmático liso (flecha fina) en forma de cisternas largas y paralelas y pequeños túbulos cortos. Las mitocondrias (m) son filamentosas o redondeadas y pueden estar dispersas por todo el citoplasma (A-C) o en las proximidades del núcleo (E y F). Vacuolas (asterisco negro). Aparato de Golgi (punta de flecha), retículo endoplasmático rugoso (flecha gruesa) y gránulos de lipofucsina (asterisco blanco). A) X3150; B) X7500; C) X7000; D) X4000; E) X4000; F) X4000.

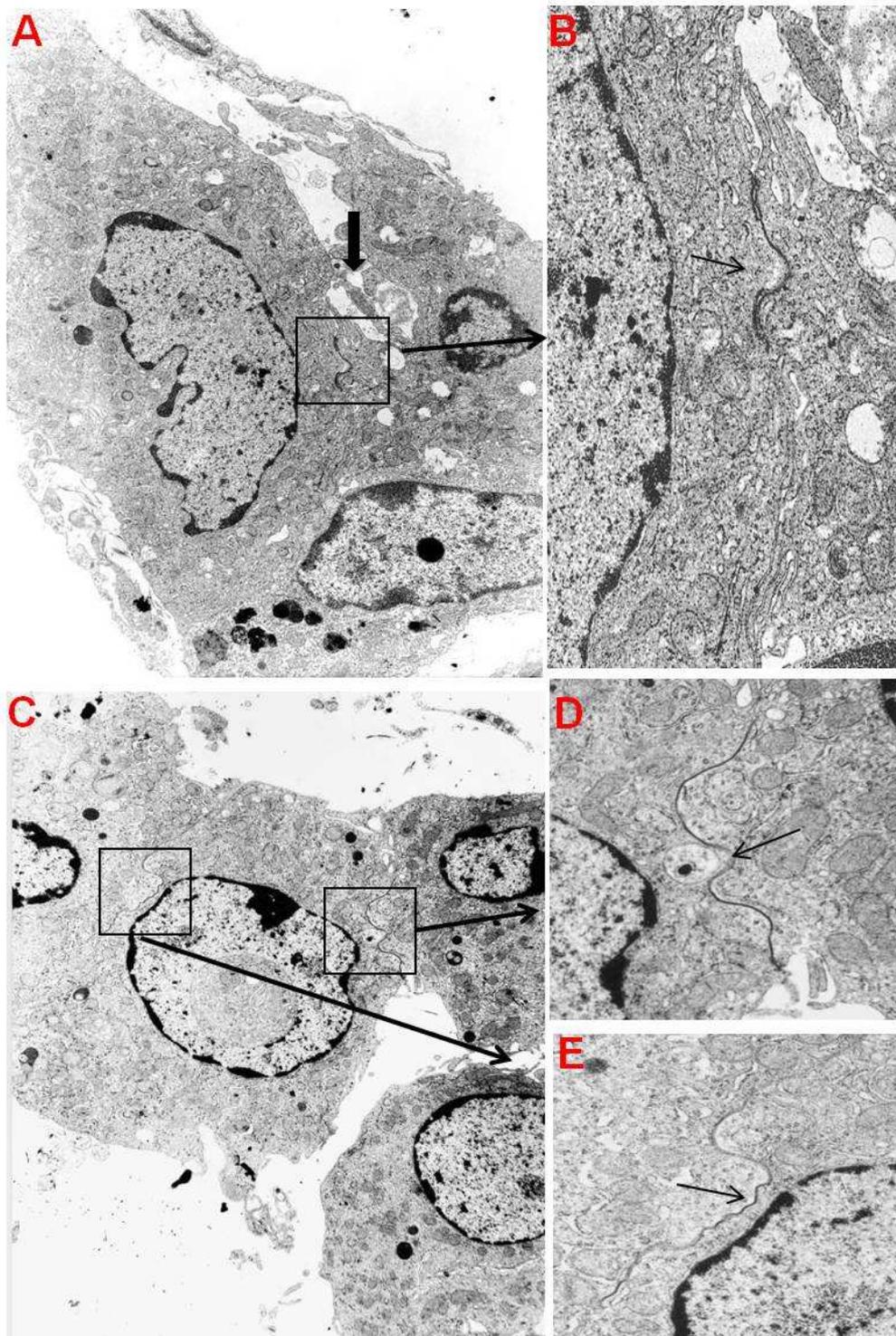


Figura 14. A-F) Ultraestructura de células de Leydig de animales de 24 meses. Se observan prolongaciones de la membrana plasmática que establecen contacto con la membrana plasmática de otra célula de Leydig mediante interdigitaciones (flecha gruesa) (A) así como uniones GAP (cuadrados) (A y C) y detalles en (B, D y E) (flecha fina) (B) entre las membranas citoplasmáticas de dos células de Leydig contiguas y contactos entre célula de Leydig y macrófago (flecha hueca) (C) . A) x3150; B) X8100; C) X2500; D) X5147; E) X4642.

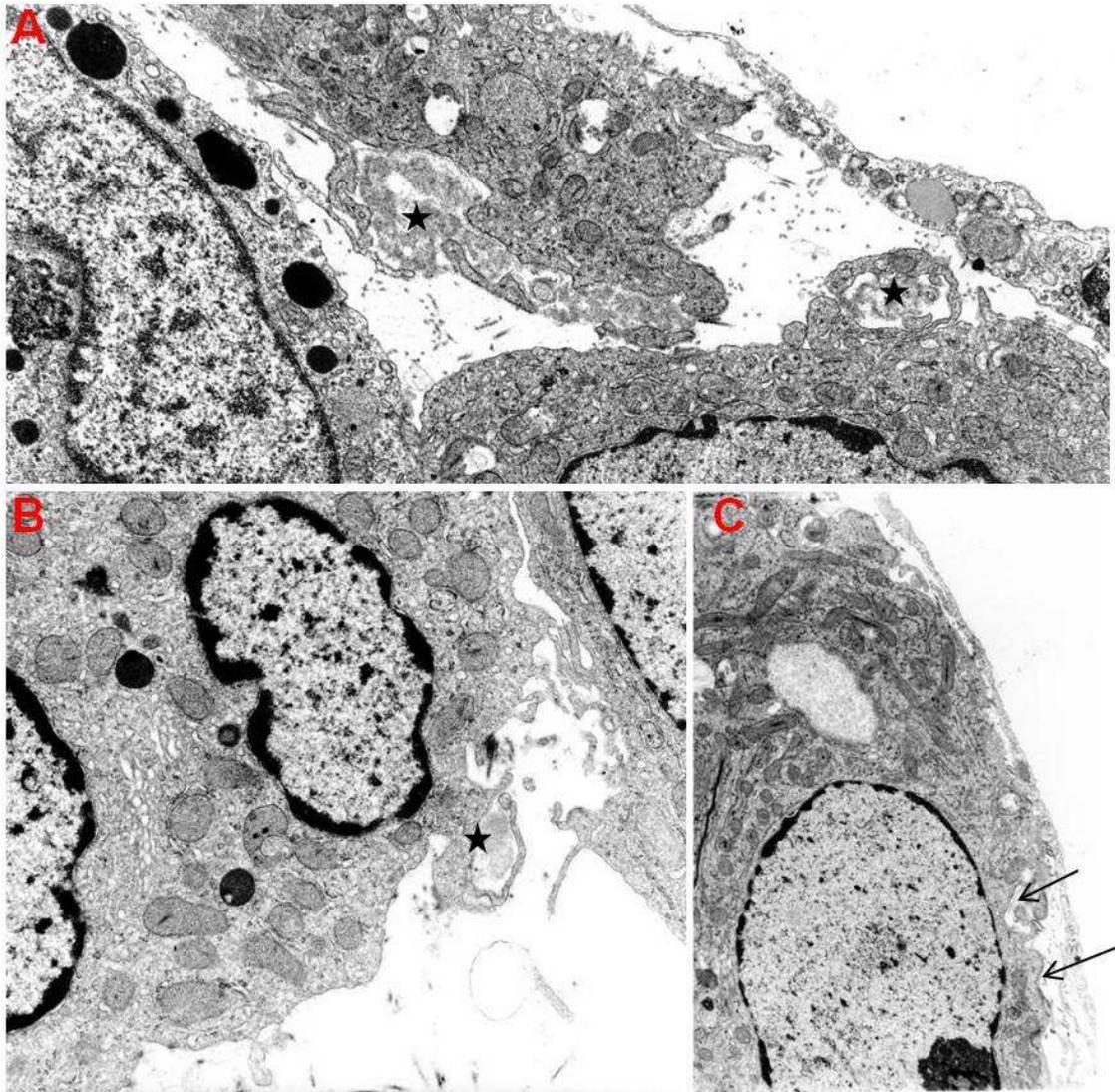


Figura 15. A-C) Ultraestructura de células de Leydig de animales de 24 meses. Se observan pequeños fragmentos de membrana basal entre las células de Leydig (asterisco) o limitando la membrana plasmática (flecha fina). **A)**X8000; **B)**X8000; **C)** X8000.

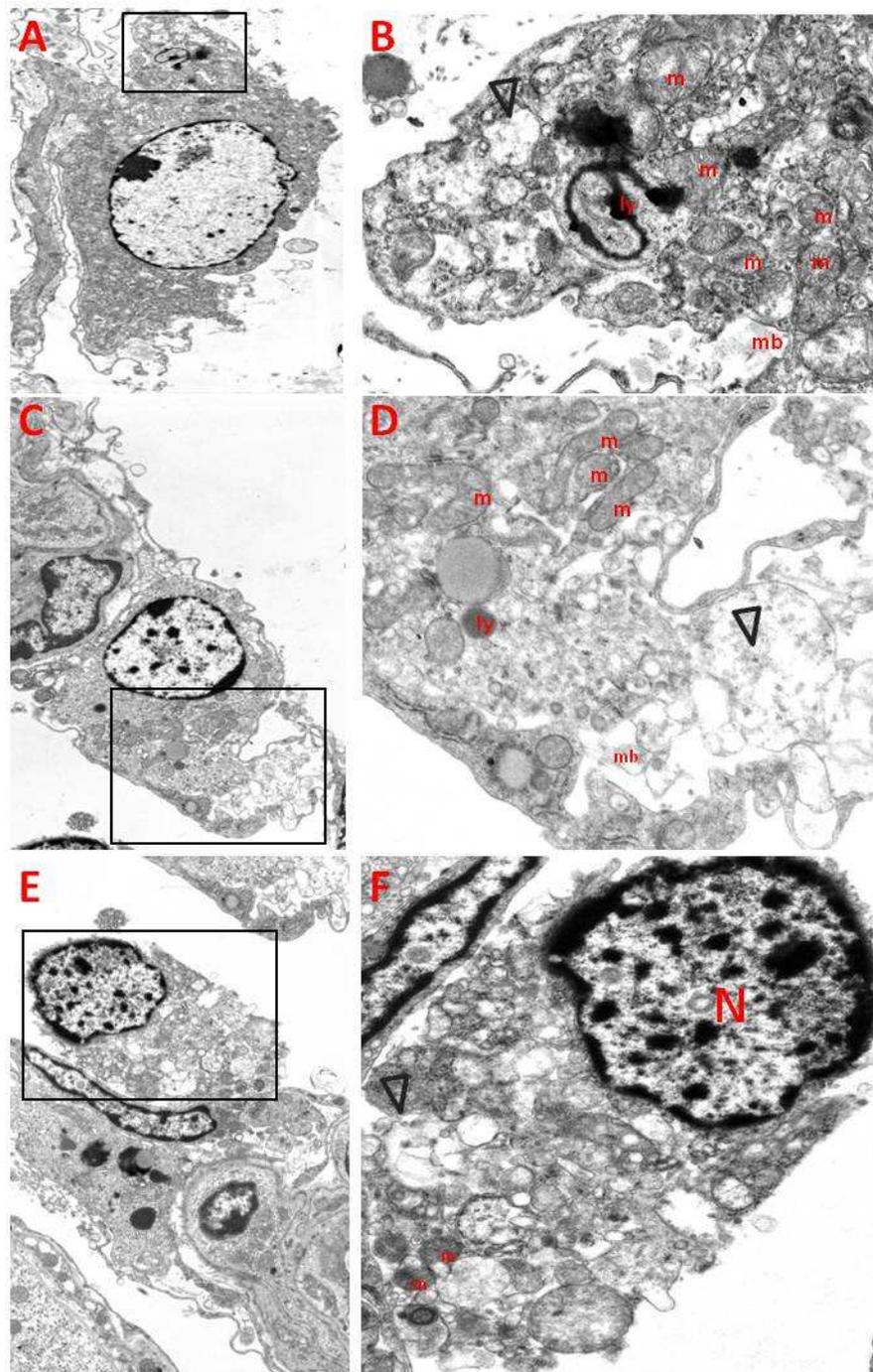


Figura 16. Ultraestructura de células de Leydig que muestran un deterioro progresivo en animales de 6 meses. **A-B)** La degeneración se inicia en la periferia del citoplasma que presenta vacuolización (punta de flecha hueca). El número de mitocondrias (m) disminuye y se observan lisosomas (ly) y restos de membrana basal (mb). **C-D)** El grado de vacuolización es mayor (punta de flecha). **E-F)** La membrana plasmática ha desaparecido y el citoplasma está más vacuolizado (punta de flecha hueca). El núcleo (N) tiene numerosos acúmulos de cromatina. **A)** X2500; **B)** X7500; **C)** X2500; **D)** X7500; **E)** X2500; **F)** X7500.

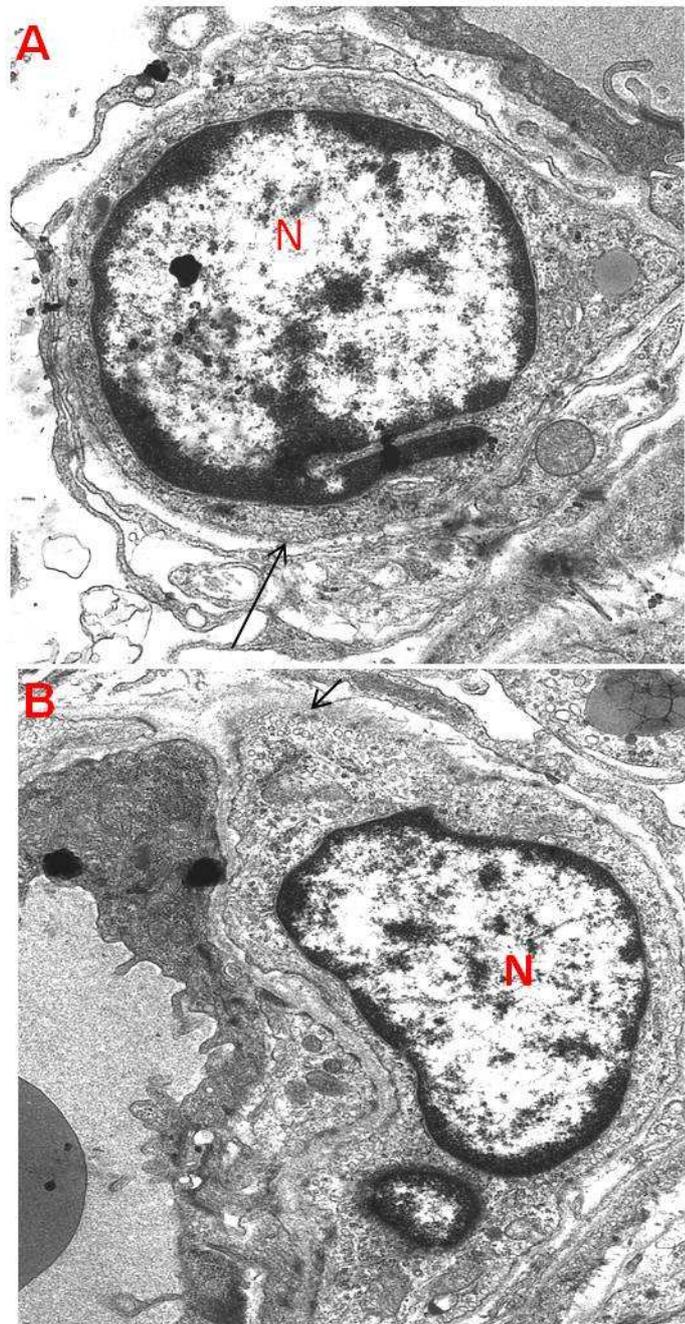


Figura 17. A) Pericito en el intersticio testicular de animales de 6 meses. **B)** Pericito en el intersticio testicular de animales de 24 meses. **A-B)** Localización perivascular de los pericitos rodeados por lámina basal (flecha). Núcleo cortado transversalmente o curvo (N) adaptándose a la forma tubular del vaso. La cantidad de citoplasma que presenta este tipo celular es pequeña. **A)** X5000; **B)** X5000.

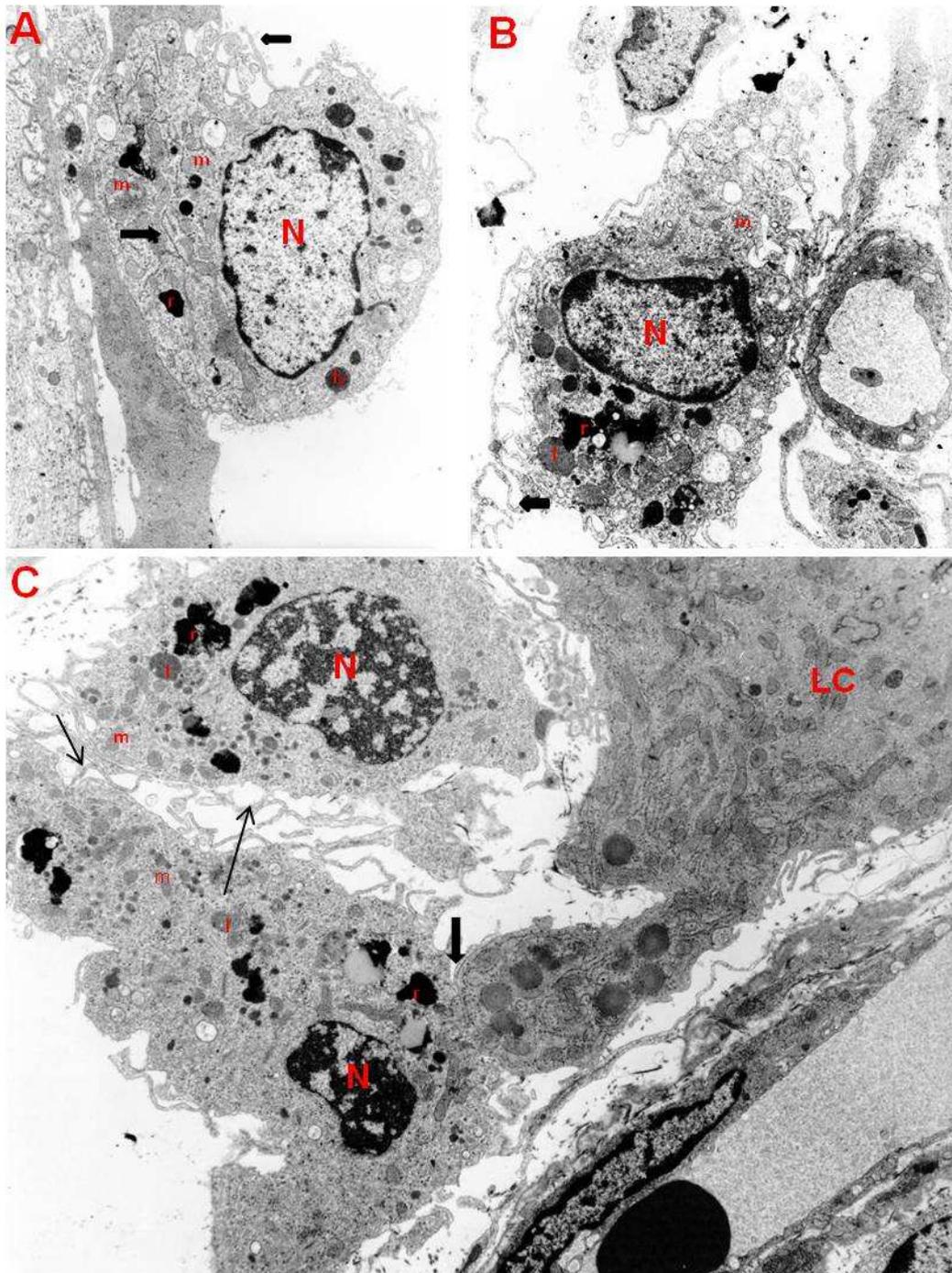


Figura 18. A-C) Ultraestructura de los macrófagos en animales de 24 meses. Se puede apreciar el núcleo (N) ligeramente arriñonado. En el citoplasma, hay lisosomas (ly), cuerpos residuales (r), lípidos (l) y escasas mitocondrias (m). Las prolongaciones citoplasmáticas unen a los macrófagos entre sí (flecha fina). Hay contactos con las células de Leydig próximas (flecha gruesa). **A)** X4000; **B)** X4000; **C)** X2500.

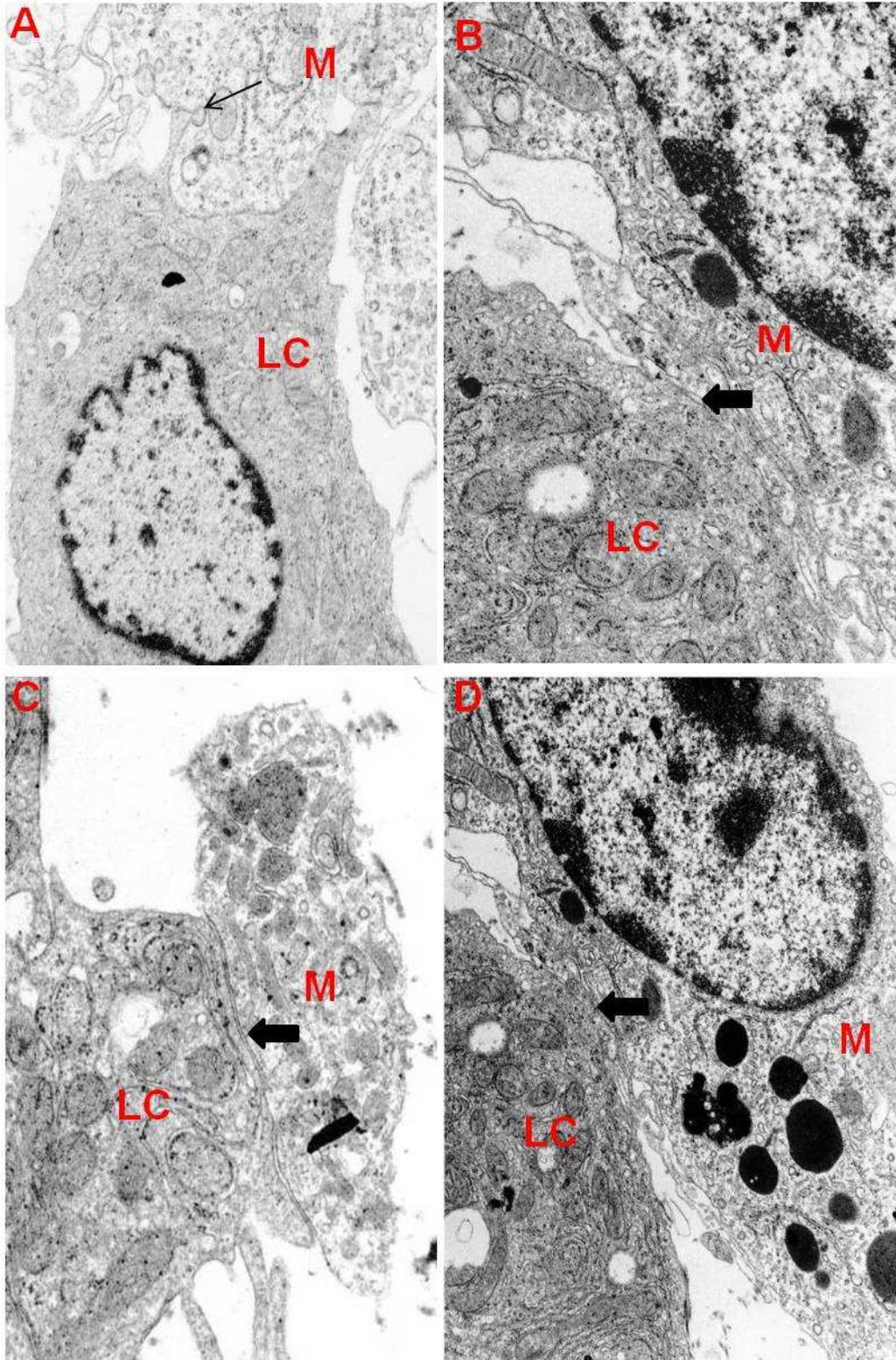


Figura 19. A-D) Células intersticiales de hámster de 24 meses. La unión entre el macrófago (M) y la célula de Leydig (LC) tiene lugar a través de contactos de la membrana plasmática y proyecciones citoplasmáticas procedentes de las células de Leydig que interdigitan con las invaginaciones citoplasmáticas de los macrófagos (flecha fina). Contactos membrana-membrana entre dos células de Leydig (flecha gruesa). **A)** X4000; **B)** X9000; **C)** X9000; **D)** X5000.

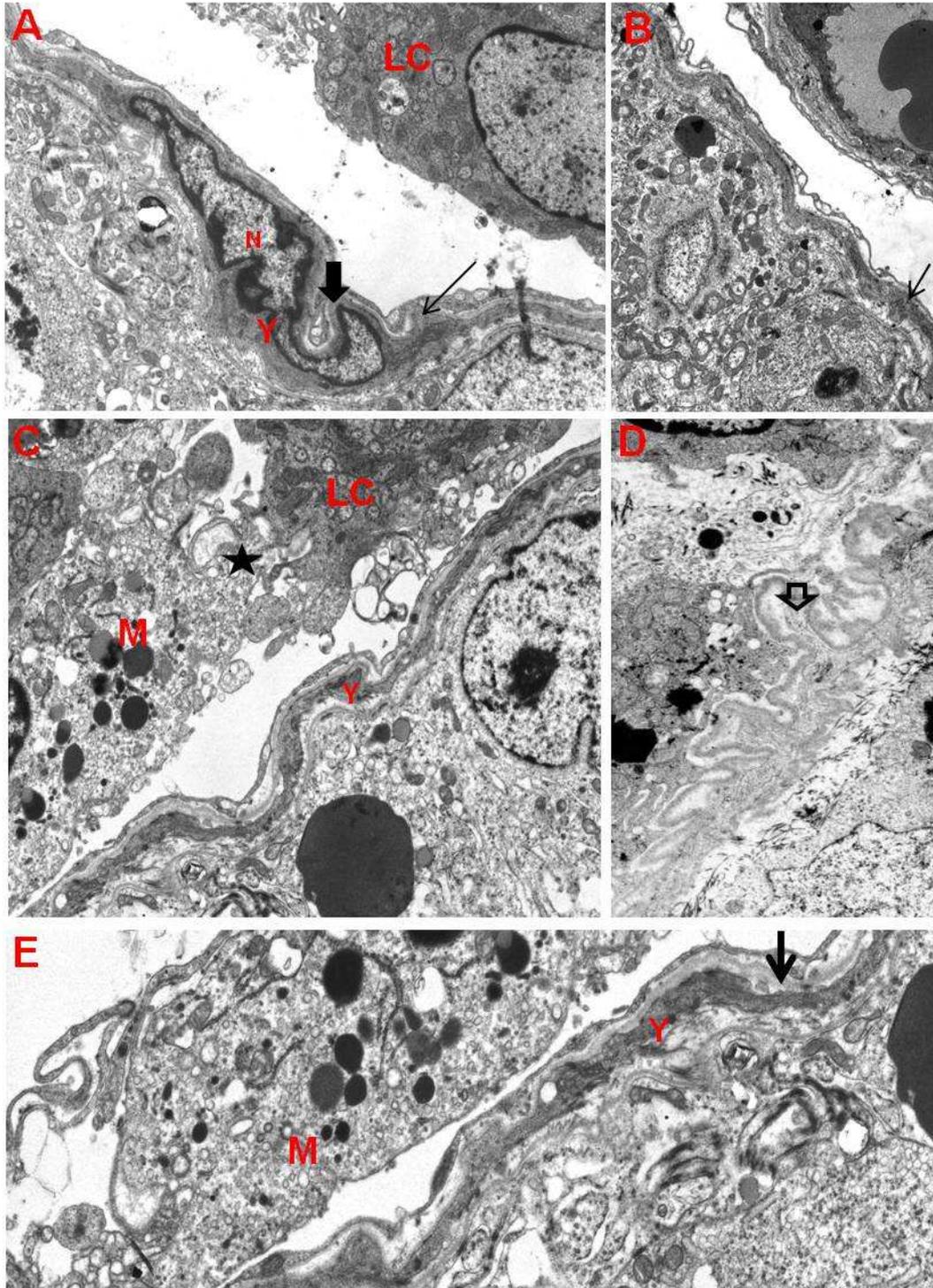


Figura 20. Ultraestructura de la célula mioide en animales de 6 meses (A, B, C y E) y 24 meses (D). La célula mioide (Y) tiene un núcleo (N) alargado, adaptado a la pared tubular y en posición central (flecha gruesa) (A). En la delgada franja de citoplasma hay vesículas de pinocitosis (flecha fina) (A y B). Junto a la célula mioide se pueden observar interdigitaciones entre un macrófago (M) y una célula de Leydig (LC) (asterisco) (C). La membrana basal recubre toda la superficie de la célula (flecha) (E). En animales envejecidos la membrana basal se hace más irregular (D). A) X8333; B) X8333; C) X7900; D) X8000; E) X7900.

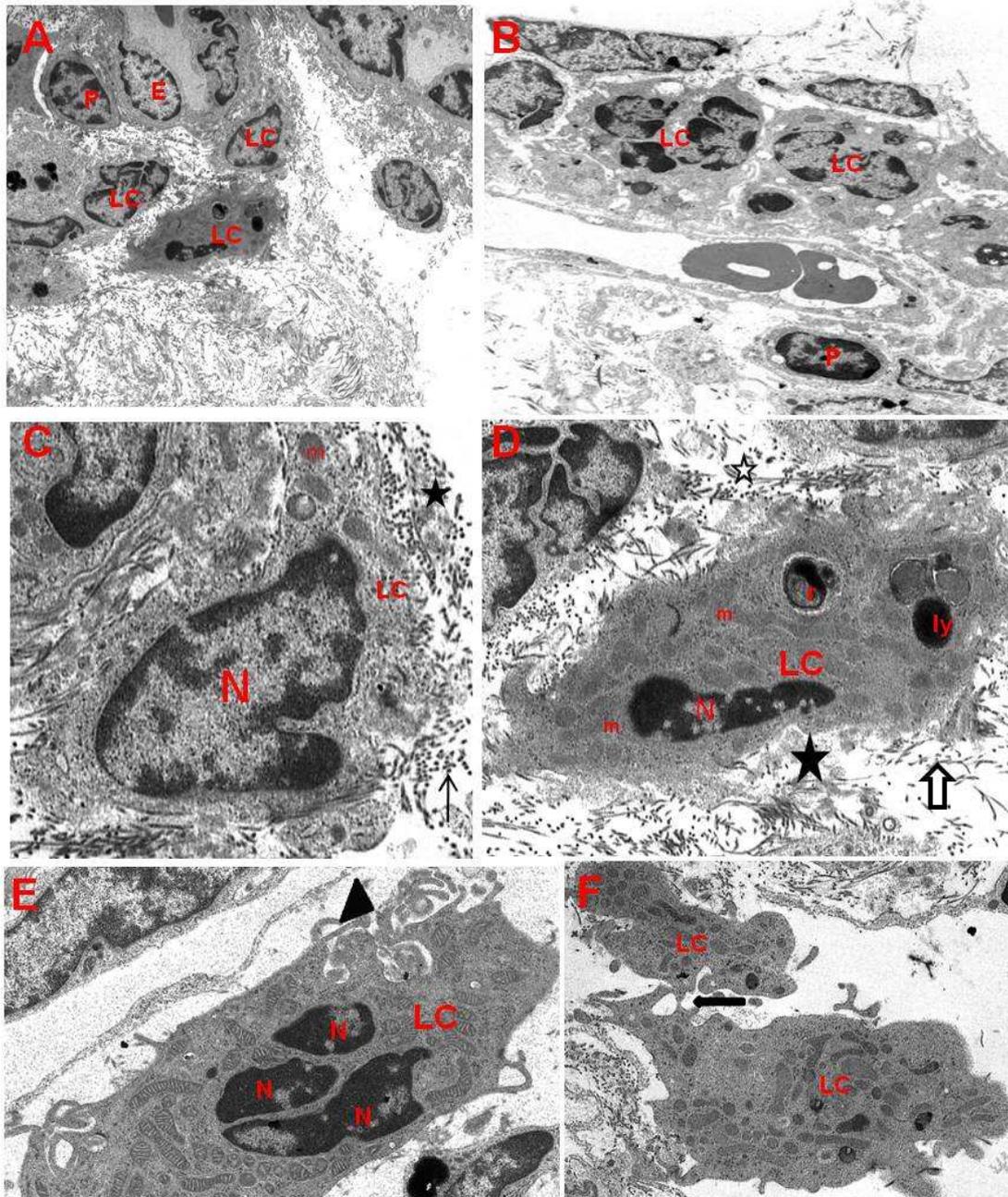


Figura 21. A-F) Ultraestructura de la célula de Leydig en animales sometidos a fotoperiodo corto con testículo totalmente regresado. **A-B)** Se aprecia un mayor número de células de Leydig (LC) por área, su tamaño es menor. Estas células se agrupan alrededor de los vasos sanguíneos en cuya pared están las células endoteliales (E) y los pericitos (P) cuya morfología es similar a la observada en los animales no regresados. El núcleo (N) de la célula de Leydig aparece lobulado con la cromatina más condensada (**C, D y E**). **C y D)** Se observan restos de membrana basal (asterisco) y fibras de colágeno (flecha hueca) en la matriz extracelular. En el citoplasma de la célula de Leydig se encuentran mitocondrias (m), lisosomas (ly) y cuerpos residuales (r). Las células de Leydig muestran prolongaciones citoplasmáticas aisladas (punta de flecha) (**E**) y contactos entre ellas (flecha gruesa) (**F**). **A)** X2500; **B)** X2500; **D)** X7500; **E)** X3500; **F)** X4183.

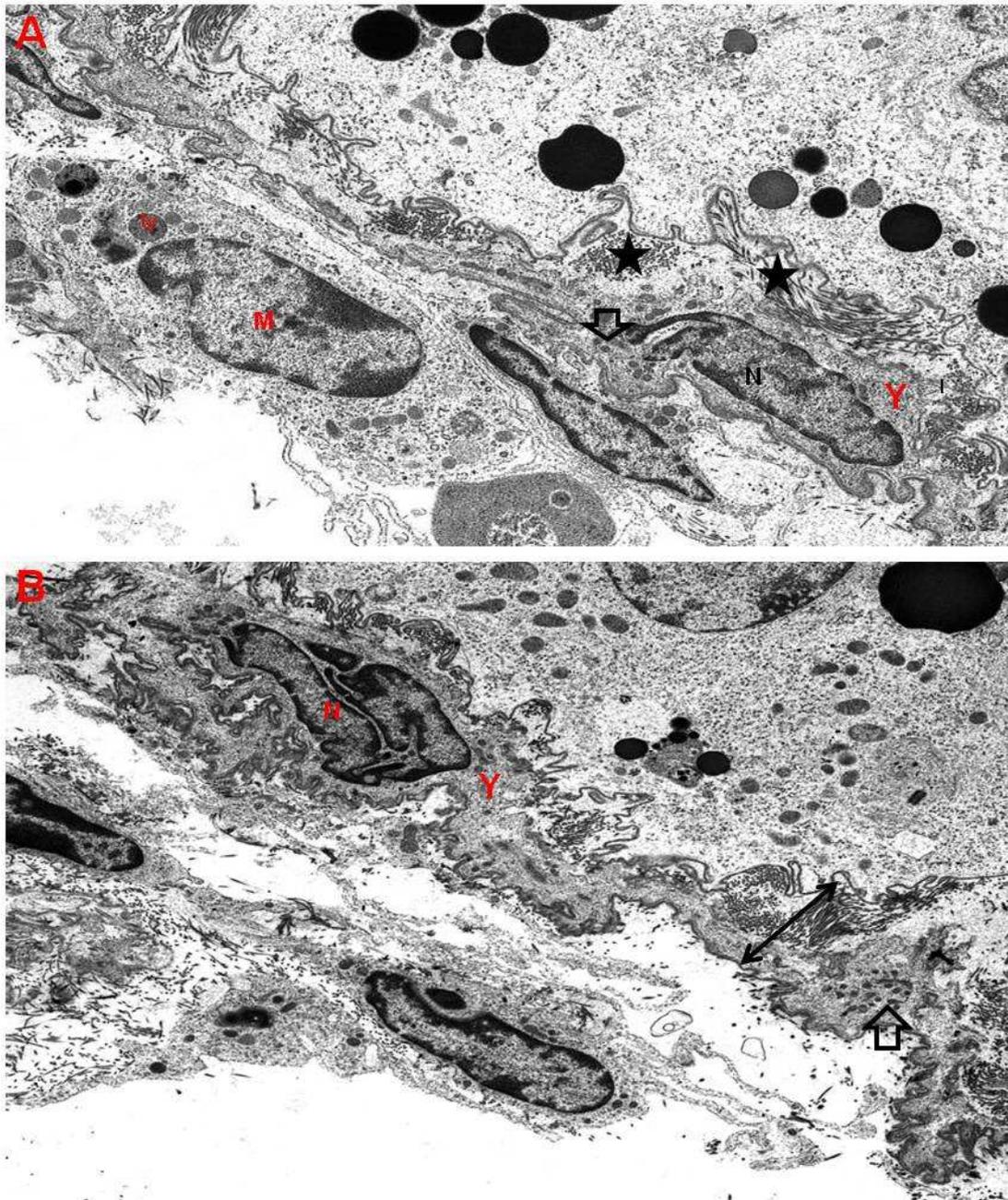


Figura 22. Intersticio testicular de animales sometidos a fotoperiodo corto. **A-B)** Células mioides (Y) rodeando al túbulo seminífero, mostrando un perfil ondulado. El núcleo (N) es indentado y los orgánulos celulares se agrupan en los extremos del citoplasma (flecha hueca). Restos de colágeno (asterisco) Macrófago (M). Engrosamiento de la lámina propia (flecha doble). **A)** X5108; **B)** X5108.

4.2.-RESULTADOS SEMICUANTITATIVOS

4.2.1.-Porcentaje de células intersticiales

El porcentaje de células en animales de 6 meses fue: células de Leydig (74.82 ± 1.59), pericitos (24.25 ± 1.63), macrófagos (0.91 ± 0.29). En animales de 12 meses: células de Leydig (78.04 ± 1.59), pericitos (20.13 ± 1.63), macrófagos (1.82 ± 0.29). En animales de 24 meses: célula de Leydig (71.63 ± 1.70), pericitos (26.99 ± 1.74), macrófagos (1.37 ± 0.31). En animales con testículo regresado fue: células de Leydig ($82,46 \pm 0,68$), pericitos ($16,29 \pm 0,75$), macrófagos ($1,21 \pm 0,19$).

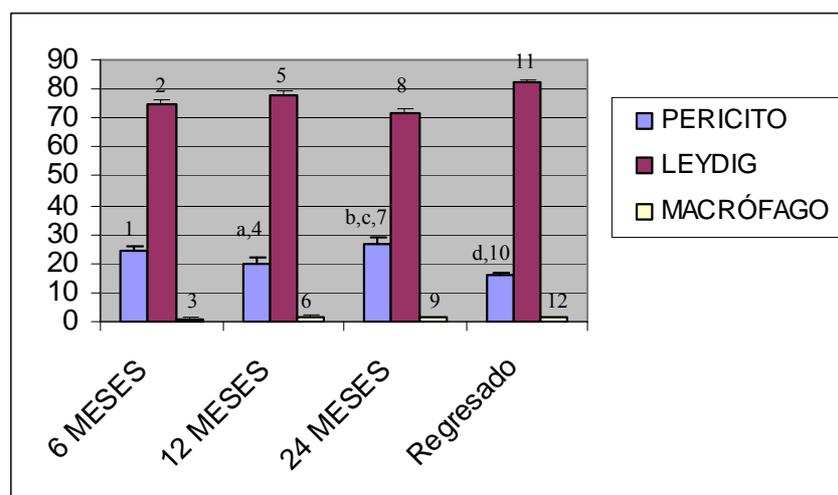
Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje celular de pericitos en animales de 12 y 24 meses, siendo este último mayor ($p < 0,05$). También hubo diferencias significativas en el porcentaje de pericitos entre animales con testículo regresado y animales de 24 meses, siendo este mayor ($p < 0,05$) (Tabla 1 y Gráfica 1).

Se observaron diferencias significativas entre todos los tipos celulares y estas diferencias varían con la edad ($p < 0.05$) (Tabla 1 y Gráfica 1). Siendo las células de Leydig las más abundantes significativamente en los tres grupos, seguida de los pericitos y por último los macrófagos ($p < 0.05$). Este orden se mantuvo en todas las edades y en el testículo regresado (Tabla 1 y Gráfica 1).

Tabla 1. Valores medios de la relación porcentual de pericitos, células de Leydig y macrófagos en animales de 6, 12, 24 meses y animales con testículo regresado.

	6 MESES	12 MESES	24 MESES	REGRESADO
Porcentaje celular de pericitos	¹ 24,25±1,63	^{a,4} 20,13±1,63	^{b,c,7} 26,99±1,74	^{d,10} 16,29±0,75
Porcentaje celular de células de Leydig	² 74,82±1,59	⁵ 78,04±1,59	⁸ 71,63±1,70	¹¹ 82,46±0,68
Porcentaje celular de macrófagos	³ 0,91±0,29	⁶ 1,82±0,29	⁹ 1,37±0,31	¹² 1,21±0,19

Gráfica 1. Relación porcentual de pericitos, células de Leydig y macrófagos en animales de 6, 12, 24 meses y animales con el testículo totalmente regresado.



^{a,b}Diferencias significativas en el porcentaje celular de pericitos entre animales de 12 y 24 meses ($p < 0,05$)

^{c,d}Diferencias significativas en el porcentaje celular de pericitos entre animales de 24 meses y animales con testículo regresado ($p < 0,05$).

^{1,2,3}Diferencias significativas entre el porcentaje de pericitos, células de Leydig y macrófagos en animales de 6 meses ($p < 0,05$).

^{4,5,6}Diferencias significativas entre el porcentaje de pericitos, células de Leydig y macrófagos en animales de 12 meses ($p < 0,05$).

^{7,8,9}Diferencias significativas entre el porcentaje de pericitos, células de Leydig y macrófagos en animales de 24 meses ($p < 0,05$).

^{10,11,12}Diferencias significativas entre el porcentaje de pericitos, células de Leydig y macrófagos en animales con testículo regresado ($p < 0,05$).

4.2.2.-Porcentaje de los tipos de células de Leydig observadas: A y B.

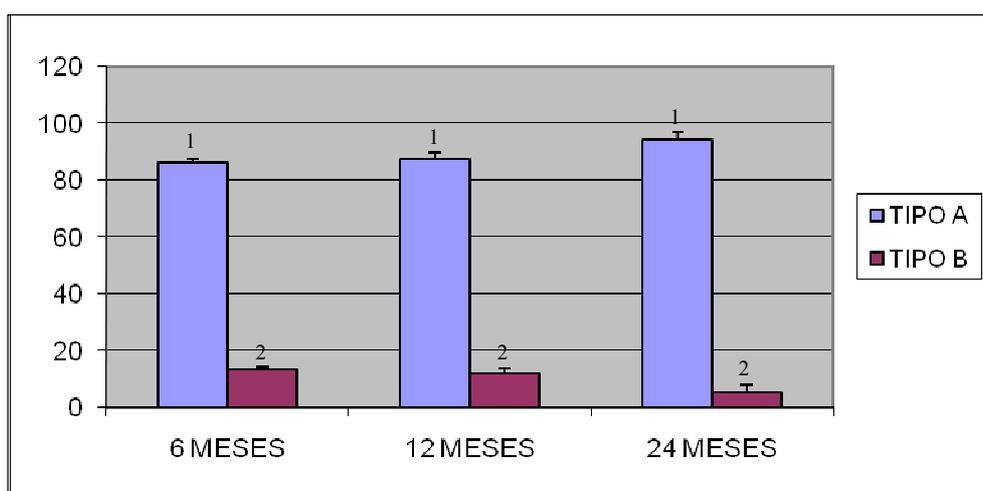
Para el porcentaje de células de Leydig de tipo A los valores medios fueron: $86,51 \pm 0,94$ (6 meses), $87,82 \pm 2,00$ (12 meses), $94,41 \pm 2,41$ (24 meses). Los valores medios del porcentaje de células de Leydig de tipo B fueron: $13,46 \pm 0,94$ (6 meses), $11,98 \pm 1,99$ (12 meses), $5,56 \pm 2,40$ (24 meses).

Se observaron diferencias significativas entre el porcentaje celular de las células de Leydig de tipo A y el porcentaje celular de las células de tipo B en los tres grupos estudiados siendo siempre menor el porcentaje de células de Leydig de tipo B ($p < 0,05$) (Tabla 2 y Gráfica 2).

Tabla 2: Valores medios del porcentaje de células de Leydig de tipo A y de tipo B en animales de 6, 12 y 24 meses.

	6 MESES	12 MESES	24 MESES
TIPO A	¹ $86,51 \pm 0,94$	¹ $87,82 \pm 2$	¹ $94,41 \pm 2,41$
TIPO B	² $13,46 \pm 0,94$	² $11,98 \pm 1,99$	² $5,56 \pm 2,4$

Gráfica 2: Porcentaje de células de Leydig de tipo A y B en animales de 6, 12 y 24 meses.



^{1,2}Diferencias significativas entre el porcentaje de células de Leydig de tipo A y el porcentaje de células de Leydig de tipo B para los tres grupos de animales estudiados ($p < 0,05$)

4.2.3.-Índice de la actividad proliferativa (PCNA positivo) de células intersticiales: célula de Leydig, pericito y célula mioide.

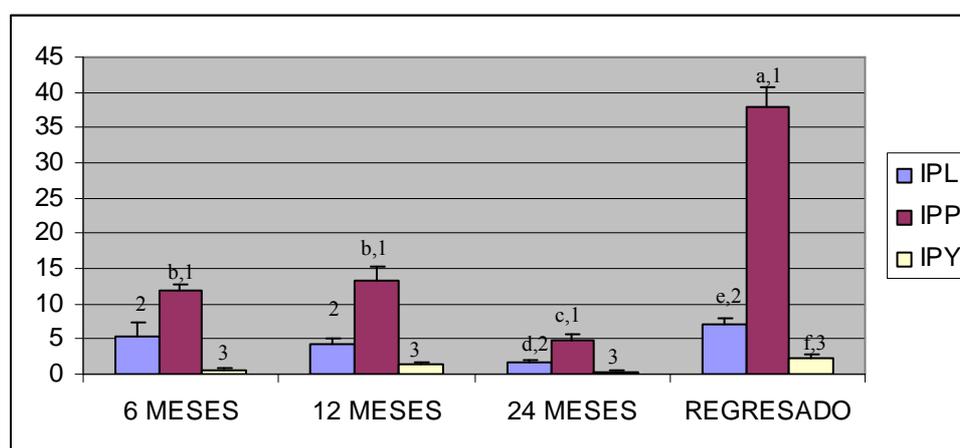
Para el índice de proliferación los valores medios obtenidos fueron: células de Leydig (IP_L): 5.50 ± 1.74 , pericitos (IP_P): 11.82 ± 0.81 , células mioides (IP_Y): 0.6 ± 0.36 en animales de 6 meses. IP_L : 4.34 ± 0.79 , IP_P : 13.25 ± 2.13 , IP_Y : 1.28 ± 0.40 en animales de 12 meses. IP_L : 1.7 ± 0.37 , IP_P : 4.77 ± 0.86 , IP_Y : 0.37 ± 0.24 en animales de 24 meses. IP_L : 7.05 ± 0.84 , IP_P : 37.85 ± 2.88 , IP_Y : 2.13 ± 0.62 en animales sometidos a fotoperiodo corto con testículo regresado (Tabla 3 y Gráfica 3).

Se observaron diferencias significativas en el índice de proliferación de pericitos en animales de 6, 12 y 24 meses frente a los animales con testículo regresado ($p < 0.05$) siendo mayor en este último grupo. La actividad proliferativa de los pericitos fue mayor en todas los grupos estudiados que la de las células de Leydig ($p < 0.05$). También se encontraron diferencias significativas en el índice de proliferación de pericitos entre 6 y 12 meses frente a 24 meses, siendo en este último grupo menor ($p < 0.05$). El índice de proliferación de células de Leydig fue significativamente diferente entre animales con testículo regresado y animales de 24 meses siendo este menor. Además el índice de proliferación de células mioides fue menor en animales de 6, 12 y 24 meses frente a los animales sometidos a fotoperiodo corto. La actividad proliferativa de los pericitos fue mayor en todas los grupos estudiados que la de las células mioides ($p < 0.05$). (Tabla 3 y Gráfica 3).

Tabla 3. Valores medios del índice de proliferación en los tipos celulares estudiados en animales de 6, 12, 24 meses y animales con testículo regresado.

	6 MESES	12 MESES	24 MESES	REGRESADO
Índice de proliferación de células de Leydig	² 5,50±1,74	² 4,34±0,79	^{d,2} 1,7±0,37	^{e,2} 7,05±0,84
Índice de proliferación de pericitos	^{b,1} 11,82±0,81	^{b,1} 13,25±2,13	^{c,1} 4,77±0,86	^{a,1} 37,85±2,88
Índice de proliferación de células mioides	³ 0,6±0,36	³ 1,28±0,40	³ 0,37±0,24	^{f,3} 2,13±0,62

Gráfica 3. Índice de proliferación de células de Leydig (IP_L), pericitos (IP_P) y células mioides (IP_Y) en animales de 6, 12, 24 meses y animales con testículo regresado.



^aDiferencias significativas en el IP_P de 6, 12, 24 meses frente a animales con testículo regresado ($p < 0,05$)

^{b,c}Diferencias significativas en el IP_P de animales de 6,12 frente a 24 meses ($p < 0,05$)

^{d,e}Diferencias significativas en el IP_L entre animales de 24 meses y animales con testículo regresado ($p < 0,05$).

^fDiferencias significativas en el IP_Y entre animales de 6, 12 y 24 meses frente a animales con testículo regresado ($p < 0,05$).

^{1,2}Diferencias significativas entre el IP_P y el IP_L en todos los grupos estudiados ($p < 0,05$).

³Diferencias significativas entre el IP_P y el IP_Y en todos los grupos estudiados ($p < 0,05$).

4.2.4.-Índice de apoptosis (TUNEL positivo) de células intersticiales: célula de Leydig, pericito y célula mioide.

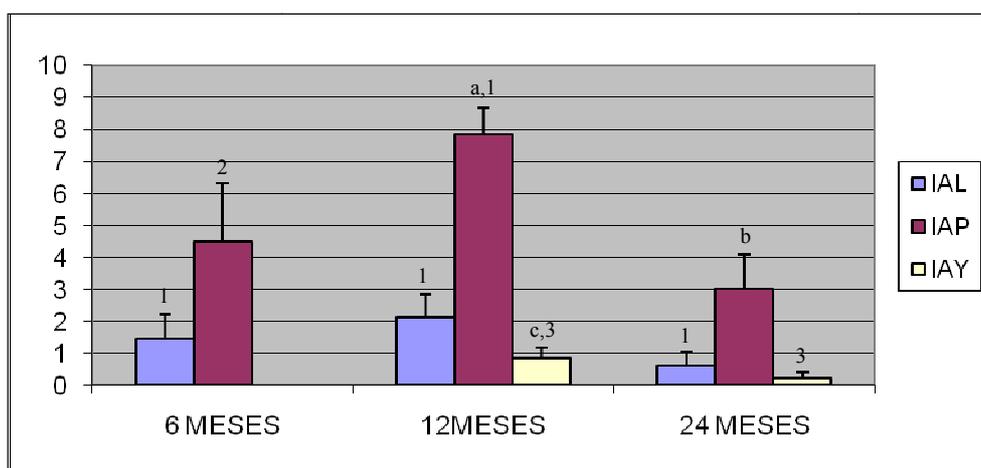
El índice de apoptosis en nuestra población de estudio mostró los siguientes valores medios para la célula de Leydig (IA_L): 1.47 ± 0.76 , pericito (IA_P): 4.50 ± 1.81 , célula mioide (IA_Y): 0 en animales de 6 meses, IA_L : 2.12 ± 0.73 , IA_P : 7.83 ± 0.87 , IA_Y : 0.86 ± 0.33 en animales de 12 meses y IA_L : 0.6 ± 0.45 , IA_P : 3 ± 1.07 , IA_Y : 0.21 ± 0.21 en animales de 24 meses. (Tabla 4 y Gráfica 4). No se ha observado células apoptóticas en animales con testículo totalmente regresado.

Las diferencias significativas en el índice de apoptosis de pericitos las encontramos entre animales de 12 y 24 meses ($p < 0.05$) siendo menor en este último grupo (Tabla 4 y Gráfica 4). Entre los índices de apoptosis de pericitos y células de Leydig no se obtuvo diferencias significativas en los grupos estudiados. El índice de apoptosis de las células mioides fue mayor en los animales de 12 meses que en los animales de 6 y 24 meses ($p < 0.05$) (Tabla 4 y Gráfica 4)

Tabla 4. Valores medios del índice de apoptosis en los tipos celulares estudiados en animales de 6 12 y 24 meses.

	6 MESES	12 MESES	24 MESES
Índice de apoptosis de células de Leydig	¹ 1,47±0,76	¹ 2,12±0,73	¹ 0,6±0,45
Índice de apoptosis de pericitos	² 4,50±1,81	^{a,2} 7,83±0,87	^{b,2} 3±1,07
Índice de apoptosis de células mioides	0	^{c,3} 0,86±0,33	³ 0,21±0,21

Gráfica 4. Índice de apoptosis de células de Leydig (IA_L), pericitos (IA_P) y células mioides (IA_Y) en animales de 6, 12 y 24 meses.



^{a,b}Diferencias significativas en el IA_P entre animales de 12 meses y 24 meses ($p < 0,05$).

^cDiferencias significativas en el IA_Y entre animales de 6 y 24 meses frente a animales de 12 meses ($p < 0,05$).

4.2.5.-Índice de células de Leydig positivas a testosterona.

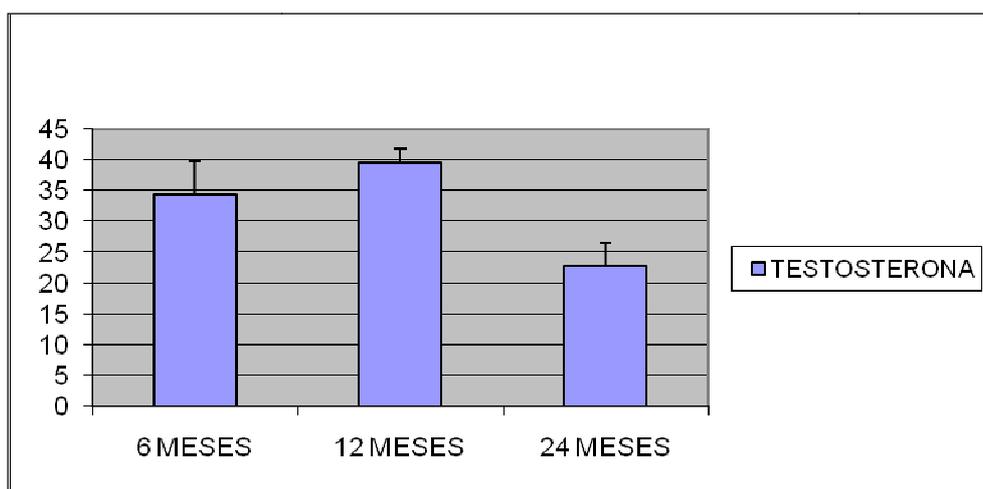
No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células de Leydig positivas a testosterona en los grupos estudiados aunque fue menor en el grupo de 24 meses (Tabla 5 y Gráfica 5).

Para el índice de células de Leydig positivas a testosterona los valores medios obtenidos fueron: $34,46 \pm 5,34$ (6 meses), $39,62 \pm 2,14$ (12 meses), $22,73 \pm 3,72$ (24 meses).

Tabla 5: Porcentaje de células de Leydig positivas a testosterona en animales de 6, 12 y 24 meses.

TESTOSTERONA	
6 MESES	$34,46 \pm 5,34$
12 MESES	$39,62 \pm 2,14$
24 MESES	$22,73 \pm 3,72$

Gráfica 5: Porcentaje de células de Leydig positivas a testosterona en animales de 6, 12 y 24 meses.



4.2.6.- Índice de positividad a testosterona de células de Leydig de tipo A y de tipo B.

Los valores medios del porcentaje de células de Leydig de tipo A positivas a la hormona testosterona fueron: $47,34 \pm 19,35$ (6 meses), $36,08 \pm 2,44$ (12 meses), $26,69 \pm 6,25$ (24 meses).

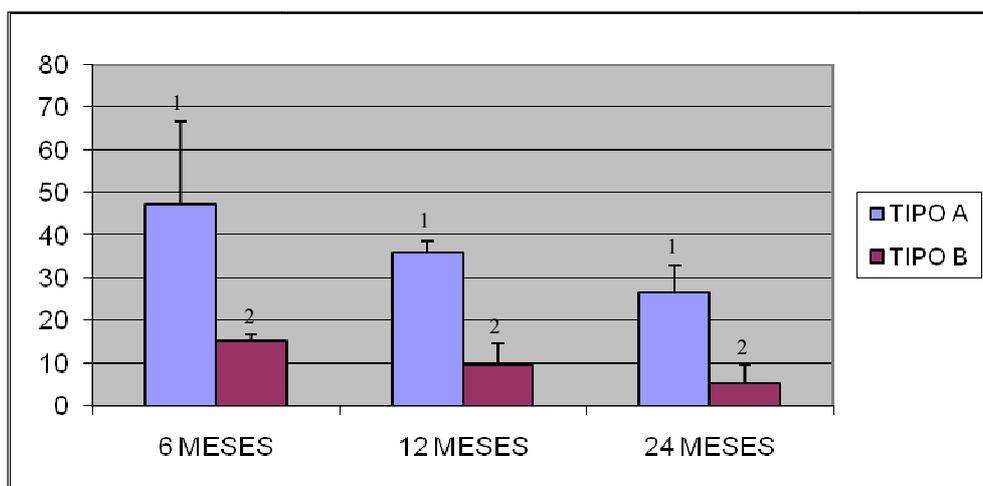
Para el porcentaje de células de Leydig de tipo B positivas a la hormona testosterona los valores medios fueron: $15,22 \pm 1,43$ (6 meses), $9,68 \pm 4,82$ (12 meses), $5,36 \pm 4,06$ (24 meses).

El índice de células de Leydig de tipo A positivas a testosterona fue significativamente superior que en las células de tipo B en los tres grupos estudiados ($p < 0,05$) (Tabla 6 y Gráfica 6).

Tabla 5: Valores medios del porcentaje de células de Leydig de tipo A y de tipo B positivas a testosterona en animales de 6, 12 y 24 meses.

	6 MESES	12 MESES	24 MESES
TIPO A	¹ $47,34 \pm 19,35$	¹ $36,08 \pm 2,44$	¹ $26,69 \pm 6,25$
TIPO B	² $15,22 \pm 1,43$	² $9,68 \pm 4,82$	² $5,36 \pm 4,06$

Gráfica 5: Porcentaje de células de Leydig de tipo A y B positivas a testosterona en animales de 6, 12 y 24 meses.



^{1,2}Diferencias significativas entre el porcentaje de positividad de células de Leydig de tipo A y el porcentaje de positividad de células de Leydig de tipo B en todos los grupos de estudio ($p < 0,05$).

4.2.7.-Volumen de tejido conjuntivo en animales de 6, 12 y 24 meses y animales con testículo regresado.

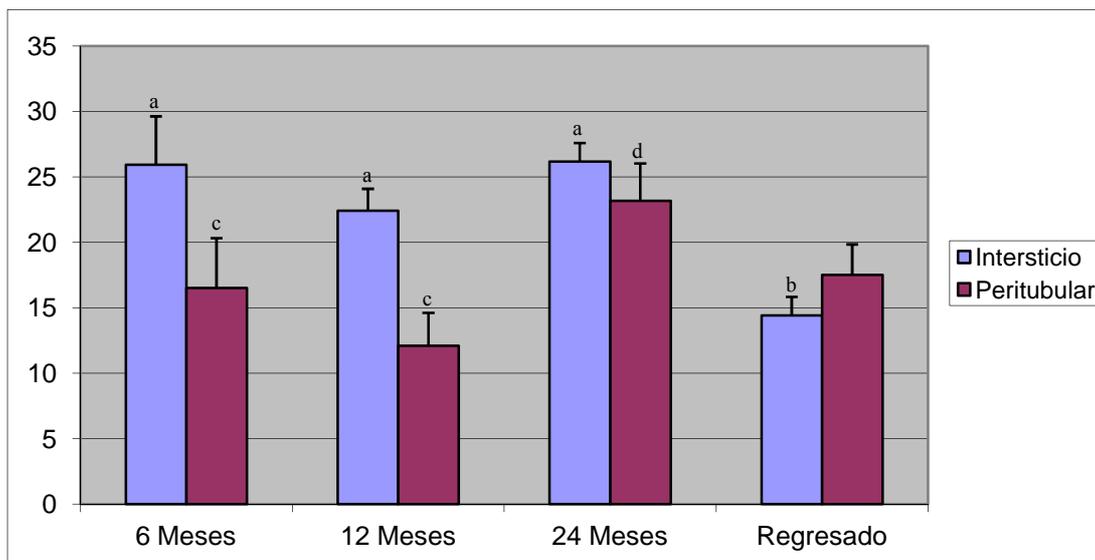
El porcentaje de tejido conjuntivo intersticial en animales de 6 meses fue $25,94 \pm 3,71$, en los animales de 12 meses $22,43 \pm 1,68$ en animales de 24 meses $26,17 \pm 1,45$ y en animales sometidos a fotoperiodo corto $14,41 \pm 1,44$. El porcentaje de tejido conjuntivo peritubular en animales de 6 meses fue $16,51 \pm 3,84$, en 12 meses $12,11 \pm 2,53$, en 24 meses $23,19 \pm 2,86$ y en animales sometidos a fotoperiodo corto $17,53 \pm 2,34$.

Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de tejido conjuntivo intersticial de animales de 6, 12 y 24 meses frente a animales sometidos a fotoperiodo corto ($p < 0,05$) (Tabla 7 y Gráfica 7). Los valores del volumen de tejido conjuntivo peritubular fueron significativamente menores en animales de 6 y 12 meses frente animales de 24 meses ($p < 0,05$) (Tabla 7 y Gráfica 7)

Tabla 7. Valores medios del porcentaje de la cantidad de tejido conjuntivo intersticial, peritubular en animales de 6, 12, 24 meses y animales con testículo regresado.

	Intersticio	Túbulo
6 Meses	^a $25,94 \pm 3,71$	^c $16,51 \pm 3,84$
12 Meses	^a $22,43 \pm 1,68$	^c $12,11 \pm 2,53$
24 Meses	^a $26,17 \pm 1,45$	^d $23,19 \pm 2,86$
Regresado	^b $14,41 \pm 1,44$	$17,53 \pm 2,34$

Gráfica 7: Porcentaje de tejido conjuntivo en animales de 6, 12 y 24 meses y animales con testículo regresado.



^{a,b}Diferencias significativas en el volumen de tejido conjuntivo intersticial de animales de 6, 12 y 24 meses frente animales sometidos a fotoperiodo corto ($p < 0.05$).

^{c,d}Diferencias significativas en el volumen de tejido conjuntivo peritubular de 6 y 12 meses frente a animales de 24 meses ($p < 0.05$).

4.2.8.-Índice de células de Leydig positivas a HSP-47

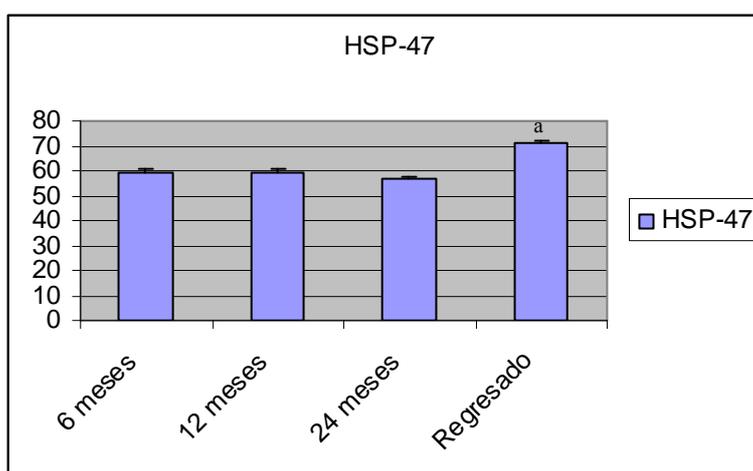
El porcentaje de células de Leydig positivas a HSP-47 en animales de 6 meses fue $59,10 \pm 1,72$, en animales de 12 meses $59,44 \pm 1,74$, en animales de 24 meses $56,84 \pm 0,96$ y en animales sometidos a fotoperiodo corto $71,05 \pm 1,17$.

Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células de Leydig positivas a HSP-47 en animales de 6, 12 y 24 meses frente a animales sometidos a fotoperiodo corto ($p < 0,05$) (Tabla 8 y Gráfica 8)

Tabla 8. Valores medios del porcentaje de la cantidad de células de Leydig positivas a HSP-47 en animales de 6, 12, 24 meses y animales sometido a fotoperiodo corto.

HSP-47	
6 Meses	59,10±1,72
12 Meses	59,44±1,74
24 Meses	56,84±0,96
Regresado	^a 71,05±1,17

Gráfica 8: Porcentaje de células de Leydig positivas a HSP-47 en animales de 6, 12, 24 meses y animales sometidos a fotoperiodo corto



^aDiferencias significativas en el porcentaje de células de Leydig positivas a HSP-47 en animales de 6, 12 y 24 meses frente a animales sometidos a fotoperiodo corto.

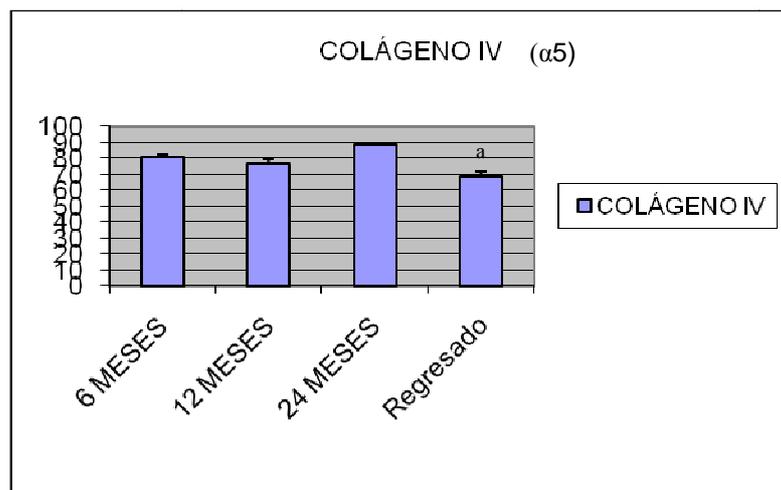
4.2.9.- Índice de células de Leydig positivas a colágeno IV ($\alpha 5$).

Para el porcentaje de células de Leydig que producen colágeno IV ($\alpha 5$) los valores medios fueron: 80,17±1,98 (6 meses), 76,59±3,24 (12 meses), 88,35±0,89 (24 meses) y 68,85±3,07 (animales sometidos a fotoperiodo corto).

Tabla 9: Valores medios del porcentaje de células de Leydig productoras de colágeno IV ($\alpha 5$) en animales de 6, 12, 24 meses y animales sometidos a fotoperiodo corto.

COLÁGENO IV ($\alpha 5$)	
6 MESES	80,17 \pm 1,98
12 MESES	76,59 \pm 3,24
24 MESES	88,35 \pm 0,89
Regresado	^a 68,85 \pm 3,07

Gráfica 9. Porcentaje de células de Leydig que producen colágeno IV ($\alpha 5$) en animales de 6, 12, 24 meses y animales sometidos a fotoperiodo corto.



^aDiferencias significativas en el porcentaje de células de Leydig positivas a colágeno IV ($\alpha 5$) en animales de 6, 12, 24 meses frente a animales sometidos a fotoperiodo corto.

5.-DISCUSIÓN

Analizando el intersticio testicular del hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) con microscopía de luz se han podido caracterizar fácilmente las células de Leydig, los pericitos, los macrófagos y las células mioides. Así mismo, se ha puesto de manifiesto la presencia de tejido conjuntivo intersticial y peritubular y de células en proliferación y apoptosis (TUNEL positivas) especialmente células de Leydig, pericitos y en ocasiones células mioides. Con respecto a las células de Leydig hemos diferenciado en base a la observación microscópica dos poblaciones que hemos denominado células de Leydig de tipo A y de tipo B con características morfológicas propias y específicas. Las que hemos denominado de tipo A, son grandes con gran cantidad de citoplasma y un núcleo sin signos aparentes de deterioro; las de tipo B son de menor tamaño y con signos de necrosis especialmente en su núcleo. Ambas poblaciones las hemos encontrado en hámsters de 6, 12 y 24 meses.

El contenido celular del intersticio testicular del hámster es muy similar al de otras muchas especies de mamíferos (Kretser y Kerr., 1988). El tejido conjuntivo es más abundante en algunas especies y es posible describirlo en las tinciones de H&E, en otras como los roedores que muestran numerosos vasos linfáticos, como es el caso del hámster, es más difícil y es necesario ponerlo de manifiesto con técnicas histoquímicas más específicas como el tricrómico de Masson u otros tricrómicos que han sido utilizados en otros estudios de intersticio testicular (Pop y cols., 2011). Igual sucede con el tejido conjuntivo de la pared tubular, en las especies que muestran varias capas de células mioides es posible identificarlo con H&E (Maekawa y cols., 1996) pero en especies con una sola capa de células mioides como ocurre en nuestro estudio ha sido útil el Tricrómico de Masson para poder diferenciarlo bien.

Los estudios de proliferación en el intersticio testicular adulto son escasos, aunque en algunos de ellos se ha descrito la proliferación de células de Leydig. Ahora bien, las células de Leydig proliferando han sido puestas de manifiesto en esos trabajos con técnicas clásicas como la timidina tritiada (Johnson y cols., 1987; Teerds y cols., 1989), siendo pocos los estudios que detectan inmunohistoquímicamente (BrdU) la proliferación de estas células (Sriraman y cols., 2000). Algo parecido pensamos que ocurre con los pericitos, que han sido estudiados en diversos modelos de regeneración (Davidoff y cols., 2009) en los cuales proliferan aunque todavía no se ha utilizado una técnica inmunohistoquímica específica para demostrarlo. Con respecto a las células mioideas la presencia de algunas de ellas en proliferación es un hecho descrito ya en otros roedores como en la rata (Santamaría y cols., 1995). La proliferación de macrófagos también se ha descrito en otras especies (Gaytan y cols., 1994; Hutson., 2006), nosotros por el contrario no hemos podido constatar en las condiciones de nuestro estudio que en su población haya signos de proliferación.

La apoptosis en el intersticio testicular de mamíferos es un fenómeno al que en condiciones normales se le ha prestado poco interés en la bibliografía. Sí es cierto que hay bastantes autores que han descrito la presencia de células de Leydig en apoptosis, éstos lo han hecho tras diversos tipos de tratamientos (Myers y Abney., 1990; Hardy y cols., 2005; Hutson., 2006) o en situaciones fisiológicas específicas (Berensztejn y cols., 2006). Con respecto a los pericitos no existen datos en la literatura que indiquen apoptosis de estas células en el intersticio testicular, por lo que nuestro resultado es novedoso al encontrar un porcentaje de las mismas como TUNEL positivas.

El hecho de observar microscópicamente dos tipos de células de Leydig nos parece relevante. En primer lugar porque todos los signos morfológicos observados con el microscopio de luz indican que las células de Leydig de tipo B más que una célula en proceso de crecimiento se trataría de una célula de Leydig en involución. En segundo lugar da la impresión de que este fenómeno de diversidad de células de Leydig no parece ser un hecho patológico, ya que hemos observado estas células en todos los grupos de edad estudiados. Como

ya se ha comentado hay diversos autores (Davidoff y cols., 2009) que perciben que la población de células de Leydig adultas no es homogénea, observando diversas diferencias entre las mismas. Algunos autores al clasificar las células intersticiales en sus estudios han confirmado la presencia de células con signos de degeneración como en el búfalo (Rana y Bilaspuri., 2000) o en el hombre (Neaves y cols., 1985; Regadera y cols., 1991).

En síntesis el intersticio testicular de hámster adulto celularmente es muy similar al de otros roedores. Este intersticio testicular muestra un grado de recambio celular importante pues tres de las cuatro células estudiadas, presentan tanto fenómenos de proliferación como de apoptosis (TUNEL positivas). Además, para el caso de las células de Leydig un cierto número de ellas muestran signos de deterioro celular importante. Estos fenómenos celulares se han observado tanto en animales jóvenes como viejos.

En animales con testículo regresado por fotoperiodo corto sólo observamos un tipo de células de Leydig diferentes a las descritas en los otros tres grupos de edad. Estas células muestran una reducción de su tamaño tanto de su núcleo como de su citoplasma. Además las células de Leydig y los pericitos sólo muestran actividad proliferativa pero no apoptótica, indicando que la situación fisiológica de la regresión debida a fotoperiodo corto supone una alteración de la dinámica celular del intersticio testicular. Probablemente durante este periodo se eliminan células de Leydig de tipo B, observándose en estos animales una población más homogénea de células de Leydig regresadas por disminución de la estimulación hormonal que tiene lugar. La situación fisiológica de regresión es diferente a la que acontece durante el envejecimiento en el intersticio y por otro lado, coincide ésta con lo que sucede en el epitelio seminífero (Morales y cols., 2004). En él las espermatogonias muestran un índice de proliferación mayor que en los controles, preparando la posterior recrudescencia. Así pues, el aumento de la proliferación de pericitos podría estar relacionado con la recrudescencia donde se necesitaría un aumento de vasos sanguíneos y quizá una generación de nuevas células de Leydig, lo que estaría en concordancia con la pérdida de estas células durante

la regresión, algo que como sabemos está en discusión (Hardy y cols., 1987; Jhonson y cols., 1987; Sinha Hikim y cols., 1988a; Hance y cols., 2009).

La identificación inmunohistoquímica de testosterona permitió ver su positividad en las células de Leydig. Observamos dos hechos importantes. Por un lado, no todas las células de Leydig fueron positivas y por otro pudimos diferenciar nuevamente los dos tipos de células de Leydig identificados anteriormente. Tanto las células de tipo A como B fueron positivas aunque en las segundas apreciamos una menor intensidad. Al mismo tiempo cualitativamente se observó una mayor proporción de células tipo A positivas. En los testículos envejecidos el patrón histoquímico fue muy similar a los controles.

La célula de Leydig es identificada por enzimas de la ruta esteroidogénica como la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, un marcador de ellas aceptado entre otros universalmente (Ortega y cols., 2004). Pero también se utiliza la identificación histoquímica de testosterona para las células de Leydig, observándose que no todas ellas son positivas al anticuerpo testosterona. Este hecho, ha sido descrito en los trabajos realizados por Nistal y cols., (1986) y Regadera y cols., (1991), ambos utilizaron el anticuerpo testosterona y diferenciaron células de Leydig intensamente teñidas, débilmente teñidas y células no teñidas en el testículo de hombre. La presencia de células de Leydig negativas a testosterona lo atribuyen a cambios cíclicos en la actividad funcional de estas células. Así mismo al igual que en nuestro estudio, donde el porcentaje de células negativas parece que se incrementa en nuestras células tipo B que hemos considerado degeneradas, Regadera y cols.,(1991) observan una disminución del porcentaje de células de Leydig teñidas tanto en testículos normales como criptorquídicos y con el síndrome de Klinefelter en las células que ellos clasifican como anormales, indicando que existe una cierta correlación entre esa anomalía y la baja identificación de células positivas a testosterona en ellas como consecuencia probable de un déficit en su síntesis. Al igual que Paniagua y cols., (1986) que clasifican estas células como desdiferenciadas y cuya función esteroidogénica está también disminuida.

En el estudio semicuantitativo en primer lugar se observó que dentro de la población de células de Leydig, el porcentaje de las de tipo A fue siempre mayor que las de tipo B no variando significativamente con la edad. Así mismo, aunque se obtuvo un porcentaje menor de células de Leydig tipo B positivas a testosterona en los animales envejecidos no hubo cambios significativos en los tres grupos de estudio. En segundo lugar, tampoco hubo diferencias significativas en cuanto al porcentaje de células positivas a testosterona de tipo A y B entre los tres grupos de estudio.

Estos resultados muestran por un lado que las células de tipo B que como ya hemos comentado presentan características morfológicas de deterioro celular no se modifican porcentualmente con la edad, al igual que ocurre con las células de Leydig descritas por Neaves y cols., (1985) (degeneradas) que aparecen en hombres de todas las edades. Contrariamente a esto Regadera y cols., (1991) en testículo humano afirman que las células que ellos denominan anormales sí que se incrementan en porcentaje en los testículos criptorquídicos y con el síndrome de Klinefelter's. En cambio durante el desarrollo postnatal la células de Leydig degeneradas de testículo de búfalo sufren variaciones estabilizándose su número con la edad adulta como una población permanente del intersticio (Rana y Bilaspuri., 2000). Todos estos hechos nos llevan a pensar que las células de Leydig descritas como tipo A son funcionalmente más activas en la secreción de testosterona que las de tipo B. Además, éstas últimas al ser mayoritariamente negativas a testosterona confirmarían la apreciación anterior de que se trata de células en proceso de involución. Probablemente al principio aún son algo positivas a testosterona para dejar de serlo a medida que el grado de deterioro es mayor. Además al igual que ocurre en otros estudios que han descrito células de Leydig "degeneradas" nuestras células tipo B no varían su porcentaje con la edad.

En los animales envejecidos aunque el porcentaje de células de Leydig positivas a testosterona fue menor, no hubo cambios significativos en los tres grupos de estudio. Nuestros datos muestran una síntesis activa en los animales envejecidos que estarían en concordancia con los encontrados por Swanson y cols., (1982), que en la especie objeto de nuestro estudio *Mesocricetus auratus*

observan que a diferencia de otros mamíferos, mantiene sus niveles de testosterona más o menos constantes a lo largo de su vida.

Respecto a la distribución porcentual de los tipos celulares estudiados en el intersticio hemos observado que en todos los grupos el porcentaje de células de Leydig fue mayor, seguido de los pericitos y los macrófagos. La relación porcentual de estas tres células sufre pocas variaciones con respecto a la edad observándose solamente un descenso significativo del porcentaje de pericitos en el grupo de 12 meses respecto al de 24 meses. Durante la regresión se aprecia una disminución porcentual significativa de los pericitos.

En primer lugar comentar que al igual que en otros estudios realizados en mamíferos sobre la distribución porcentual de células en el intersticio testicular encontramos que la célula de Leydig es la que presenta siempre mayor porcentaje en todos los grupos, lo que pone en evidencia la importancia por todos conocida de esta célula (Mendis-Handagama y cols., 1988). Las variaciones observadas son pequeñas teniendo en cuenta que no hay cambios significativos en el porcentaje de células de Leydig y macrófagos. Ahora bien, las variaciones en el porcentaje de pericitos pueden tener una cierta explicación aunque no se haya observado significación en las otras células estudiadas. La observación de los datos parece mostrarnos que los animales de 24 meses presentan un porcentaje menor de células de Leydig, lo que probablemente hace que la proporción de pericitos se incremente en este grupo. Tal variación podría indicar una cierta descompensación en los animales de 24 meses respecto a los de 6 meses y especialmente respecto a los de 12 meses donde ésta es significativa. Estos cambios, podrían relacionarse con variaciones de la población de células de Leydig con la edad. En anteriores estudios hemos visto un incremento del número de células de Leydig en los animales de 12 meses (aunque no significativo) y un descenso (en este caso significativo) del número de células de Leydig en testículos de 18 meses (Horn y cols., 1996) y 24 meses (Bernal-Mañas y cols., 2005). Por último indicar que la variación porcentual encontrada en la regresión puede ser debida a la acumulación de células de Leydig producida por la disminución del volumen intersticial provocando una proporción diferente entre estas y los pericitos.

Respecto a los resultados semicuantitativos que hemos encontrado en relación con la proliferación y la apoptosis (TUNEL positivas) podemos afirmar que en relación a la proliferación, la célula de las estudiadas que más proliferaba en los cuatro grupos estudiados ha sido el pericito seguido de la célula de Leydig y la célula mioide. El índice de proliferación de pericitos sufrió cambios significativos disminuyendo en los animales de 24 meses respecto a los de 6 y 12 meses. Por el contrario hubo un aumento significativo del mismo en los animales regresados respecto a los de los grupos de edad (6, 12 y 24 meses). La actividad proliferativa de las células de Leydig no varió significativamente con la edad, observándose un aumento significativo en el grupo de testículos regresados con respecto a los de 24 meses. Con respecto a la célula mioide sólo se observó incremento significativo en los animales regresados respecto a los hámsters de 6, 12 y 24 meses.

La actividad proliferativa del pericito es bien conocida en todos los tejidos (Díaz y cols., 2009), aunque ha sido poco estudiada en el testículo, donde sólo algunos autores como DeFalco y cols., (2011) la ponen de manifiesto. Davidoff y cols., (2004) prestan especial atención a este tipo celular ya que consideran que puede tener una función progenitora en el intersticio testicular de rata. Ellos ponen de manifiesto la evidencia de su actividad proliferativa asociada a un aumento del número de estas células durante la reparación del intersticio tras tratamiento del mismo con EDS pero sin aportar observaciones histoquímicas. Como ya hemos comentado el índice de proliferación del pericito es el más elevado de todas las células estudiadas. La actividad proliferativa de esta célula disminuye significativamente a los 24 meses, mientras que aumenta en animales con testículo regresado. Estos datos plantean por un lado, la posibilidad de que el pericito pueda diferenciarse en condiciones normales en otras células intersticiales, incluida la célula de Leydig, si esto fuera así, se produciría con la edad una disminución del número de células de Leydig provenientes de la diferenciación de pericitos. La reducción en su actividad proliferativa con la edad pudiera deberse al carácter troncal de la misma (Coutu y cols., 2011). Así, en otros tejidos se ha observado una lenta disminución de la actividad proliferativa de las células troncales como es el caso del mismo

epitelio seminífero del hámster (Morales y cols., 2003). Por otro lado, el que el pericito mantenga una tasa elevada de proliferación en testículos regresados podría ser una respuesta para la repoblación del intersticio durante la recrudescencia, sea tanto para diferenciarse en nuevas células intersticiales incluida la célula de Leydig que parece disminuir en la regresión (Hardy y cols., 1987; Shina Hikim y cols., 1988) como en células endoteliales en la nueva vascularización que tiene lugar durante esta etapa (Mayerhofer y cols., 1989). Tal comportamiento como hemos dicho antes sería muy similar al observado en las espermatogonias que en la regresión incrementan su índice de proliferación como preparación a la regeneración posterior durante la recrudescencia del epitelio seminífero (Morales y cols., 2003, 2007).

La proliferación de la célula de Leydig ha sido un poco más estudiada que la del pericito en condiciones normales en el testículo, como lo demuestran los estudios realizados con timidina tritiada en donde el índice de unión es menor del 0,1% en rata (Teerds y cols., 1989), mientras que en hámster es del 0,22% (Hardy., 1987). La detección inmunohistoquímica con PCNA en células de Leydig también ha sido realizada mono (Liang y cols., 2001). Sriraman y cols., (2000) utilizando western blot para valorar la presencia de PCNA en cultivos de células de Leydig de rata tanto progenitoras como adultas, observan un descenso de esta proteína en estas últimas lo que indica una disminución de la proliferación a medida que se produce la diferenciación de las células de Leydig durante el desarrollo postnatal asociándose también a una disminución de la ciclina D3. Estos resultados indican que existe una cierta proliferación en las células de Leydig adultas. El papel de esta proliferación es discutido en la literatura, ya que para algunos significa que puede existir coexistencia de células de Leydig de varias edades y que hay por lo tanto nuevas células que se añaden al intersticio continuamente (Lejeune y cols., 1998). Una disminución de esta actividad proliferativa podría explicar la disminución de células de Leydig con la edad, junto a la destrucción de células de Leydig por degeneración y disolución de las mismas tal como es observado por Neaves y cols., (1985). Esto no implicaría que también nuevas células de Leydig pudieran formarse por diferenciación de precursores de las mismas, aunque ambas actividades repobladoras de células serían insuficientes ante la pérdida

debida a la degeneración con la consiguiente disminución de la población de células de Leydig con la edad. Ahora bien, teniendo en cuenta que nuestros resultados indican que en el hámster el índice de proliferación de células de Leydig no varía significativamente con la edad nos lleva a plantearnos que la actividad degenerativa debe ser probablemente un factor importante para la deplección de las células de Leydig con la edad en el hámster sirio.

Da la impresión de que el estado de regresión puede suponer un cambio en la proliferación de las células de Leydig ya que presentan un índice mayor que en fotoperiodo largo. Tal incremento podría estar relacionado con el restablecimiento de la población de células de Leydig durante la recrudescencia si tenemos en cuenta además que no hemos observado células de Leydig apoptóticas en testículo regresado, lo cual apunta a una pérdida previa de células de Leydig durante la regresión.

Las células mioides presentaron un índice de proliferación muy pequeño sin variaciones con la edad. Estos datos confirman la estabilidad de la población de estas células en condiciones normales, pudiéndose alterar la proliferación de la misma tras la administración de algunas sustancias como por ejemplo epinefrina poniendo de manifiesto su actividad proliferativa inmunohistoquímicamente con PCNA y BrdU (Santamaría y cols., 1995). En el grupo de animales regresados observamos un aumento significativo del índice de proliferación de las células mioides respecto a los animales de 6, 12 y 24 meses. Este hecho posiblemente esté relacionado con la recuperación de la pared tubular durante la recrudescencia, puesto que durante la regresión el volumen del túbulo disminuye por acortamiento o plegamiento del mismo (Sinha Hikim y cols., 1988).

No hemos encontrado en nuestro estudio proliferación de macrófagos tanto en testículos sometidos a fotoperiodo corto como fotoperiodo largo. En la literatura algunos autores hacen referencia a la actividad proliferativa de estas células en el testículo, que tiene lugar fundamentalmente desde el nacimiento a la maduración sexual en condiciones normales (Russell y cols., 1990). En cambio son más numerosos los estudios que ponen de manifiesto la

proliferación de estas células y su relación funcional con la célula de Leydig cuando se somete a los animales a tratamiento con EDS. Así en la rata, en donde se estudia si el mantenimiento de la población de macrófagos que tiene lugar tras este tratamiento es por reclutamiento de monocitos o por mitosis de macrófagos residentes, se ha comprobado que los macrófagos tienen capacidad de dividirse en el testículo y que la población se mantiene en parte por la división mitótica de los mismos (Schlatt y cols., 1999).

Ahora bien, en nuestras condiciones de trabajo que son de carácter fisiológico la falta de proliferación indica que tanto el envejecimiento como la regresión por fotoperiodo corto no parecen alterar la población de macrófagos.

En resumen todas las células estudiadas presentan actividad proliferativa menos el macrófago. La regresión supone un incremento general de la proliferación de las mismas mientras que el envejecimiento afecta principalmente al pericito que ve disminuida su actividad proliferativa. En testículos regresados, el aumento de la proliferación de estas células intersticiales puede estar posiblemente relacionado con la recuperación del intersticio testicular durante la etapa de recrudescencia, mientras que el envejecimiento parece relacionarse con un enlentecimiento de la actividad proliferativa intersticial.

Como ya sabemos el control del número de células en un organismo está reflejado por el balance dinámico entre crecimiento en el número celular y la muerte celular (King y Cidlowski., 1998). Las células pueden sufrir muerte celular principalmente por 2 mecanismos: necrosis y apoptosis (Gavrieli y cols., 1992). Por lo que junto a los valores de la actividad proliferativa es importante conocer los de apoptosis para tener una noción clara sobre el equilibrio celular de los tejidos, sobre todo en condiciones fisiológicas en las que teóricamente no suele existir situaciones que supongan una necrosis masiva de las células (Gavrieli y cols., 1992).

La actividad apoptótica medida por la técnica de TUNEL fue escasa en el intersticio testicular siendo el índice apoptótico de los pericitos superior al de

las células de Leydig. Se observó un incremento significativo del índice apoptótico de los pericitos en los testículos de animales de 12 meses respecto a los de 24 meses. También hubo una disminución del índice en las células mioideas entre los animales de 12 y 24 meses. El índice apoptótico no varió para la célula de Leydig entre los tres grupos estudiados. En testículo regresado no se observó apoptosis ni en las células de Leydig ni en los pericitos.

En el intersticio testicular, el índice apoptótico (TUNEL positivo) de los pericitos siempre es el más elevado de todas las células estudiadas como acabamos de mencionar. En la literatura no existen datos sobre la actividad apoptótica de los pericitos en el testículo en condiciones fisiológicas normales por lo que es la primera vez que se detecta y cuantifica esta actividad en los mismos. Estos resultados nos indican que en la población de pericitos existe una pérdida de ellos que son eliminados por muerte celular programada y que son compensados por la actividad proliferativa de los mismos. Esta pérdida no parece que pueda afectar mucho a la población de los pericitos disponibles en los animales de 6 y 12 meses pues no hay cambios significativos ni en la actividad proliferativa ni en la apoptótica, pero sí que plantea que entre los 12 y los 24 meses, la apoptosis de pericitos pueda tener un papel funcional en disminuir o al menos detener el incremento de este tipo celular con el paso del tiempo, si se tiene en cuenta que hay una disminución de la actividad proliferativa de los mismos en los animales de 24 meses. De esta forma si el pericito es una posible fuente de otras células del intersticio disminuiría su actividad regenerativa con el envejecimiento. La existencia de un pico de apoptosis en la población de pericitos a los 12 meses se correlacionaría bien con el aumento de proliferación observado también para esta edad, lo que indicaría que la apoptosis se modifica de forma fisiológica al igual que la proliferación. Teniendo en cuenta que en la regresión no hemos encontrado apoptosis en los pericitos y sí una fuerte proliferación se puede afirmar que en este estado, el intersticio es diferente y opuesto al del envejecimiento, donde la apoptosis se mantiene en una tasa similar al control mientras que su índice de proliferación disminuye.

El índice apoptótico (TUNEL positivas) no varió para la célula de Leydig en los tres grupos estudiados. Siendo su tasa de apoptosis siempre menor que la de proliferación modificándose ambos índices de forma similar con la edad. Esto sugiere que la apoptosis (células TUNEL positivas) probablemente no sea el mecanismo que contribuye a la disminución en el número de células de Leydig con la edad en nuestra especie, ya que la relación proliferación/apoptosis no sufre variaciones importantes con la edad. A diferencia de lo que ocurre en el epitelio seminífero del hámster en condiciones normales (Hsueh y cols., 1996) o con el envejecimiento (Morales y cols., 2004, 2007), la apoptosis no parece ser el mecanismo que permita al intersticio testicular controlar el número de células y eliminar las alteradas. En consecuencia según los datos encontrados en nuestro estudio habría que pensar que la disminución de células de Leydig con la edad puede estar relacionada más bien con una disminución de la actividad proliferativa de los pericitos y con la degeneración constante de células de Leydig (tipo B) con la edad que hemos comentado anteriormente.

Las células mioideas presenta un índice apoptótico no superior al 1% en todos los grupos estudiados, aunque si sufre un ligero pero significativo aumento en hámster de 12 meses. Al igual que ocurre en las células de Leydig la actividad proliferativa y apoptótica de las células mioideas se modifican de manera paralela con la edad. Por lo que en principio no parece que exista una modificación de la población de células mioideas debidas a la edad.

La ausencia de apoptosis (TUNEL positivas) en las células estudiadas del intersticio testicular del hámster sirio en testículo regresado es un hecho importante que debemos destacar ya que no ha sido descrito en la bibliografía hasta ahora. Sólo en el corzo, una especie con reproducción estacional se han encontrado algunas células apoptóticas (TUNEL positivas) durante los periodos estacionales no reproductivos, y la apoptosis (TUNEL positivas) no varía en el intersticio testicular durante los mismos (Blottner y Schoen, 2005). En principio podemos considerar que la falta de actividad apoptótica podría estar relacionada con la disminución funcional que sufre el intersticio testicular

durante el proceso de regresión y con la preparación del mismo para la recrudescencia.

En resumen, la actividad apoptótica (TUNEL positivas) del intersticio testicular del hámster sirio no es elevada y se mantiene siempre por debajo de la actividad proliferativa, indicando que la apoptosis (TUNEL positivas) no sufre cambios importantes con el paso del tiempo. Por lo que en principio no podemos asignar a la apoptosis (TUNEL positivas) la causa principal del descenso del número de células de Leydig con la edad en nuestra especie. Es cierto que la apoptosis es masiva en estas células cuando se producen situaciones estresantes o tóxicas (Kerr y cols., 1988., Myers y Abney, 1990., Schlatt y cols., 1999), pero parece poco relevante a la luz de nuestros resultados este proceso en condiciones fisiológicas normales e incluso en situación de regresión testicular causada por fotoperiodo corto, donde la actividad apoptótica en el hámster está muy disminuida aunque esto no descarta la posibilidad de que durante el proceso de la regresión pudiera estar aumentada especialmente en la célula de Leydig (**Esquema A**).

En el citoplasma de las células de Leydig se observó la presencia de inmunorreactividad a HSP-47 y colágeno tipo IV ($\alpha 5$). En el estudio semicuantitativo no encontramos variaciones significativas en el porcentaje de células de Leydig positivas a HSP-47 entre los grupos de 6, 12 y 24 meses. En cambio en el grupo regresado por fotoperiodo corto el índice de células positivas fue significativamente superior a los anteriores. Por el contrario, el índice de células de Leydig positivas a colágeno IV ($\alpha 5$) en testículos regresados fue significativamente menor que el encontrado en los animales de 6, 12 y 24 meses de edad. Entre estos últimos este índice no varió. Por último, el volumen de tejido conjuntivo calculado a través de la técnica histoquímica del Tricrómico de Masson no varió en el intersticio entre los animales de 6, 12 y 24 meses. Si lo hizo significativamente en el grupo de 24 meses respecto a los de 6 y 12 en lo que respecta al volumen de tejido conjuntivo de la pared tubular. Además, el volumen de tejido conjuntivo intersticial sufrió una disminución significativa en el grupo de regresión por fotoperiodo corto comparado con los grupos de 6, 12 y 24 meses.

HSP-47 está relacionada con la síntesis de procolágeno y ha sido muy poco estudiada en testículo, de hecho sólo existe un estudio que pone de manifiesto su expresión genética en rata Norway, siendo esta mayor en los testículos envejecidos regresados asociada con atrofia testicular respecto a las células de Leydig de testículo envejecido sin atrofia testicular (Syntin y cols., 2001). Nuestro estudio muestra la expresión de HSP-47 en células de Leydig de hámster Sirio en todos los grupos de estudio. El porcentaje de estas células positivas a HSP-47 es siempre superior al 50%, no mostrando modificaciones con la edad. Este comportamiento es diferente a lo que ocurre en otros tejidos envejecidos donde se produce una respuesta reducida en la síntesis de este tipo de proteínas por parte de las células sometidas a estímulos estresantes (Verbeke y cols., 2001).

Por el contrario, el porcentaje de células de Leydig positivas a HSP-47 aumenta en la regresión testicular. Es conocido que durante la regresión por fotoperiodo corto las células de Leydig disminuyen la actividad sintética de testosterona e involucionan a células poco funcionales (Sinha Hikim y cols., 1993). Este hecho podría ser en parte la causa del aumento de células positivas a HSP-47 ya que el tejido conjuntivo del intersticio testicular sufre una fuerte disminución de su volumen en el estado de regresión. Así pues la mayor expresión de HSP-47 en las células de Leydig podría relacionarse con los procesos de restauración del intersticio que tendrán lugar durante la recrudescencia. Además otra posibilidad para explicar el aumento de HSP-47 es que el incremento de células positivas sea consecuencia de una situación de stress fisiológico que sufriría el animal durante el fotoperiodo corto al igual que ocurre en otras situaciones de stress como elevadas temperaturas, restricción calórica, ejercicio etc...donde está elevada la expresión de la proteína HSP-47 (Verbeke y cols., 2001).

HSP-47 es una proteína íntimamente relacionada con la síntesis, procesamiento y secreción de colágeno incluyendo al colágeno IV de la matriz extracelular del tejido conjuntivo (Nagata, 1998). Nuestros resultados muestran como ya hemos comentado la presencia por primera vez de la proteína en la

célula de Leydig en el hámster sirio. Este hecho se puede relacionar con la participación de la célula de Leydig en la producción y mantenimiento de su propia membrana basal en concreto sintetizando colágeno IV y laminina (Kuopio y cols., 1989; Guittot y cols., 2008). Esta síntesis no esteroideogénica estaría involucrada también en la propia regulación de la testosterona, ya que el colágeno IV tiene una actividad reguladora de la misma, inhibiendo la propia producción de testosterona por parte de las células de Leydig (Díaz y cols., 2005). Según estos datos, nuestros resultados apuntarían a que esta capacidad sintética de las células de Leydig no parece modificarse con la edad en nuestra especie y en consecuencia es muy probable que los productos de su membrana basal no se alteren y por lo tanto se mantenga constante la esteroideogénesis de testosterona con la edad.

Las cadenas $\alpha 5$ del colágeno IV han sido puestas de manifiesto durante el desarrollo del túbulo seminífero. En concreto estas cadenas sólo han sido identificadas en el periodo postnatal de rata cuando las membranas basales están más maduras (Guittot y cols., 2008). Frojzman y cols., (1998) indican, porque no muestra imágenes, que existe positividad a colágeno IV ($\alpha 5$) en las cercanías de las células de Leydig y se ha podido mostrar que las células de Leydig pueden sintetizar colágeno IV en su citoplasma o sintetizando y liberando al medio (Rodríguez y cols., 1991). En este último caso las cadenas $\alpha 5$ son sintetizadas por las células más maduras. En síntesis las células de Leydig sintetizan colágeno IV ($\alpha 5$) que probablemente se incorpora a sus fragmentos de membrana basal a medida que la célula adquiere capacidad funcional. Tal síntesis estaría relacionada con el control de la esteroideogénesis en cuanto que parece que las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del colágeno son de carácter estructural mientras que el colágeno $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ y $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ están bajo la regulación de las gonadotropinas en células de Leydig normales y por tanto ya no en desarrollo (Guittot y cols., 2008).

En principio puede parecer contradictoria la disminución del porcentaje de células positivas a colágeno IV ($\alpha 5$) en los testículos regresados, ya que a menor síntesis esteroideogénica debería haber más síntesis de colágeno IV ($\alpha 5$) siempre que las condiciones fueran las normales. Pero las condiciones en el

animal regresado son muy diferentes al normal. La no funcionalidad de la célula de Leydig se debe a un proceso de involución que retrotrae en parte a la célula de Leydig a estados anteriores al que se encuentra en el estado adulto. En consecuencia es lógico que exista durante la regresión una menor expresión de colágeno IV ($\alpha 5$), tal como ocurre en las células de Leydig en el desarrollo postnatal. Es muy probable que durante la recrudescencia y a medida que la célula adquiere su función normal la expresión de colágeno IV ($\alpha 5$) aumente. En relación con este hecho la mayor reactividad a HSP-47 observada coincidiría con la síntesis que se va a producir posteriormente de este colágeno IV ($\alpha 5$).

Con respecto a los resultados observados en el tejido conjuntivo de los animales envejecidos y regresados es interesante destacar que igual que ocurría con HSP-47 y colágeno IV ($\alpha 5$), existen diferencias entre estos dos grupos. Por un lado, el intersticio testicular envejecido no muestra cambios en el volumen de su tejido conjuntivo respecto a los controles, indicando que en nuestra especie no parece producirse un incremento del mismo como ocurre en otras con la edad (Mendis-Handagama y Gelber., 1995), ni tampoco parece tener lugar un aumento de inhibidores de proteasas que modifiquen el turnover de la matriz extracelular del intersticio testicular con la edad, reduciendo la capacidad esteroidogénica de las células de Leydig (Chen y cols., 2007). Estos fenómenos no parece que puedan producirse en el hámster ya que no hay aumento de tejido conjuntivo intersticial. Por otro lado, en la regresión, el volumen de tejido conjuntivo del intersticio disminuyó. Sinha Hikim y cols., (1988) en un estudio morfométrico en el hámster sirio indica que hay una disminución en los testículos regresados de este volumen intersticial. En nuestro estudio hemos comprobado también que esto es cierto para el tejido conjuntivo del intersticio pero no lo es para el peritubular. Esto nos lleva a pensar que el empaquetamiento de los túbulos seminíferos durante la regresión supone un mero plegamiento físico del tejido conjuntivo peritubular y en cambio para el intersticio debe ir acompañado de una eliminación de una cierta cantidad del tejido conjuntivo del mismo. Estos hechos son contrarios a lo observado en el envejecimiento puesto que en el mismo no hay cambios en el volumen intersticial pero si en el peritubular. Este último ya descrito

anteriormente se ve incrementado con el aumento de laminina y fibronectina con la edad en la pared tubular (Morales y cols., 2004). Además, es sabido que hay un incremento de los túbulos regresados en el envejecimiento, con epitelios seminíferos alterados que se asocia con el aumento del volumen de tejido conjuntivo peritubular tal como ocurre en diversas situaciones patológicas (Regadera y cols., 1991).

En conclusión el intersticio testicular de los dos modelos estudiados por nosotros muestra diferencias importantes puesto que en el regresado se afecta especialmente el intersticio testicular con cambios en el tejido conjuntivo y en la síntesis de moléculas de ECM por parte de la célula de Leydig mientras que en el envejecimiento los cambios se dan en la lámina propia del túbulo y no parecen afectar a la síntesis de proteínas de la matriz extracelular de las células de Leydig (**Esquema B**).

La microscopía electrónica de transmisión mostró un intersticio testicular de características similares en los grupos de 6, 12 y 24 meses. Las células de Leydig de los animales envejecidos fueron similares a las de los animales jóvenes, manteniendo no sólo los orgánulos típicos de estas células en el hámster, sino también las asociaciones estrechas mediante uniones GAP a otras células de Leydig o la presencia de pequeños fragmentos de lámina basal. Por el contrario, en los animales regresados las células de Leydig fueron más pequeñas con menor presencia de orgánulos citoplasmáticos como mitocondrias y retículo endoplasmático rugoso y liso. Aunque existían contactos entre las células no se observaron uniones tipo GAP. Sólo en los tres grupos de edad 6, 12 y 24 meses se encontraron células de Leydig que mostraron signos celulares de degeneración citoplasmática, especialmente tumefacción de mitocondrias, disminución de retículo endoplasmático liso y rotura de la membrana plasmática.

Los estudios ultraestructurales de las células de Leydig tanto en el hombre como en otras especies animales envejecidas, en general coinciden en describir la presencia en el citoplasma de estructuras celulares relacionadas desde hace tiempo con el envejecimiento celular como son el incremento de

lisosomas, cuerpos residuales de lipofuscina o en el caso del hombre y del cerdo el incremento de cristales, mientras que disminuyen algunos orgánulos como el retículo endoplasmático liso o el número y tamaño de las mitocondrias (Paniagua y cols., 1991, Triperi y cols., 2000). En algunos otros roedores como la rata Norway (Chen y Zirkin, 1993) muy utilizada como modelo de envejecimiento de la célula de Leydig o el ratón (Giannesi y cols., 2005) los cambios son notables, con un incremento de los gránulos de lipofuscina muy relacionado con el stress oxidativo y el envejecimiento celular. A la luz de estos hechos las células de Leydig de hámster envejecido muestran pocos signos de deterioro citoplasmático que indiquen una alterada funcionalidad celular, lo que estaría en concordancia con los resultados ya conocidos sobre que no existe una bajada en la síntesis de testosterona con la edad en el hámster Sirio (Swanson y cols., 1982). Es cierto que en nuestro estudio aunque no ha sido significativa se observa una disminución del porcentaje de células inmunohistoquímicas positivas a testosterona totales aunque en el porcentaje relativo hay más células tipo A que tipo B positivas en los animales envejecidos. Estos hechos junto a la disminución en el número de células de Leydig con la edad (Horn y cols., 1982), plantean la pregunta de cómo se compensan estas disminuciones para mantener la producción de testosterona constante con relación al tiempo. En primer lugar hay que indicar que la producción de la hormona se relaciona con el volumen de retículo endoplasmático liso y mitocondrias (Zirkin y cols., 1997), en segundo lugar que es el volumen de la propia célula el que determina la correlación final con la producción de la misma (Mori y cols., 1982). En consecuencia pensamos que es posible que el incremento del volumen de las células podría compensar la pérdida en el número, cuestión que requerirá un estudio posterior a esta tesis.

Otra pregunta que podemos plantearnos es por qué las células de Leydig de hámster pueden ser menos susceptibles al envejecimiento y en concreto al stress oxidativo que está implicado en el mismo. Sólo podemos aportar dos datos que nos han resultado significativos. El primero es que en todos los estudios comparativos de células de Leydig entre especies la de hámster es la que menos se afecta por el EDS (Gray y cols., 1995). El segundo que las células de hámster son las que presentan menos cantidad de retículo

endoplasmático liso y tienen una baja producción de testosterona comparada con otras especies como la rata o el cobaya (Zirkin y cols., 1980). A nuestro entender estos datos parecen indicar un metabolismo menos activo que quizá podría proteger a la célula respecto al paso del tiempo con el resultado de un deterioro celular no significativo respecto a las células de Leydig jóvenes. Por último y teniendo en cuenta que la población de células de Leydig puede tener un recambio continuo es muy posible que la población adulta de las mismas tenga una edad variable lo que facilita un rejuvenecimiento parcial de la misma. Situación que dificulta el deterioro global de la población de células de Leydig con la edad.

Sin embargo en los animales regresados las células de Leydig sí mostraron signos celulares de disminución de su funcionalidad, como son un menor tamaño de la célula y de la cantidad de sus orgánulos celulares sobre todo los relacionados con la esteroidogénesis. Estos resultados son similares a los observados en el hámster Sirio por Sinha Hikim y cols., (1988b) y están en consonancia con una disminución de la actividad normal de LH y de la propia síntesis de testosterona por estas células (Limonta y cols., 1987). En síntesis aunque las células de Leydig muestren menos organelas en fotoperiodo corto y algunos signos de desdiferenciación como la disminución observada en uniones GAP entre las células de Leydig o contactos con macrófagos, no se puede considerar que estas células hayan regresado a una situación desdiferenciada, sino más bien a una disminución de su funcionalidad manteniendo el carácter morfológico de una célula de Leydig adulta y sin signos de degeneración (**Esquema B**).

Hace ya unos años en un estudio óptico y ultraestructural sobre la apoptosis en células de Leydig de ratón se concluyó que este proceso no sucedía en las células de Leydig durante la fase postnatal pero al mismo tiempo se observaba ultraestructuralmente la presencia en el intersticio de testículos entre 35-71 días de edad la presencia de células involucionadas y degeneradas (Faria y cols., 2003). Para estos autores estas células serían remanentes de células fetales que desaparecían con el paso del tiempo por un proceso degenerativo. Como ya vimos células de carácter degenerativo fueron también observadas

por Neaves y cols., (1985) en hombres, considerando que estas eran la causa de la disminución de células de Leydig que se produce con la edad. También Rommerts y cols., (2004) encuentran células degeneradas y no apoptóticas cuando cultivan células de Leydig con concentraciones altas de EDS. Podemos, pues, afirmar que, según nuestro conocimiento, en condiciones normales nadie ha identificado ultraestructuralmente hasta la fecha células de Leydig en apoptosis. Por el contrario sí que se ha observado la presencia de células que varios autores han denominado “degeneradas”. En nuestro estudio hemos identificado con la técnica TUNEL células de Leydig positivas en un bajo porcentaje. Junto a este hecho siempre hemos contabilizado un porcentaje de células de Leydig tipo B mayor y constante que las células de Leydig TUNEL positivas en los tres grupos de animales de 6, 12 y 24 meses. Además, las imágenes ultraestructurales que hemos obtenido concuerdan con las células de Leydig de tipo B vistas con microscopio óptico por un lado, y por otro la ultraestructura de estas células es típica de una célula necrótica. Partiendo de estos datos pensamos que podemos afirmar que la pérdida de células de Leydig que se da en varias especies y en concreto en el hámster con la edad, pudiera estar relacionada con una muerte de carácter necrótico de las mismas. Este hecho nos plantea tres posibles cuestiones. Primero, que si el proceso es constante parece indicar más que una causa permanente extrínseca, un proceso meramente intrínseco. Segundo, que la muerte de estas células de Leydig se produciría en nuestro caso en animales lo suficientemente mayores para considerar que no sean células fetales de Leydig que se quedarían y estuvieran eliminando. Tercero, estas células puedan dar positivas a la técnica de TUNEL en un momento determinado lo que explicaría no haber podido encontrar en nuestro estudio células de Leydig con ultraestructura típica de apoptosis.

Con respecto a las dos primeras cuestiones consideramos que en principio siendo un fenómeno que acontece aparentemente de forma constante en los tres grupos de edad, pensamos que se trata de un proceso con una cierta programación. Al respecto, recientemente se ha ampliado el concepto de muerte celular. Esta comprendería la necrosis y la apoptosis tradicional junto a la denominada necrosis programada o necroapoptosis (Galluzzi y Kroemer.,

2008). Esta última parece responder a factores externos como la propia oxidación celular u otros (Christofferson y Yuan; 2010), teniendo unos mediadores concretos celulares que llevan a la célula a morir de forma programada no por apoptosis sino por necrosis con la típica tumefacción y explosión celular (Vndenabeele y cols., 2010). Por los resultados encontrados en nuestro trabajo, en el intersticio testicular del hámster sirio podría darse este fenómeno de necroptosis en las células de Leydig. De esta manera una célula en plena actividad esteroideogénica finalizaría su proceso vital por este mecanismo con lo que no habría posibilidad de una senescencia celular con células de Leydig avejentadas y con una disminución importante de su funcionalidad como se observa en el hombre (Paniagua y cols., 1991) o en ratón (Ruffoli y cols., 2001). Con respecto a la tercera cuestión pensamos que es muy probable que exista tal solapamiento pues es conocido que la técnica de TUNEL puede ser positiva en el núcleo de células con avanzada necrosis (Huerta y cols., 2007), siendo necesario utilizar otras técnicas como la microscopía electrónica para confirmar la presencia de células apoptóticas. Aún así, no descartamos que no hayamos encontrado ultraestructuralmente células de Leydig en apoptosis debido a una insuficiencia de nuestro muestreo, aunque es claro que por los datos aportados en esta tesis la apoptosis no parece ser el mecanismo principal causante de la disminución del número de células de Leydig con la edad. A lo máximo podría coadyuvar con la necrosis y ambas tener la suficiente fuerza para desequilibrar las fuerzas de recambio, sea por proliferación de otras células de Leydig o por diferenciación de precursores como por ejemplo de los pericitos, los cuales como hemos observado disminuyen su capacidad proliferativa con la edad. Por último comentar el hecho de que estas células necróticas no han sido observadas en los animales regresados. Hasta cierto punto este dato es explicable ya que como dijimos no hemos observado en nuestro estudio células de Leydig TUNEL positivas en estos animales. Esto significaría que durante el periodo de regresión y de baja actividad se produce una homogeneización de las células de Leydig siendo todas ellas regresadas (**Esquema A**).

Los macrófagos intersticiales presentaron con microscopía electrónica las características morfológicas típicas de células con carácter fagocítico. No

observamos cambios destacables entre los grupos de edad. Las asociaciones entre las prolongaciones de las células de Leydig y las invaginaciones de la membrana plasmática de los macrófagos fueron identificadas en los animales de los tres grupos de edad. En los testículos regresados el tamaño de la célula así como sus prolongaciones citoplasmáticas fueron menores como también los contactos con las células de Leydig. La célula mioide mostró su morfología habitual en todos los grupos estudiados solo en los testículos de animales regresados, su grosor era mayor. La ultraestructura de los pericitos fue muy similar en todos los grupos estudiados.

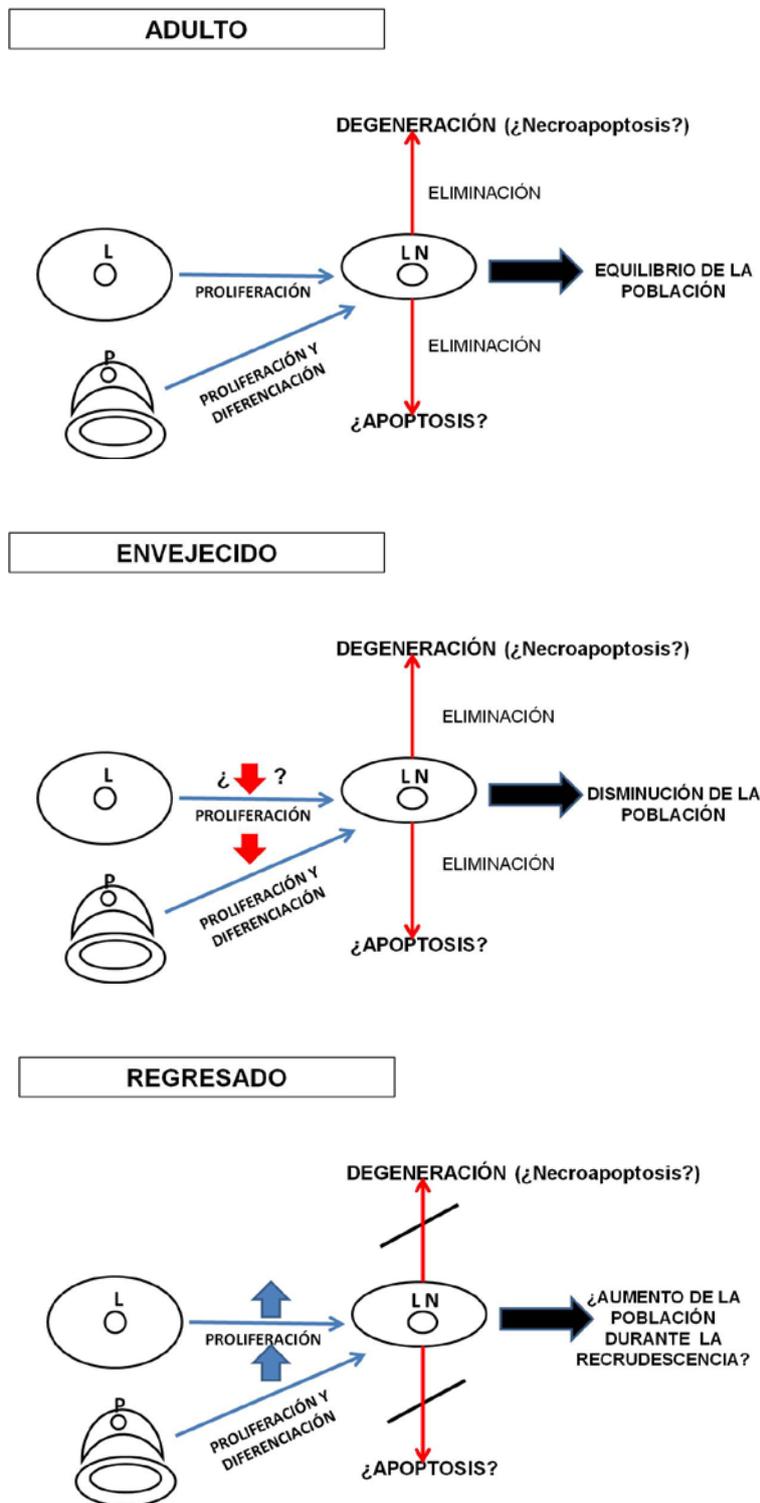
El aspecto ultraestructural de los macrófagos del intersticio testicular del hámster observado en nuestro trabajo, es muy similar al encontrado en otras especies con anterioridad. Claramente destaca que la morfología de los mismos sufre leves cambios en los animales envejecidos no disminuyendo los contactos entre ellos y las células de Leydig. Estos datos son un signo más del buen estado celular de las células de Leydig del hámster Sirio con el paso del tiempo. En otras especies estudiadas el envejecimiento causa un incremento sobre todo de lipofucsina en el citoplasma de los macrófagos y una disminución en sus contactos con las células de Leydig (Giannessi y cols., 2005). Esto último se relaciona con el papel regulador de los macrófagos en la síntesis de testosterona por parte de las células de Leydig, en cuanto que la mayor interrelación entre ambos tipos celulares se da en las células de Leydig jóvenes, siendo este hecho un signo de su buen estado funcional (Miller y cols., 1992).

Con respecto a la regresión debida a fotoperiodo corto volvemos a encontrar diferencias respecto al envejecimiento. Es cierto que los macrófagos muestran un aspecto muy similar a los de los controles pero su relación con las células de Leydig cambia al disminuir el número de contactos, ya que la cantidad de invaginaciones y evaginaciones de las membranas plasmáticas de ambos tipos celulares disminuye. Evidentemente este segundo hecho probablemente se relaciona con la menor actividad funcional de las células de Leydig en la regresión testicular.

Los resultados que hemos observado sobre las células mioides por un lado confirman lo ya descrito anteriormente por Kurohmaru y cols., (1990) que no observan cambios celulares especiales tras el fotoperiodo corto en esta célula. Por otro lado, el no observar cambios celulares apreciables de carácter ultraestructural en la célula mioide con la edad parece apuntar a que el depósito de tejido conjuntivo que se incrementa con la edad en la pared tubular (Morales y cols.,2004) más que un producto de la transformación fibroblástica de la célula mioide es consecuencia de una continua deposición relacionada probablemente con el paso del tiempo o una alteración de la célula de Sertoli. Por último, la poca variabilidad morfológica de los pericitos en todos los grupos estudiados estaría en consonancia con el carácter de célula indiferenciada y probablemente madre, que se le ha adjudicado a esta célula en los últimos años en el intersticio testicular (Davidoff y cols., 2004)

En síntesis, el estudio ultraestructural del intersticio testicular muestra diferencias importantes entre el estado de fotoperiodo corto y el normal, que afectan sobre todo a la célula de Leydig, la cual sufre una cierta involución en todas sus organelas relacionadas con la esteroidogénesis así como una pérdida de la relación con los macrófagos (**Esquema B**). Por el contrario en el intersticio, el envejecimiento afecta minimamente a la ultraestructura de las células, ya sean de Leydig, macrófagos, pericitos o células mioides. Por último, no ha sido posible observar ultraestructuralmente células de Leydig con morfología típica de apoptosis pero por el contrario sí células necróticas (sólo en los animales de fotoperiodo largo), que podemos asignar a las células tipo B observadas con microscopio de luz y que mostraron una baja afinidad a la testosterona. Tales células consideramos que son el estado final por la que se produce la eliminación de células de Leydig en el hámster sirio y en consecuencia la vía principal por la que se reduce la población final de las mismas con la edad (**Esquema A**). Al mismo tiempo las células que se mantienen funcionales no muestran signos de senescencia o infuncionalidad por lo que estas deben ser capaces en principio de equilibrar la producción de testosterona, sea por un aumento por célula de organelas implicadas en la síntesis esteroidogénica o una mayor producción por unidad celular, para que esta no varíe con la edad. Evidentemente no descartamos que en animales que

tengan más edad se pudiera romper este mecanismo reequilibrador y que la síntesis de testosterona pudiera empezar ento significativamente.

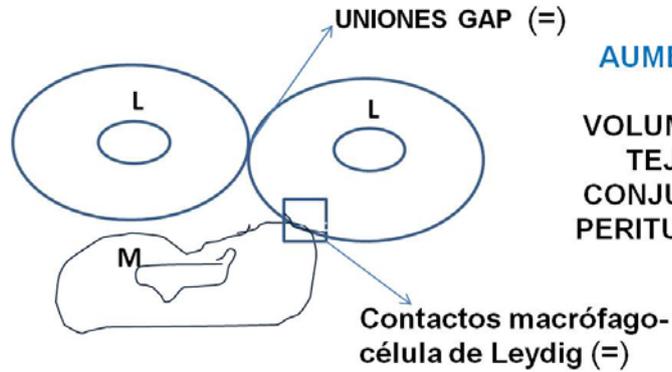


Esquema A: Posible dinámica celular en el intersticio testicular del hámster sirio adulto, envejecido y regresado por fotoperiodo corto que se derivan de los resultados obtenidos en esta tesis. L (célula de Leydig), LN (célula de Leydig nueva), P (pericito).

ENVEJECIDO

NO SE MODIFICA:

- % HSP-47
- % COLÁGENO IV $\alpha 5$
- VOLUMEN DE TEJIDO CONJUNTIVO INTERSTICIAL



AUMENTA:

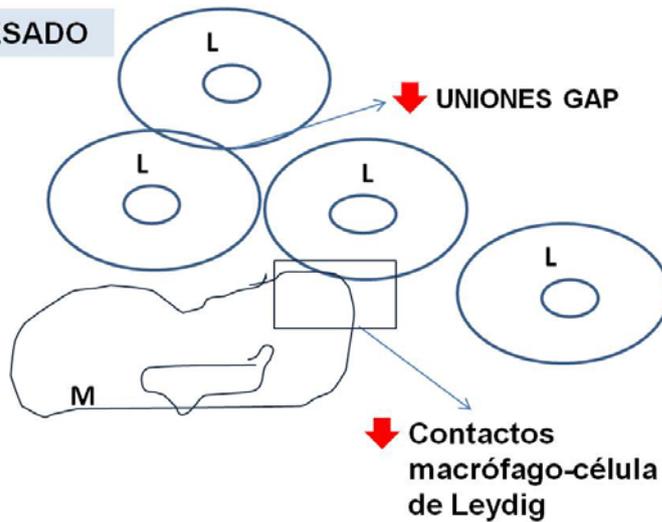
- VOLUMEN DE TEJIDO CONJUNTIVO PERITUBULAR

ULTRAESTRUCTURA CÉLULA DE LEYDIG Y MACRÓFAGO: NORMAL

REGRESADO

AUMENTA:

- % HSP-47



DISMINUYE:

- % COLÁGENO IV $\alpha 5$
- VOLUMEN DE TEJIDO CONJUNTIVO INTERSTICIAL

VOLUMEN DE TEJIDO CONJUNTIVO PERITUBULAR: NO SE MODIFICA

**ULTRAESTRUCTURA CÉLULA DE LEYDIG: DISMINUCIÓN DEL VOLUMEN CELULAR Y DEL NÚMERO DE ORGÁNULOS CITOPLASMÁTICOS.
MACRÓFAGO: NORMAL**

Esquema B: Modificaciones encontradas en nuestro estudio referente a la matriz extracelular y a la ultraestructura de las células intersticiales en los animales envejecidos y regresados por fotoperiodo corto respecto a los animales jóvenes.

L (célula de Leydig), M (macrófago).

6.-CONCLUSIONES

1.-El intersticio testicular del hámster Sirio no sufre alteraciones morfológicas con la edad, pero sí en aquellos animales con testículo regresado por exposición a fotoperiodo corto y que se caracterizan por una importante reducción del diámetro tubular, con una disminución significativa del tamaño de las células de Leydig. Hemos observado actividad proliferativa en las células de Leydig, pericitos y células mioides así como células de Leydig, pericitos y células mioides TUNEL positivas.

2.-En la población de células de Leydig de animales de 6, 12 y 24 meses hemos identificado con microscopía de luz dos tipos de células de Leydig, que hemos denominado células de Leydig de tipo A con la morfología característica de esta célula y positivas a testosterona y células de Leydig de tipo B de morfología necrótica también positivas a testosterona. Los resultados semicuantitativos realizados han determinado que el porcentaje de células de Leydig de tipo A y la positividad a testosterona siempre fue superior a las células de tipo B en los tres grupos de edad. En los testículos regresados no se diferenciaron las células de Leydig de tipo A y de tipo B.

3.-La célula de Leydig es el tipo celular más abundante porcentualmente, de los estudiados en el intersticio testicular seguida del pericito y del macrófago. No hubo cambios significativos en los tres grupos de edad. Así mismo en animales con testículo regresado el porcentaje de células de Leydig siempre fue mayor.

4.-El índice de proliferación celular es significativamente mayor en los pericitos que en las células de Leydig y las células mioides pero dicho índice disminuye durante el envejecimiento. Durante la regresión por fotoperiodo corto, el índice

de proliferación de pericitos y células mioides se incrementó. Sin embargo, no se observaron modificaciones en el índice de proliferación de células de Leydig ni durante el envejecimiento ni en testículos regresados.

5.-La actividad apoptótica en el intersticio testicular (valorada mediante la técnica de TUNEL) no es muy elevada y el índice de células TUNEL positivas siempre es menor que el índice de células en proliferación. No se observó variación de este índice apoptótico con la edad ni en células de Leydig, ni en células mioides, pero si disminuye en el caso de pericitos. En testículos regresados no observamos actividad apoptótica (células TUNEL positivas) en el intersticio testicular.

6.-Las células de Leydig expresan en su citoplasma las proteínas HSP-47 y colágeno IV ($\alpha 5$), no observándose alteración en el porcentaje de expresión a estas proteínas durante el envejecimiento. Durante la regresión por fotoperiodo corto aumentó el porcentaje de expresión de HSP-47 y disminuyó el del colágeno IV ($\alpha 5$).

7.-El volumen de tejido conjuntivo intersticial no sufre modificaciones con la edad, pero disminuye en los casos de regresión testicular. Esta disminución debe estar asociada a la destrucción de parte de este tejido durante la fase de regresión por la exposición a fotoperiodo corto. Por el contrario, con la edad se produce un aumento significativo del volumen de tejido conjuntivo peritubular.

8.-Las células de Leydig no presentan cambios ultraestructurales con la edad, ya que no hay aumento de las estructuras celulares asociadas al envejecimiento o a la involución funcional. Sin embargo, tras la regresión debida a fotoperiodo corto hay una disminución del tamaño celular y del número de orgánulos citoplasmáticos en las células de Leydig, lo que indica una disminución de su funcionalidad. Las características ultraestructurales de los pericitos, macrófagos y células mioides fue similar en todos los grupos estudiados.

9.-No observamos ultraestructuralmente células de Leydig en apoptosis, sin embargo sí encontramos en los tres grupos de edad, de animales no regresados, células en diversas fases de necrosis. Las células necróticas muestran unas características morfológicas específicas, y se corresponden a las células de Leydig de tipo B observadas al microscopio óptico.

10.-El intersticio testicular del hámster sufre pocas modificaciones con el envejecimiento, aunque un menor recambio de células de Leydig asociado a una muerte constante de ellas, de carácter necrótico, puede causar su disminución. Contrariamente tras el fotoperiodo corto los cambios celulares en las células de Leydig son evidentes, la proliferación de los pericitos es mayor y no hay muerte celular en el intersticio.

7.-RESUMEN

El aparato reproductor durante el envejecimiento y la exposición a fotoperiodo corto manifiesta un declive de la función testicular que se refleja en una disminución de la espermatogénesis y de los niveles de testosterona en la mayoría de mamíferos estudiados, pero existe una especie con reproducción estacional que a diferencia del resto, no disminuye sus niveles de testosterona de manera significativa con la edad, es el hámster sirio *Mesocricetus auratus*. La actividad tisular depende del equilibrio entre los fenómenos de proliferación y apoptosis de las células del mismo y tiene una fuerte influencia en ella la matriz extracelular. La proliferación y la apoptosis se han estudiado en el envejecimiento y en la exposición a fotoperiodo corto del epitelio seminífero pero no en las células que componen el intersticio testicular y no se ha valorado bien la influencia en ellas de la matriz extracelular. La presente tesis tiene como objetivos: a) valorar la actividad proliferativa y apoptótica de varias de las células del intersticio testicular como son las células de Leydig, macrófagos, pericitos y células mioideas en el hámster *Mesocricetus auratus* durante el envejecimiento y tras la exposición a fotoperiodo corto y b) estudiar en ambas situaciones las posibles modificaciones de la matriz extracelular, c) estudiar si se producen alteraciones morfológicas y ultraestructurales en las células y en el tejido conjuntivo intratubular y peritubular durante el envejecimiento y tras la exposición a fotoperiodo corto y d) analizar histoquímicamente la actividad esteroidogénica de las células de Leydig. Para ello hemos utilizado 26 hámsters (13 animales de 6 meses, 8 animales de 12 meses, 7 animales de 24 meses y 11 animales de 6 meses expuestos a fotoperiodo corto). Hemos extraído los testículos y los hemos procesado para microscopía óptica y microscopía electrónica, hemos realizado la tinción de

Tricrómico de Masson y la posterior realización de técnicas inmunohistoquímicas; PCNA (Técnica de detección de células en proliferación), TUNEL (Técnica de detección de apoptosis "in situ"), técnica inmunohistoquímica para la detección de testosterona, técnica para la detección de células de Leydig que expresan HSP-47, técnica para la detección de células de Leydig que expresan colágeno IV ($\alpha 5$). Se ha determinado el índice de proliferación y apoptosis de los tipos celulares anteriormente mencionados así como el porcentaje de cada uno de ellos, el porcentaje de células de Leydig que contienen testosterona, el porcentaje de células de Leydig que contienen colágeno IV ($\alpha 5$), el porcentaje de células de Leydig que expresan HSP-47. También se ha calculado la cantidad de tejido conjuntivo que está presente en el área intersticial y tubular de todos los animales. A continuación se realizaron los oportunos análisis estadísticos. Los resultados fueron los siguientes: a) el intersticio testicular no presenta alteraciones histológicas en los animales de 24 meses, b) se diferenciaron desde el punto de vista histológico tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica dos tipos de células de Leydig que hemos denominado tipo A y tipo B. Estos dos tipos celulares están presentes en los animales de 6, 12 y 24 meses, c) la célula de Leydig más abundante porcentualmente es la de tipo A que tiene una morfología normal y es la que presenta mayor porcentaje de células positivas a testosterona, en los tres grupos de animales, mientras que la célula de Leydig de tipo B presenta características de una célula necrótica y d) en cuanto a la proliferación se observaron diferencias significativas en el índice de proliferación de pericitos a los 24 meses que fue menor respecto a los de 6, 12 meses y animales con testículo totalmente regresado ($p < 0.05$), siendo mayor en estos animales con testículo regresado frente a los de 6, 12 y 24 meses ($p < 0.05$). Las células de Leydig mostraron un porcentaje de proliferación que no varió significativamente con el tiempo, aunque si fue superior en animales con testículo regresado frente a animales de 24 meses ($p < 0.05$), e) respecto a la apoptosis (TUNEL) esta fue detectada en la célula de Leydig, pericito y célula mioide pero no varió significativamente respecto a los hámsters jóvenes, salvo en el pericito que fue superior en animales de 12 meses frente a animales de 24 meses. Los porcentajes de apoptosis fueron menores que los de proliferación. El pericito y la célula de Leydig no mostraron actividad apoptótica

(TUNEL) en animales con testículo regresado, f) se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de todos los tipos celulares y estas diferencias varían con el tiempo ($p < 0.05$), siendo las células de Leydig las más abundantes relativamente en los tres grupos, seguida del pericito y por último el macrófago ($p < 0.05$). El porcentaje de pericitos fue mayor en animales de 24 meses que en animales de 12 meses y con testículo totalmente regresado ($p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células de Leydig positivas a testosterona, g) el volumen de tejido conjuntivo intersticial en animales de 6, 12 y 24 meses fue superior a animales con testículo regresado, mientras que el porcentaje de tejido peritubular fue superior en animales de 24 meses frente a 6 y 12 meses ($p < 0.05$). El porcentaje de células de Leydig positivas a HSP-47 fue mayor en animales con testículo regresado mientras que para las células de Leydig positivas a colágeno IV ($\alpha 5$) fue menor en estos animales ($p < 0.05$) frente al resto, h) ultraestructuralmente se observó pocas alteraciones celulares en la célula de Leydig durante el envejecimiento encontrándose sólo en los tres grupos de edad células de Leydig con morfología típicamente necrótica y no apoptótica. En conclusión, el envejecimiento del intersticio testicular del hámster *Mesocricetus auratus* en base al estudio realizado muestra una disminución de su actividad proliferativa centrada en los pericitos, no observándose alteraciones importantes en la proliferación y apoptosis de los otros tipos celulares estudiados. Esto puede suponer una disminución en la capacidad regenerativa de este compartimento celular y en ocasiones con la edad la disminución del número de células de Leydig. Junto a ello una continua muerte de células de Leydig a través de una vía probablemente necrótica puede coadyuvar a tal disminución. Por el contrario en los animales con testículo totalmente regresado se producen alteraciones morfológicas y ultraestructurales importantes, en concreto en la proliferación de pericitos que puede estar relacionada con una recuperación tanto de las células intersticiales como de la generación de nuevos vasos durante el periodo de recrudescencia. El aumento significativo en el porcentaje de células de Leydig positivas a HSP-47 puede que se relacione con la destrucción previa de colágeno y posterior restauración del intersticio testicular, mientras que la disminución de la expresión de colágeno IV ($\alpha 5$) estaría

relacionado con la involución funcional que sufre la célula de Leydig durante el periodo de regresión.

8.-BIBLIOGRAFÍA

-Angelova P., Davidoff M., Baleva K., Staykova M. Substance P- and neuron-specific enolase-like immunoreactivity of rodent Leydig cells in tissue section and cell culture. *Acta Histochemica*. 91, 131-139. 1991.

-Almahbobi G., Papadopoulos V., Carreau S., and Silberzahn P. Age-related morphological and functional changes in the Leydig cells of the horse. *Biology of Reproduction* 38, 653-665. 1988.

-Baillie AH. Further observations on the growth and histochemistry of Leydig tissue in the postnatal prepubertal mouse testes. *Journal Anatomy*. Lond. 98(3), 403-419. 1964.

-Bergh A. Treatment with hcg increases the size of Leydig cells and testicular macrophages in unilaterally cryptorchid rats. *International Journal of Andrology*. 10, 765-772. 1987.

-Berensztein E.B., Sciara M.I., Rivarola M.A., and Belgorosky A. Apoptosis and proliferation of human testicular somatic and germ cells during prepuberty: rate of testicular growth in newborns mediated by decreased apoptosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 87, 5113-5118. 2006.

-Bernal-Mañas CM., Pastor LM., Horn R., Morales E., Zuasti A., Ferrer C., Canteras M., De la Rosa P., Suarez M. Apoptotic activity in Leydig cells of aging golden hamster testes. 9th Annual Conference. Murcia 1-3 de septiembre de 2005.

-Blottner S. and Schoen J. Minimal activity in both proliferation and apoptosis of interstitial cells indicates seasonally persisting Leydig cell population in roe deer. *Cell and Tissue Research*. 2005.

-Buchanan Hales D. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *Journal of Reproductive Immunology*. 57, 3:18. 2002.

-Calvo A., Pastor LM., Martínez E., Vázquez JM., Roca J. Age-related changes in the hamster epididymis. *The Anatomical Record*. 256, 335-346. 1999.

-Chen H., Huhtaniemi I. and Zirkin B. R. Depletion and repopulation of Leydig cells in the testes of aging Brown Norway rats. *Endocrinology*. 137, 3447-3452. 1996.

-Chen H., Midzak A., Luo L, Zirkin B. Aging and the decline of androgen production. En: *The Leydig cell in health and disease*. (Payne y Hardy, eds). Humana Press. New Jersey. Pág. 117-131. 2007.

-Chen H., Ge R., Zirkin B.R. Leydig cells: from stem cells to aging. *Molecular Cell Endocrinology*. 306(1-2), 9-16. 2009.

-Christl H-W. The lamina propria of vertebrate seminiferous tubules: a comparative light and electron microscopic investigation. *Andrología*. 22(1), 85-94. 1990.

-Christofferson D.E y Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology*. 22, 263-268. 2010.

-Codesal J., Regadera J., Nistal M. Regadera-Sejas J., Paniagua R. Involution of human fetal Leydig cells. An immunohistochemical, ultrastructural and quantitative study. *Journal Anatomy*. 172, 103-114. 1990.

-Cohen G.M. Caspase: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal*. 326, 1-16. 1997.

-Coutu DL., Francois M., Galipeau J. Inhibition of cellular senescence by developmentally regulated FGF receptors in mesenchymal stem cells. *Blood*. 117(25):6801-6812. 2011.

- Culty M., Luo L., Yao Z., Chen H., Papadopoulos V., Zirkin B.R. Cholesterol transport, peripheral benzodiazepine receptor, and steroidogenesis in aging Leydig cells. *Journal of Andrology*. 23, 439-447. 2002
- Davidoff MS., Schulze W., Middendorff R., Holstein AF. The Leydig cell of the human testis, a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell and Tissue Research*. 271(3), 429-439. 1993.
- Davidoff M.S., Middendorff R., Enikolopov G., Riethmacher D., Holstein A.F., Müller D. Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *The Journal of Cell Biology*. 167, 935-944. 2004.
- Davidoff M.S., Middendorff R., Müller D. and Hostein A.F. History of and recent progress in Leydig cell research. Morphology of the Leydig cells. En: Korf W eds. *Advances in anatomy, embryology and cell biology*. London New York: Springer Dordrecht Heidelberg. P. 3-19. 2009
- DeFalco T., Takahashi S., Capel B. Two distinct origins for leydig cell progenitors in the fetal testis. *Developmental Biology*. 352(1), 14-26. 2011.
- Denduchis B., Schteingart H., Cigorruga S., Vianello Se., Casanova MB. And Lustig L. Immunodetection of cell adhesión molecules and extracelular matrix proteins in rat Leydig cell cultures. *Journal of Andrology*. 19(6), 353-361. 1996.
- De Winter J.P., Vanderstichele H.M.J., Verhoeven G., Timmerman M.A., Wesseling J.G., De Jong F.H. Peritubular myoid cells from immature rat testes secrete activin-A and express activin receptor type II in vitro. *Endocrinology*. 135, 759-767. 1994.
- Díaz E.S., Pellizzari E., Meroni S., Cigorruga S., Lustig L. and Denduchis B. Effect of extracelular matrix proteins on in vitro testosterone production by rat Leydig cells. *Molecular Reproduction and Development*. 61, 493-503. 2002.

- Díaz E.S., Pellizzari E., Casanova M., Cigorruga S.B., and Denduchis B. Type IV collagen induces down-regulation of steroidogenic response to gonadotropins in adult rat Leydig cells involving mitogen-activated protein kinase. *Molecular Reproduction and Development*. 72, 208-215. 2005.
- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Acosta E, Martín-Vasallo P, Díaz-Flores L Jr. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histology and Histopathology*. 24, 909-969. 2009.
- Dobashi M., Masato Fujisawa M.D., Ichiro Naito M.D., Takafumi Yamazaki M.D., Hiroshi Okada M.D., Sadao Kamidono M.D. Distribution of type IV collagen subtypes in human testes and their association with spermatogenesis. *Fertility and Sterility*. 80, 755-760. 2003.
- Enders G.C., Kahsai Z., Lian G., Funabiki K., Killen P.D. and Hudson B.G. Development changes in seminiferous tubule extracellular matrix components of the mouse testis: $\alpha 3(\text{IV})$ collagen chain expressed at the initiation of Spermatogenesis. *Biology of Reproduction*. 53, 1489-1499. 1995.
- Faria M.J.S., Simoes Z.L.P., Lunardi L.O., and Hartfelder K. Apoptosis process in mouse Leydig cells during postnatal development. *Microscopy and Microanalysis*. 9, 68-73. 2003.
- Fawcett D.W., Neaves W.B. and Flores M.N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*. 9 (5), 500-532. 1973.
- Franca L.R., Leal M.C., Sasso-Cerri E., Vasconcelos A., Debeljuk L., and Russell L.D. Cimetidine (Tagamet) is a reproductive toxicant in male rats affecting peritubular cells. *Biology of Reproduction*. 63, 1403-1412. 2000.
- Fowler P.A., Abramovich D.R., Haites N.E, Cash P., Groome N.P., Al-Qahtani A., Murray T.J and Lea R.G. Human fetal testis Leydig cell disruption by

exposure to the pesticide dieldrin at low concentrations. *Human Reproduction*. 22, 2919-2927. 2007.

-Fröjdman K., Pelliniemi LJ and Virtanen I. Differential distribution of type IV collagen chains in the developing rat testis and ovary. *Differentiation*. 63, 125-130. 1998.

Galluzzi L., Kroener G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*. 135 (7), 1161-1163. 2008.

-Gao H.B., Tong M.H., Hu Y.Q., You H.Y, Guo Q.S., Ge R.S, Hardy M. P. Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 199, 153-163. 2003.

-Gautam D.K., Misro M.M., Chaki S.P., Sehgal N. H₂O₂ at physiological concentrations modulates Leydig cell function inducing oxidative stress and apoptosis. *Apoptosis*. 11(1), 39-46. 2006.

-Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sansson SA. Identification of programmed cell ddeath in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *Journal Cell Biology*. 119 (3), 493-495. 1992.

-Gaytan F., Bellido C., Morales C., Reymundo C., Aguilar E., Rooijen N.V. Response to Leydig cell apoptosis in the absence of testicular macrophages. *Journal of Reproductive Immunology*. 29, 81-94. 1995.

-Giannessi F., Giambelluca M. A., Scavuzzo M. C. and Ruffoli R. Ultraestructure of testicular macrophages in aging mice. *Journal of Morphology*. 263, 39-46. 2005.

-Gong Y., Wang Y., Gu M., Feng M., Zhang W. And Ge R. Deprivation of testicular innervations induces apoptosis of Leydig cells via caspase-8-dependent signalling: Anovel survival pathway revealed. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 382, 165-170. 2009.

-Guittot S.M., Vérot A., Odet F., Chauvin M and Magueresse-Battistoni B.I. A comprehensive survey of the laminins and collagens type IV expressed in mouse Leydig cells and their regulation by LH/hCG. *Reproduction*. 135, 479-488. 2008.

-Gray L.E., Klinefelter G., Kelce W., Laskey J., Ostby J., and Ewing. L. Hamster Leydig cells are less sensitive to ethane dimethanesulfonate when compared to rat Leydig cells both in vivo and in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 130, 248-256. 1995.

-Gruenwald, P. Structure of the testis in infancy and in childhood. *Archives of Pathology*. 42, 35-48. 1946.

-Grzywacz F.W., Chen H., Allegretti J., Zirkin B.R. Does age-associated Leydig cell testosterone production in brown Norway rats result from under-stimulation by luteinizing hormone?. *Journal of Andrology*. 19, 625-630. 1998.

-Gustafson A.W. Changes in Leydig cell activity during the annual testicular ciclo of the bat *Myotis lucifugus lucifugus*: Histology and lipid histochemistry. *The American Journal of Anatomy*. 178, 312-325. 1987.

-Habert R., Lejeune H., Saez JM. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 179(1-2), 47-74. 2001.

-Haider SG. Cell biology of Leydig cells in the testis. *International Review of Cytology*. 233, 181-241. 2004.

-Haider S.G., Sevos G., Tran N. Structural and histological analysis of Leydig cell steroidogenic function. En: *The Leydig cell in health and disease*. (Payne y Hardy, eds). Humana Press. New Jersey. Pág. 33-45. 2007.

-Hance MW., Mason JI., Mendis-Handagama SM. Effects of photo stimulation and nonstimulation of golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) from birth to early puberty on testes structure and function. *Histology and Histopathology*. 24(11), 1417-1424. 2009.

-Harman S.M., Tsitouras P.D. Reproductive hormones in aging men I. Measurement of sex steroids, basal luteinizing hormone, and Leydig cell response to human chorionic gonadotropin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 51(1), 35-40. 1980.

-Hardy M.P., Gao HB., Dong Q., Ge R., Wang Q., Chai W.R., Feng X and Sottas C. Stress hormone and male reproductive function. *Cell and Tissue Research*. 322, 147-153. 2005.

-Hardy M.P., Mendis-Handagama S.M.L.C., Zirkin B.R. and Ewing L.L. Photoperiodic variation of Leydig cell numbers in the testis of the golden hamster: a possible mechanism for their renewal during recrudescence. *The American Journal of Anatomy*. 178,312-325. 1987.

-Holstein AF. Interstitial cell system in the testis of the human embryo. *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft*. 64, 175-177. 1970.

-Horn R., Pastor L.M., Moreno E., Calvo A., Canteras M.and Pallares J. Morphological and morphometric study of early changes in the ageing golden hamster testis. *Journal of Anatomy*. 188, 109-117. 1996.

-Hudson BG., Reeders ST., Tryggvason K. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport Syndromes and diffuse leiomyomatosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 288, 26033-26036. 1993.

-Huerta S., Goulet E.J., Huerta-Yepez S., Livingston E.H. Screening and detection of apoptosis. *The Journal of Surgical Research*. 139, 143-156. 2007.

- Hsueh A.J., Eisenhauer K., Chun S.Y., Hsu S.Y., Billig H. Gonadal cell apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research*. 51, 433-455. 1996.
- Hutson J.C. Changes in the concentration and size of testicular macrophages during development. *Biology of Reproduction*. 43(5), 885-890. 1990.
- Hutson J.C. Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. *Cell and Tissue Research*. 267, 385-389. 1992.
- Hutson J.C. Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. *Experimental Biology and Medicine*. 231(1), 1-7. 2006.
- Ichihara I., Kawamura H., and Pelliniemi L.J. Ultrastructure and morphometry of testicular Leydig cells and the interstitial components correlated with testosterone in aging rats. *Cell and Tissue Research*. 271, 241-255. 1993.
- Johnson L., Neaves W. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules and sperm production in stallions. *Biology of Reproduction*. 24, 703-712. 1981.
- Johnson I., Matt K.S., Bartke A., Nguyen H.B., Le H.T. Effect of photoperiod on the size of the Leydig cell population and the rate of recruitment of Leydig cells in adult Syrian hamsters. *Biology of Reproduction*. 37, 727-738. 1987.
- Kaler L.W. and Neaves W.B. Attrition of the human Leydig cell population with advancing age. *Anatomical Record*. 192, 513-518. 1978.
- Kawazu S., Kishi H., Saita E., Jin W., Suzuki A.K., Watanabe G., Taya K. Inhibin secretion in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*) testis during active and inactive states of spermatogenesis induced by restriction of photoperiod. *Journal of Reproduction and Development*. 49, 87-97. 2003.

-Kerr J.B., Bartlett J.M.S., Donachie K. and Sharpe R.M. Origin of regenerating Leydig cells in the testis of the adult rat. *Cell and Tissue Research*. 249, 367-377. 1987.

-Kerr J.B., Risbridger G.P. and Knell C.M. Stimulation of interstitial cell growth after selective destruction of foetal Leydig cells in the testis of postnatal rats. *Cell and Tissue Research*. 252, 89-98. 1988.

- Kerr J.B. Ultrastructure of the seminiferous epithelium and intertubular tissue of the human testis. *Journal of Electron Microscopy Technique*. 19, 215-240. 1991.

-King K.L. and Cidlowski J.A. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual Review of Physiology*. 60, 601-617. 1998.

-Kirkwood T.B., Austad S.N. Why do we age?. *Nature*. 408(6809), 233-238. 2000.

-Kliesch S., Schweifer B., Niklowitz P., Nieschlag E., Bergmann M. The influence of LH and/or FSH on Leydig and Sertoli cell morphology after testicular involution in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*, induced by hypophysectomy or short photoperiods. *Andrología*. 23,99-107. 1991.

-Kretser D.M. and Kerr J.B. The cytology of the testis. En: *The Physiology of Reproduction..* (E. Knobil and J. Neill, eds). Raven Press, Ltd., New York. Pág. 837-931. 1988.

-Kuopio T., y Pelliniemi L.J. Patchy basement membrane of rat Leydig cells shown by ultrastructural immunolabeling. *Cell and Tissue Research*. 256, 45-51. 1989.

-Kurohmaru M., Sinha Hikim A.P., Mayerhofer A., Bartke A., and Russell L.D. Golden hamster myoid cells during active and inactive states of

spermatogenesis: correlation of testosterone levels with structure. *The American Journal of Anatomy*. 188, 319-327. 1990.

-Lee J.H., Kim H., Lee S.J. and Gye M.C. In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. *Biomaterials*. 27, 2845-2853. 2006.

-Lejeune H., Habert R. and Saez J. M. Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *Journal of Molecular Endocrinology*. 20, 1-25. 1998.

-Liang J-H., Sankai T., Yoshida T., Yoshikawa Y. Immunolocalization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) testes during postnatal development. *Journal Medical Primatology*. 30, 107-111. 2001.

-Limonta P., Dondi D., Maggi R., Martín L., Piva F. Effects of aging on pituitary and testicular luteinizing hormone-releasing hormone receptors in the rat. *Pergamon Journals*. 42, 335-342. 1987.

-Luchuan C., Leers-Sucheta S., Azhar S. Aging alters the functional expression of enzymatic and non-enzymatic anti-oxidant defense systems in testicular rat Leydig cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 88, 61-67. 2004.

-Luo L., Chen H., Trush M.A., Show M.D., Anway M.D., and Zirkin B.R. Aging and the Brown Norway rat Leydig cell antioxidant defense system. *Journal of Andrology*. 27, 240-247. 2006.

-Maekawa M., Nagano T., Murakami K., Ishikawa H., and Dezawa M. Distribution of actin-filament bundles in myoid cells, Sertoli cells, and tunica albuginea of rat and mouse testes. *Cell and Tissue Research*. 266, 295-300. 1991.

- Maekawa M., Kamimura K. and Nagano T. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of Histology and Cytology*. 59, 1-13. 1996.
- Malisan F. and Testi R. GD3 in cellular ageing and apoptosis. *Experimental Gerontology*. 37, 1273-1282. 2002.
- Mayerhofer A., Sinha Hikim A.P., Bartke A., Russell L.D. Changes in the testicular microvasculature during photoperiod-related seasonal transition from reproductive quiescence to reproductive activity in the adult golden hamster. *The Anatomical Record*. 224,495-507. 1989.
- Meinhardt A., Bacher M., Metz C., Bucala R., Wreford N., Lan H., Atkins R. And Hedger. Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biology of Reproduction*. 59, 371-378. 1998.
- Mendis-Handagama S. M. L. C., Gelber S. J. Signs of aging are apparent in the testis interstitium of Sprague Dawley rats at 6 months of age. *Tissue & Cell*. 689-699. 1995.
- Mendis-Handagama S. M. L. C., Zirkin B.R. and Ewing L.L. Comparison of components of the testis interstitium with testosterone secretion in hamster, rat, and guinea pig testes perfused in vitro. *The American Journal of Anatomy*. 181, 12:22. 1988.
- Mendis-Handagama S.M.L.C., Ariyaratne H.B.S. Differentiation of the Leydig cell population in the postnatal testis. *Biology of Reproduction*. 65, 660-671. 2001.
- Middendorff R., Davidoff M., Holstein A.F. Neuroendocrine marker substances in human Leydig cells-changes by disturbances of testicular function. *Andrología*. 25, 257-262. 1993.

-Midzak A., Chen H., Papadopoulos V and Zirkin B.R. Leydig cell aging and the mechanisms of reduced testosterone synthesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 299, 23-31. 2009.

-Miller S.C., Bowman B.M., Rowland H.G. Structure, cytochemistry, endocytic activity, and immunoglobulin (Fc) receptors of rat testicular interstitial-tissue macrophages of the rat. *Cell and Tissue Research*. 267, 385-389. 1992.

-Morales E., Pastor L.M., Horn R., Zuasti A., Ferrer C., Calvo A., Santamaría L., Canteras M. Effect of ageing on the proliferation and apoptosis of testicular germ cells in the Syrian hamster *Mesocricetus auratus*. *Reproduction, Fertility and Development*. 15 (1-2), 89-98. 2003.

-Morales E., Horn R., Pastor LM., Santamaría L., Pallarés J., Zuasti A., Ferrer C., Canteras M. Involution of seminiferous tubules in aged hamsters: an ultrastructural immunohistochemical and quantitative morphological study . *Histology and Histopathology*. 19, 445-455. 2004.

-Morales E., Ferrer C., Zuasti A., García-Borrón J.C., Canteras M., Pastor L.M. Apoptosis and molecular pathways in the seminiferous epithelium of aged and photoinhibited syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Andrology*. 28 (1), 123-135. 2007.

-Mori H, Shimizu D., Fukunishi R. and Kent Christensen A. Morphometric analysis of testicular Leydig cells in normal adult mice. *The Anatomical Record*. 204, 333-339. 1982.

-Mori H. Ultrastructure and stereological analysis of Leydig cells. En: *Ultrastructure of endocrine cells and tissues*. (Motta PM, eds). Martinus Nijhoff Publishers., Netherlands. Pág. 225-237 1984.

-Muñoz E., Fogal F., Domínguez S., Scardapone L., Gúzman J., Piezzi R.S. Seasonal changes of the Leydig cells of viscacha (*Lagostomus maximus*

maximus). A light and electron microscopy study. *Tissue and Cell*. 119-129. 1996.

-Myers R.B., and Abney T.O. Testosterone and androstenediol production by regenerating Leydig cells in the ethylene dimethane sulphonate-treated mature rat. *International Journal of Andrology*. 13, 4-16. 1990.

-Nagata K. Expression and function of Heat Shock Protein 47: a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Matrix Biology*. 16, 379-386. 1998.

Nakai A., Hirayoshi K., Saga S., Yamada K. M. and Nagata K. The transformation-Sensitive Heat Shock Protein (HSP-47) binds specifically to fetuin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 164, 259-264. 1989.

-Neaves W. B., Johnson L., Porter J.C., Parker C.R., and Petty C.S. Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. 59, 756-763. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1984.

-Neaves W. B., Johnson L., and Petty C.S. Age-related change in numbers of other interstitial cells in testes of adult men: evidence bearing on the fate of Leydig cells lost with increasing age. *Biology of Reproduction*. 33, 259-269. 1985.

-Niklowitz P., Khan S., Bergmann M., Hoffmann K. and Nieschlag E. Differential effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on Leydig cell function and restoration of spermatogenesis in hypophysectomised and photoinhibited Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Biology of reproduction*. 41, 871-880. 1989.

-Nipken C., Wrobel KH. A quantitative morphological study of age-related changes in the donkey testis in the period between puberty and senium. *Andrología*. 29, 149-161. 1997.

- Nistal M., Paniagua R., Regadera J., Santamaría L., and Amat P. A quantitative morphological study of human Leydig cells from birth to adulthood. *Cell and Tissue Research*. 246, 229-236. 1986.
- Ortega H. H., Lorente J. A. and Salvetti N.R. Immunohistochemical study of intermediate filaments and neuroendocrine marker expression in Leydig cells of laboratory rodents. *Anatomía, Histología, Embriología*. 33,309-315. 2004.
- O'Shaughnessy PJ., Morris ID and Baker PJ. Leydig cell re-generation and expression of cell signalling molecules in the germ cell-free testis. *Reproduction*. 135, 851-858. 2008.
- Paniagua R., Amat P., Nistal M. and Martín A. Ultrastructure of Leydig cells in human ageing testes. *Journal of Anatomy*. 146, 173-183. 1986.
- Paniagua R., Nistal M., Sáez F. J., and Fraile B. Ultrastructure of the aging human testis. *Journal of Electrón Microscopy Technique*. 19, 241-260. 1991.
- Pastor LM., Zuasti A., Ferrer C., Bernal-Mañás CM., Morales E., Beltrán-Frutos E., Seco-Rovira V. Proliferation and apoptosis in aged and photoregressed mammalian seminiferous epithelium, with particular attention to rodents and humans. *Reproduction in Domestic Animals*. 46(1), 155-164. 2011.
- Payer A.F. and Parkening T.A. Two types of paracrystalline inclusions in the Leydig cells of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). *Journal of Ultrastructure Research*. 83 (2), 161-167. 1983.
- Peirce E.J. and Breed W:G. Organization of testicular interstitial tissue of an Australian rodent, the spinifex hopping mouse, *Notomys alexis*. *Cell and Tissue Research*. 260, 469-477. 1990.
- Pelliniemi LJ., Niemi M. Fine structure of the human foetal testis.I. The interstitial testis. *Zeitschrift fur Zellforschung Mikroskopische Anatomie*. 99(4), 507-522. 1969.

-Pendersen LH., Stoltenberg M., Ernst E. nad West MJ. Leydig cell death in rats exposed to bismuth subnitrate. *Journal of Applied Toxicology*. 23(4), 235-238. 2003.

-Pop OT., Cotoi CG., Pleșea IE., Enache SD., Popescu FC., Enache MA., Pleșea RM. Correlations between intralobular interstitial morphological changes and epithelial changes in ageing testis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 52 (1), 339-347. 2011.

-Prince F.P. Ultrastructure of immature Leydig cells in the human prepubertal testis. *The Anatomical Record*. 209, 165-176. 1984.

-Prince F.P. An ultrastructural and immunoperoxidase study of the neonatal human testis: evidence of mature, testosterone producing Leydig cells and Leydig cell regression. *The Anatomical Record*. 211. 1985.

-Prince F.P. The triphasic nature of Leydig cell development in humans and comments on nomenclature. *The Journal of Endocrinology*. 168(2): 213-216. 2001.

-Quin D. and Lung M.A. Morphometric study on Leydig cells in capsulotomized testis of rats. *Asian Journal of Andrology*. 49-53. 2002.

-Qureshi S.J. and Sharpe R.M. Evaluation of possible determinants and consequences of Leydig cell heterogeneity in man. *International Journal of Andrology*. 16, 293-305. 1993.

-Rana B.K., Bilaspuri G.S. Changes in interstitial cells during development of Buffalo testis. *The Veterinary Journal*. 159, 179-185. 2000.

-Regadera J., Codesal J., Paniagua R., Gonzalez-Peramato P., Nistal M. Immunohistochemical and quantitative study of interstitial and intratubular

Leydig cells in normal men, cryptorchidism and Klinefelter's syndrome. *Journal of Pathology*. 164, 299-306. 1991.

-Rodriguez JP., Fernández M., Minguell JJ. Interstitial collagen synthesis by somatic testicular cells in culture. *Cell biochemistry and Function*. 9(1), 63-67. 1991.

-Rommerts F.F.G., Kühne L., Van Cappellen G.W.A., Stocco D.M., King S.R. and Jankowska A. Specific dose-dependent effects of ethane 1,2-dimethanesulfonate in rat and mouse Leydig cells non-steroidogenic cells on programmed cell death. *Journal of Endocrinology*. 181, 169-178. 2004.

-Rosenstrauch A., Weil S., Allan Degen A., and Friedländer M. Leydig Cell Functional Structure and Plasma Androgen Level during the Decline in Fertility in Aging Roosters. *General and Comparative Endocrinology*. 109, 251-258. 1998.

-Ross M.H. The fine structure and development of the peritubular contractile cell components in the seminiferous tubules of the mouse. *The American Journal of Anatomy*. 121, 523-558. 1967.

-Ross M., Kaye G., Pawlina W. Tejido conjuntivo. En: "*Histología. Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular*". Pp. 128-164. Editorial Médica panamericana S.A. 2004.

-Rubens R., Dhont M., Vermeulen A. Further studies on Leydig cell function in old age. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 39(1), 40-45. 1974.

-Ruffoli R., Giambelluca M.A., Giannessi F., Soldani P., Grasso L., Gasperi M., Giannessi F. Ultrastructural localization of the NADPH-diaphorase activity in the Leydig cells of aging. *Anatomy and Embryology*. 203(5), 383-391. 2001.

- Russell L.D., Corbin T.J., Ping Ren H., Amador A., Bartke A. and Ghosh S. Structural changes in rat Leydig cells posthypophysectomy: a morphometric and endocrine study. *Endocrinology*. 131, 498-508.2006
- Russell L.D., Ettlín R.A, Sinha Hikim A.P. and Clegg E.D. Mammalian spermatogenesis. En: *Histological and Histopathological evaluation of the testis*. pp. 1-40. (L.D. Russell and M.D. Griswold, eds.). Cache River press. Clearwater, FL. 1990.
- Saez J.M. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocrine Reviews*. Vol.15. 1994.
- Santamaría L., Martín R., Nistal, M. and Paniagua R. The peritubular myoid cells in the testes from men with varicocele: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative study. *Histopathology*. 21, 423-433. 1992.
- Santamaría L., Martín R., Codesal J. and Paniagua R. Myoid cell proliferation in rat seminiferous tubules after ischaemic testicular atrophy induced by epinephrine. Morphometric and immunohistochemical (bromo-deoxyuridine and PCNA) studies. *International Journal of Andrology*. 18, 13-22. 1995.
- Sato K., Yomogida K., Wada T., Yoriuzzi T., Nishimune., Hosokawa N. and Nagata K. Type XXVI Collagen, a New Member of the Collagen Family, Is Specifically Expressed in the Testis and Ovary. *The Journal of Biological Chemistry*. 277, 37678-37684. 2002.
- Sato M., Hirayoshi K., Yokota S., Hosokawa N., and Nagata K. Intracellular Interaction of Collagen-specific Stress Protein HSP-47 with Newly Synthesized Procollagen. *The Journal of Cell Biology*. 133, 469-483. 1996.
- Schlatt S., Kretser D.M and Hedger. Mitosis of resident macrophages in the adult rat testis. *Journal of Reproduction and Fertility*. 116, 223-228. 1999.

-Schulze C. Sertoli cells and Leydig cells in man. *Advances in anatomy, embryology and cell biology*. 88, 1-104. 1984.

-Schulze W., Davidoff M.S. and Hostein A-F. Are Leydig cells of neural origin? Substance P-like immunoreactivity in human testicular tissue. *Acta Endocrinológica*. 115, 337-377. 1987.

-Sinha Hikim A.P., Bartke A., and Russell L.D. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. *Biology of Reproduction*. 39, 1225-1237. 1988a.

-Sinha Hikim A.P., Bartke A., and Russell L.D. The seasonal breeding hamster as a model to study structure-function relationships in the testis. *Tissue and Cell*. 20(1), 63-78. 1988b.

-Sniffen, R.C. The testis I. The normal testis. *Archives of Pathology*. 50, 259-284. 1950.

-Sriraman V., Rao V.S., Sairam M.R. and Rao A.J. Effect of deprivation of LH on Leydig cell proliferation: involvement of PCNA, cyclin D3 and IGF-1. *Molecular and Cellular Endocrinology* 162, 113-120. 2000.

-Sriraman V., Sairam M.R. and Rao A.J. Evaluation of relative roles of LH and FSH in regulation of differentiation of Leydig cells using and ethane 1,2-dimethylsulfonate-treated adult rat model. *Reproductive Biomedicine Online*. 176, 151-161. 2003.

-Stanley E.L., Johnston D.S., Fan J., Papadopoulos V., Chen H., Ge R.S., Zirkin B.R., Jelinsky S.A. Stem Leydig cell differentiation gene expression during development of the adult rat population of Leydig cell. *Biology of Reproduction*. 85(6), 1161-1166. 2011.

-Svechnikov K., Landreh L., Weisser J., Izzo G., Colón E., Svechnikova I. And Söder O. Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Hormone Research in Paediatrics*. 73, 93-101. 2010.

-Swanson L. J., Desjardins C. and Turek F.W. Aging of reproductive system in the male hamster: behavioural and endocrine patterns. *Biology of Reproduction*. 26, 791-799. 1982.

-Syntin P., Chen H., Zirkin B.R., Robaire B. Gene expression in Brown Norway rat Leydig cells: effects of age and of age-related germ cell loss. *Endocrinology*. 142(12), 5277-5285. 2001.

-Tähkä K.M. Effect of differential photoperiod treatment on Leydig cell ultrastructure in the Bank Vole (*Clethrionomys glareolus*, S.). *General and comparative endocrinology*. 71, 318-330. 1988.

-Taylor M. F., Boer-Brouwer M., Woolveridge I., Teerds K.J., and Morris I.D. Leydig cell apoptosis after the administration of ethane dimethanesulfonate to the adult male rat is a Fas-mediated process. *Endocrinology*. 140, 3797-3804.1998.

-Teerds KJ, De Rooij DG, Rommerts FF, van der Tweel I, Wensing CJ. Turnover time of Leydig cells and other interstitial cells in testes of adult rats. *Archives of Andrology*. 23(2), 105-111. 1989.

-Tran N., Sevos G., Haider SG. Ultrastructure of cell contacts of fetal and adult Leydig cells in the rat: a systematic study from birth to senium. *Anatomy and Embriology*. 211 (4), 273-282. 2006.

-Triperi S., Carelli A., Perrota E., Brunelli E., Talovaro R., Facciolo RM., Canonaco M. Morphological and functional variations of Leydig cells in testis of the domestic pig during the different biological stages of development. *Journal of Experimental Zoology*. 287, 167-175. 2000.

-Troen B.R. The biology of aging. *The Mount Sinai Journal of Medicine*. 70, 3-22. 2003.

-Vandenabeele P., Galluzzi L., Vanden Berghe T., Kroemer. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Molecular Cell Biology*. 11(10), 700-714. 2010.

-Verbeke P., Fonager J., Clark B.F.C., Rattan S.I.S. Heat Shock response and ageing: mechanisms and applications. *Cell Biology International*. 25, 845-857. 2001.

-Verhoeven G., Hoeben E., Gendt K.. Peritubular cell-Sertoli cell interactions: factors involved in PmodS activity. *Andrología*. 32(1), 42-45. 2000.

-Vernon R.B., Lane T.F., Angello J.C. and Sage H. Adhesion, shape, proliferation, and gene expression of mouse Leydig cells are influenced by extracellular matrix in vitro. *Biology of Reproduction*. 44, 157-170. 1991.

-Virtanen L., Kallajoki M., Nárvánen O., Paranko J., Thornell L.E., Miettinen M., and Lehto V. P. Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filaments. *The Anatomical Record*. 215, 10-20. 1986.

-Weber M.A., Groos S., Aumüller G. And Konrad L. Post-natal development of the rat testis: steroid hormone receptor distribution and extracellular matrix deposition. *Andrología*. 34, 41-54. 2002.

-Werner G. and Moutairou K. Interstitial tissue in the testis of the giant rat, *Cricetomys gambianus*. *Journal Sumicroscopy Pathology*. 30, 537-543. 1998.

-Wing T.Y. and Lin H.S. The fine structure of testicular interstitial cells in the adult golden hamster with special reference to seasonal changes. *Cell and Tissue Research*. 183, 385-393. 1977.

-Winter J.S., Hughes I.A., Reyes F.I., Faiman C. Pituitary-gonadal relations in infancy: 2. Patterns of serum gonadal steroid concentrations in man from birth to two years of age. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*. 42(4), 679-686. 1976.

-Wright W.W., Fiore C., Zirkin B.R. The effect of aging on the seminiferous epithelium of the Brown Norway rat. *Journal of Andrology*. 14, 110-117. 1993.

-Wu N. and Murolo E.P. A Sertoli cell-secreted paracrine factor(s) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis of rat Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 106, 99-109. 1994.

-Yazama F., Esaki M and Sawada H. Immunocytochemistry of extracellular matrix components in the rat seminiferous tubule: electron microscopic localization with improved methodology. *The Anatomical Record*. 248, 51-62. 1997.

-Zirkin B.R., Chen H., Luo L. Leydig cell steroidogenesis in aging rats. *Experimental Gerontology*. 32, 529-537. 1997.

-Zirkin BR, Ewing LL, Kromann N, Cochran RC. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology*. 107(6): 1867-1874. 1980.

-Zirkin B.R., Chen H. Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biology of Reproduction*. 63(4), 977-981. 2000.

