



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR
E HISTOLOGÍA

**Alteraciones Histológicas debidas al Envejecimiento
en el Túbulo Seminífero del Hamster Sirio
(*Mesocricetus auratus*).
Cambios en la Proliferación Celular**

D. Ramón Horn Ureña

2015



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Luis Miguel Pastor García, Catedrático de Universidad del Área de Patología Humana en el Departamento de Biología Celular e Histología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Alteraciones histológicas debidas al envejecimiento en el túbulo seminífero del hámster sirio (*Mesocricetus auratus*). Cambios en la proliferación celular.”, realizada por D. Ramón Horn Ureña, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 30 de Noviembre de 2015



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. Ester Beltrán Frutos, Doctora de Universidad del Área de Patología Humana en el Departamento de Biología Celular e Histología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Alteraciones histológicas debidas al envejecimiento en el túbulo seminífero del hámster sirio (*Mesocricetus auratus*). Cambios en la proliferación celular”, realizada por D. Ramón Horn Ureña, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 30 de Noviembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

A los directores de la presente tesis doctoral, el profesor Luis Miguel Pastor García y la profesora Ester Beltrán Frutos por su apoyo durante todos estos años.

Al departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina por acogerme durante este largo periodo y en especial a los profesores Drs. Francisco Hernández Calvo, Adelina Zuasti Elizondo, Juan Francisco Madrid Cuevas, Concepción Ferrer Cazorla, José Ballesta Germán, José Ángel Martínez Menarguez, Manuel Avilés Sánchez, M^a Teresa Castells Mora y Emilio Gómez Sánchez, María Jiménez Movilla, María José Izquierdo Rico, Emma Martínez Alonso, Vicente Seco Rovira.

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

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 mi familia por su ayuda y consejos.

Los diversos aspectos tratados en la presente tesis doctoral han sido presentados en los siguientes artículos, resúmenes publicados y comunicaciones a congresos:

-Influence of histological degree of seminiferous tubular degeneration and stage of seminiferous cycle on the proliferation of spermatogonia in aged Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). Bernal-Mañas CM, Cortes S, Morales E, Horn R, Seco-Rovira V, Beltran-Frutos E, Ferrer C, Canteras M, Pastor LM. *Andrologia*. 2014 Aug; 46 (6):672-9. doi: 10.1111/and.12134.

-Involution of seminiferous tubules in aged hamsters: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative morphological study. Morales E, Horn R, Pastor LM, Santamaría L, Pallarés J, Zuasti A, Ferrer C, Canteras M. *Histol Histopathol*. 2004 Apr; 19 (2):445-55.

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

-Proliferation and apoptosis in the seminiferous epithelium in aged and photoinhibited hamster. Zuasti, A., Morales, E., Ferrer, C., Horn, R., Calvo, A., Pastor, L. M. *Molecular Biology of the Cell* 12: 234a-235a. 2001.

-Efecto del envejecimiento en la proliferación y apoptosis celular en el epitelio seminífero del hámster (*Mesocricetus auratus*). XI Congreso Nacional de Histología. (La Rábida, Huelva, 2001). E. Morales, L.M. Pastor. C. Ferrer, A. Zuasti, R. Horn.

-Alteraciones morfométricas y de proliferación de espermatogonias en el testículo envejecido de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). IX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Histología. Pamplona, 3-5 de Julio de 1997. Horn, R., Pastor, L. M., Santamaría, L, Pallares, J., Calvo, A.

- Estudio morfológico e histoquímico de la lámina propia del testículo del hámster *Mesocricetus auratus*. VIII Congreso Nacional de Histología. Editor M.A. Peinado. Horn, R., Santamaría, L, Pastor, L. M., Martín, R., Calvo, A. y Codesal, J. 123-124. 1993.

Esta tesis doctoral ha sido financiada por los proyectos de investigación de la Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia: PI-56/00866/FS/01; 04542/GERM/06; 04543/GERM/06; 19892/GERM/15.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación	3
1.2. Objetivos	9
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Alteraciones histológicas del epitelio germinal del túbulo seminífero	13
2.2 Cambios en la lámina propia	18
2.3 Cambios en las células germinales relacionados con su proliferación	22
2.4 Teorías sobre la atrofia senil del túbulo seminífero	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS	25
EXPERIENCIA 1:	27
3.1 Animales y Sacrificio	27
3.2 Microscopía de luz	27
3.2.1. Inmunohistoquímica	28
3.2.1.1.- <i>Técnica de detección de células en proliferación</i>	28
3.2.1.2.- <i>Identificación inmunohistoquímica de laminina</i>	29
3.2.1.3.- <i>Identificación inmunohistoquímica de fibronectina</i>	30
3.2.2.-Estudios semicuantitativos y morfométricos	31
3.2.2.1.- <i>Estudio histológico semicuantitativo</i>	31
3.2.2.2.- <i>Estudio de células positivas a BrdU según tipo de sección histológica de túbulo seminífero</i>	31
3.2.2.3.- <i>Morfometría testicular</i>	32
3.2.2.4.- <i>Índice de proliferación, número total de espermatogonias en proliferación y número total de espermatogonias</i>	33
3.2.2.5.- <i>Proteínas de matriz extracelular: laminina y fibronectina</i>	33
EXPERIENCIA 2:	35
3.3. Animales y sacrificio	35
3.4. Microscopía de luz	35
3.4.1.-Estudio histológico semicuantitativo	35
3.4.2.-Inmunocitoquímica	36
3.4.2.1.- <i>Técnica de detección de células en proliferación (PCNA)</i>	36
3.4.2.2.- <i>Estudio semicuantitativo de células positivas a PCNA</i>	37
3.5. Microscopía electrónica de transmisión	

(Experiencia 1 y 2)	38
3.5.1.-Ultraestructura convencional	38
3.5.2.-Estudio semicuantitativo ultraestructural del grosor de la lámina propia	38
3.6. Método Estadístico (Experiencia 1 y 2)	39
4. RESULTADOS	41
EXPERIENCIA 1:	43
4.1. Microscopía de luz	43
4.1.1.-Histología convencional	43
4.1.2.-Proteínas de matriz extracelular en la pared tubular	47
4.1.3.-Análisis cualitativo de la proliferación celular	47
4.2. Determinación semicuantitativa de los tipos de sección histológica de túbulo seminífero	51
4.3. Volumen testicular y actividad proliferativa	52
4.4. Índice de la actividad proliferativa (BrdU) por tipo de sección histológica de túbulo seminífero	53
4.5. Estudio morfométrico testicular	55
4.6. Proteínas de matriz extracelular en la pared tubular	56
4.7. Microscopía electrónica de transmisión	57
4.8. Cambios semicuantitativos del grosor de la lámina propia	65
EXPERIENCIA 2:	66
4.9. Microscopía de luz	66
4.10. Resultados semicuantitativos	66
4.10.1.-Porcentaje de tipos histológicos de sección tubular en animales de 6 y 12 meses	66
4.10.2.-Índice de proliferación total y número de espermatogonias PCNA (+) por tipo histológico de sección tubular en animales de 6 y 12 meses.	67
5. DISCUSIÓN	69
6. CONCLUSIONES	81
7. RESUMEN/SUMMARY	85
8. BIBLIOGRAFÍA	91

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación

El envejecimiento es un proceso que, aunque natural, no deja de inquietarnos, por sus consecuencias sobre nuestro organismo. Son muchos los científicos que se han dedicado, y dedican, a la investigación de sus mecanismos. Sin embargo, no se ha logrado llegar a un consenso sobre la causa última de este proceso, siendo varias las teorías que se manejan: "Teoría de la acumulación de productos de desecho"; "Teoría de la mutación genética nuclear"; "Teoría de la destrucción de las membranas por radicales libres"; "Teoría de la programación nuclear", entre otras. Éste hecho está acompañado de cambios regulares genéticos, bioquímicos, morfológicos y fisiológicos que deterioran y simplifican la estructura y función de los sistemas de vida (células, tejidos, órganos y organismos) y que da lugar a un incremento de enfermedades y la muerte. Por lo que este hecho fisiológico debe ser entendido como una compleja serie de cambios en el organismo que da lugar a un incremento en la probabilidad de muerte (Zahidov et al., 2010). Algunos autores como Kirkwood and Austad, 2000 definen el envejecimiento 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.

El envejecimiento en el hombre parece estar acompañado por una senescencia reproductiva que se asociaría con un estado crónico de stress oxidativo seguido de un déficit funcional tanto en células germinales, células de Leydig y células de Sertoli (Hamden et al., 2008). La edad media en que la mujer occidental empieza a tener descendencia está aumentando y éste hecho está asociado con una menor probabilidad de concepción en relación a la edad materna, incremento de abortos espontáneos y alto riesgo obstetricio (Wilding, 2015). En mamíferos, la fertilidad femenina disminuye con la edad en parte por una pérdida progresiva de folículos ováricos (Roosa et al., 2015). Actualmente la edad del progenitor masculino está tomando mayor protagonismo. La avanzada edad masculina también produce una disminución de la calidad del esperma, de la propia fertilidad así como la posible transmisión de ciertas enfermedades (Gueresi et al., 2013; Ozkosem et al., 2015). Por este motivo el envejecimiento del testículo está volviendo a ser estudiado con interés desde diversos puntos de vista: cambios endocrinos, participación de los telómeros en el envejecimiento de las células germinales, papel del stress oxidativo, aplicaciones de terapias antienvjecimiento, aplicación de terapias sustitutivas de testosterona a hombres mayores, determinación de parámetros seminales con la edad etc.

Así, por ejemplo en hombres viejos, la producción de esperma es más baja y aumenta el daño en el ADN espermático si lo comparamos con hombres jóvenes (Johnson et al., 2015). Estudios cuantitativos de parámetros espermáticos en hombres de 35 años frente a hombres de 55 años muestran que la movilidad del esperma y el volumen de semen están inversamente relacionados con la edad, mientras que la concentración de esperma no está afectada (Johnson et al., 2015). Además nuestro cuerpo genera enormes cantidades de especies de oxígeno reactivo (ROS). El aumento de ROS induce daño celular a través de peróxidos de lípidos durante el envejecimiento. Éste es inducido por el stress oxidativo que puede causar cambios en la fisiología y perturbaciones bioquímicas que probablemente afectan al tejido testicular lo que lleva al desarrollo de la infertilidad masculina (Rajesh and Muralidhara, 2002). Este stress oxidativo parece causar deterioro de las enzimas

esteroidogénicas, e incrementa la peroxidación lipídica en el testículo en las células de Leydig, por ejemplo, en ratas viejas Rajeswary et al., (2007).

Los estudios histológicos sobre el envejecimiento testicular se iniciaron hace bastantes años. Así en hombres se ha demostrado que la edad está asociada con una disminución en el número de células de Leydig y de Sertoli, espesor de la pared tubular y un incremento en la parada de las divisiones de las células germinales (Tsitouras 1987). Otros cambios específicos relacionados con la edad en la estructura de los túbulos seminíferos han sido estudiados en algunos mamíferos incluido el hombre (Paniagua et al., 1986, 1987, 1991,; Johnson et al., 1986 a,b, 1988), el burro (Nipken and Wrobel, 1997), la rata (Wright et al., 1993; Levy et al., 1999) y el hámster (Horn et al., 1996). Estos estudios son principalmente de carácter semicuantitativo y salvo algunos de ellos realizados en el hombre y en la rata no estudian de forma morfométrica el impacto del envejecimiento sobre todo el túbulo seminífero. Tampoco los trabajos de carácter ultraestructural son muy numerosos y estos se centran principalmente en la rata y el hombre (Paniagua et al.,1991, Wright et al., 1993).

La bibliografía existente sobre el túbulo seminífero es amplia, permitiendo caracterizar los tipos de lesión encontrados durante el envejecimiento, y la comparación con los que aparecen en multitud de patologías que afectan a este órgano, que, en algunos casos, son semejantes a los hallados en el envejecimiento. Hay también trabajos sobre el envejecimiento en el testículo que atribuyen el origen de las lesiones que se observan durante el envejecimiento testicular a diversos factores como: vasculares, descensos o alteraciones endocrinas, genéticos, o alteraciones en la función de algún tipo celular concreto (espermatogonias, Sertoli, espermatozoido, mioide, etc.) (Paniagua et al., 1991).

Así, en estos últimos años ha aumentado el interés por conocer la base celular de las modificaciones que sufre el túbulo seminífero con la edad, estudiándose la dinámica celular existente con el paso de los años entre el

proceso de proliferación celular y muerte celular. En el epitelio seminífero el equilibrio entre proliferación y muerte celular puede explicarnos las alteraciones que éste sufre en diferentes situaciones como: la criptorquidia, la exposición a radiaciones, tóxicos, drogas y fármacos, así como también, las modificaciones estacionales y aquellas relacionadas con las diferentes etapas de la vida, incluidas el desarrollo y la vejez (Dunkel et al., 1997; Blottner et al., 1999; Kimura et al., 2003; Bernal-Mañas et al., 2005, Pastor et al., 2011, Seco-Rovira et al., 2015). De hecho algunos autores manifiestan que el envejecimiento testicular estaría acompañado de una disminución de la proliferación y un incremento de la apoptosis que ocurriría en estados específicos del ciclo seminífero siendo considerada una de las causas de la involución testicular (Morales et al., 2007). Aun así, respecto al descenso de la proliferación de espermatogonias en el epitelio seminífero con la edad en la actualidad no hay una clara evidencia con respecto a si la proliferación disminuye en la espermatogonia por ella misma o si esto es debido a una alteración en el microambiente que la rodea, siendo esta cuestión objeto de debate (Pastor et al., 2011).

Esto mismo ocurre con las modificaciones que sufre la pared tubular con la edad y su influencia sobre el epitelio seminífero. Son varios los estudios que apuntan a la participación de esta estructura en el proceso de involución del epitelio seminífero con la edad como lo es en diversas situaciones patológicas. Sin embargo no hay una evidencia clara de un efecto directo de la pared tubular sobre el epitelio seminífero durante el envejecimiento así como también de que ésta realmente sufra modificaciones (Xia et al., 2012).

El hámster es un animal que ha sido ampliamente usado como modelo de investigación de la histología testicular tanto en condiciones normales o cuando sufre regresión testicular por fotoperiodo corto (Seco-Rovira et al., 2015). Esta especie tiene la particularidad de que tanto sus parámetros hormonales hipofisarios como testiculares no se alteran con la edad (Swanson et al., 1982, Calvo et al., 1995, 1997, 1999) y su intersticio como sus células de Leydig sufren pocos cambios en el envejecimiento (Beltran-Frutos et al., 2014, 2015) por lo que las alteraciones del epitelio seminífero con la edad pueden considerarse de

carácter primario (Horn et al.,1996). En el mismo, hasta la fecha, no se ha realizado un estudio histológico de microscopía de luz, ultraestructural y morfométrico completo del envejecimiento del túbulo seminífero, no se ha determinado el papel que pueda tener la pared tubular en dicho proceso y es susceptible de ser utilizado para indagar con más profundidad la relación entre la disminución de la proliferación celular de las espermatogonias con los cambios histológicos que acontecen en el envejecimiento del epitelio seminífero.

1.2.-Objetivos

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

1.-Realizar una descripción histológica del túbulo seminífero en el hámster *Mesocricetus auratus* a los 6, 12 y 24 meses determinando semicuantitativamente los tipos de secciones tubulares observadas.

2.-Realizar un estudio morfométrico testicular en animales de 6 y 24 meses mediante el análisis de diferentes parámetros testiculares como: la determinación del volumen testicular, densidad de volumen de los túbulos seminíferos, volumen de los túbulos seminíferos, longitud total de los túbulos seminíferos, diámetro medio tubular, diámetro medio de la luz y volumen del epitelio seminífero con el fin de observar cambios en ellos debidos al envejecimiento.

3.-Determinar la actividad proliferativa total en el epitelio seminífero así como la relacionada con el tipo histológico de sección de túbulo seminífero y su posible cambio con la edad

4.-Determinar los cambios en el volumen de las proteínas laminina y fibronectina de la pared tubular con la edad mediante el uso de la inmunohistoquímica y su cuantificación morfométrica.

5.-Estudiar la ultraestructura del túbulo seminífero y sus posibles cambios con la edad tanto en el epitelio seminífero como en la pared tubular.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Alteraciones histológicas del epitelio germinal del túbulo seminífero

Los primeros cambios histológicos observados con el envejecimiento se relacionan con la disminución en el número de espermatoцитos en fase de paquitene en los animales de mediana edad (12 meses) (Horn et al., 1996). Posteriormente, se observa un incremento del porcentaje de las secciones tubulares con cambios histológicos, que aparecen de forma focal y se van incrementando con la edad, alternando los túbulos atróficos con otros aparentemente normales. Las alteraciones van desde la pérdida total de células germinales (esclerosados en el caso de testículos humanos), túbulos con sólo células de Sertoli o con detención de la espermatogénesis, hipoespermatogénesis y descamación de células germinales (Horn et al., 1996). Esta gran variabilidad entre túbulos también es observada también por Gosden et al., (1982) en el ratón. Por el contrario, Wright *et al.*, (1993) observaron en rata un descenso mayor de los túbulos normales del 95 al 15 % en los animales viejos, y un aumento de los túbulos completamente atróficos que pasaban del 0 % observado en los jóvenes al 78 % en los viejos. Levy et al., (1999) también encuentran en ratas envejecidas un marcado incremento en el número de túbulos atróficos. Los hallazgos de Nipken and

Wrobel (1997) en burro son también coincidentes en este sentido, observando que los túbulos seminíferos de este animal sufren una gradual regresión con disminución en la altura del epitelio seminífero y en el diámetro tubular.

En el hámster existe una disminución del diámetro del túbulo seminífero, incremento de la luz tubular, disminución de la altura del epitelio germinal y disminución del número de células de Sertoli (Horn et al., 1996). En cuanto a los espermatoцитos, se ha observado en el hombre que con el envejecimiento aparecen multinucleaciones y, consecuentemente, aumenta la degeneración de estas células (Miething, 1993; 1995). En la línea germinal se observa una disminución en el número de espermatoцитos en general o en fase de paquitene relacionados con la edad así como una disminución posterior del número de espermátidas. En el caso del hombre la disminución más importante se produce durante la transición de espermatoцитos tempranos (leptotene) a tardíos (paquitene) (Johnson et al., 1987). Otra forma de degeneración asociada al envejecimiento testicular es la aparición de espermatoceles o acumulaciones de semen en el tracto reproductivo (Itoh M. et al., 1999).

Morfométricamente en el hombre se ha determinado la densidad de volumen de varios parámetros testiculares entre hombres entre 20 a 40 años y otros de 50 a 90 años. El peso testicular, el volumen total de túbulo y epitelio seminífero y la longitud del mismo disminuyen significativamente en el grupo de más edad. También la densidad de volumen y espesor de la pared tubular esta incrementada con la edad aunque el volumen total de pared tubular no resulto con un aumento significativo con la edad. Para estos autores el incremento del espesor de la pared sería debido a la reducción de la longitud del túbulo (Johnson et al., 1986). También observan una disminución del número de células de Sertoli con la edad. De una manera semicuantitativa más recientemente se han realizado estudios similares en el hombre. En éste, apreciándose una fuerte diferencia interindividual, se encuentra una disminución significativa en el grupo de viejos de las células de Sertoli, espermatoцитos y espermatozoides por túbulo con un aumento en el grosor de la lámina basal. Junto a esto se observa que la tasa de aneuploidía en los

sujetos de mayor edad (61-95 años), con la espermatogénesis conservada, no es estadísticamente diferente a la que se encuentra en el grupo control, pero si esta aumentada en los sujetos de edad avanzada y con detención de la espermatogénesis (Dakouane et al., 2005.). En otro estudio se observó que el número de células de Sertoli por túbulo en los grupos de edad fue significativamente más bajo que en los controles. En cambio las relaciones de las células de Sertoli con espermatogonias y espermatocitos primarios no lo fueron. Contrariamente a esto las relaciones con espermátidas redondas y elongadas en los hombres de edad avanzada fueron menores en comparación con los hombres jóvenes. El envejecimiento según este estudio tiene una influencia negativa en la espermatogénesis, y el deterioro de la misma es evidente a partir de las espermátidas (Jianj et al., 2014).

Las células de Sertoli parecen sufrir cambios importantes con la edad, que pueden afectar a la interacción de éstas con las células germinales. Así, por un lado, en la rata Brown Norway los testículos envejecidos sufren un aumento en la expresión de los RNA-m de la transferrina (18 a 24 meses) y una disminución del RNA-m de la proteína del ciclo 2(cp-2) / catepsina L, mientras que el ARN-m del SGP-2 permanece constante. Este hecho ha llevado a estos autores a afirmar que el proceso de envejecimiento testicular en esta rata no está causado por factores vasculares, sino que tal envejecimiento parece estar causado por un factor intrínseco al epitelio seminífero. En concreto, la edad produce una alteración de la función de las células de Sertoli, alteración que no parece va acompañada por la muerte de este tipo celular. En estudios posteriores estos mismos autores determinaron que las alteraciones entre las células de Sertoli y las células germinales se manifiestan no sólo por una disminución en la expresión de ARN-m de cp-2 / catepsina L en el testículo, sino también por un aumento de esta proteína asociada a células germinales en apoptosis en los túbulos atrofiados (Kim et al., 1997).

También, se ha abordado el estudio de las alteraciones de la célula de Sertoli con la edad mediante el análisis de posibles modificaciones del citoesqueleto de esta célula. Así, en ratón, mediante técnicas

inmunocitoquímicas, ha sido posible observar una alteración importante en el patrón de distribución espacial de los microfilamentos de actina y los filamentos intermedios de vimentina, desapareciendo la polaridad en estos segundos. Esto último, según estos autores, podría relacionarse con un déficit en la estimulación *de FSH* (Tanemura, et al., 1994). Así mismo, tanto en el ratón como en el hombre se aprecia una inmunorreactividad a citoqueratinas en las células de Sertoli de individuos viejos, indicando una reexpresión de este filamento intermedio que es detectado en las células de Sertoli durante el periodo fetal (Tanemura et al., 1994, De Miguel., 1997).

En el hombre se ha observado un incremento del almacenamiento citoplasmático de gotas lipídicas y de glucógeno (Lynch and Scott, 1950). También se han descrito multinucleaciones y otras anormalidades ultraestructurales en las células de Sertoli en el hombre envejecido (Holstein et al., 1987; Paniagua et al., 1985; Schultze and Schütte, 1990), así como un declive en su número (Harbitz, 1973 a; Jonson et al., 1984 b; Paniagua et al, 1987 b). En este sentido, Johnson et al., (1986) observó que la disminución en el número de las células de Sertoli es proporcional a la de las células germinales, al no observarse cambio en la relación de células germinales / células de Sertoli.

Junto a estos trabajos realizados en el hombre, en la rata Norway-Brown se ha realizado un estudio morfométrico comparando animales jóvenes con envejecidos y viejos. En él se encuentra un descenso significativo del diámetro tubular, longitud del túbulo, volumen tubular y de la luz, e intersticio testicular solo en los animales viejos. Junto a esto observan un descenso en el número total de células de Sertoli en animales envejecidos y viejos respecto a jóvenes (Wang et al., 1993).

En el hombre, Paniagua et al., (1991) realizó un exhaustivo estudio de los cambios ultraestructurales que se producen con la edad. Observó las alteraciones de los túbulos seminíferos, en individuos de 50 a 89 años, lo cual permite estudiar los pasos que se producen en el deterioro progresivo del testículo con la edad, y que llevan hasta la completa esclerosis tubular. Estos

pasos se pueden observar en distintos testículos e incluso en diferentes regiones de un mismo testículo, poniendo de manifiesto la gran variabilidad existente, tanto regional como entre individuos. Los estadios que observan son: túbulos con moderada o marcada hipoespermatogénesis, túbulos con detención de la maduración a nivel espermatocítico, túbulos con detención de la maduración a nivel de espermatogonía, y por último túbulos esclerosados. El primer signo de atrofia testicular consiste en la aparición de anomalías ultraestructurales en las células germinales. Las alteraciones más abundantes se observan en las espermatidas, consistentes en degeneración celular y multinucleación fundamentalmente. También se observan vacuolaciones en el epitelio, resultantes probablemente de la exfoliación prematura de células germinales. También hallan alteraciones importantes de las células de Sertoli con formación de vacuolas, acumulación de lípidos (grandes vacuolas electrotransparentes y otras pequeñas gotas electrodensas) y metaplasia mitocondrial.

Levy et al., (1999) estudiaron las alteraciones ultraestructurales que se producían con la edad en la barrera hematotesticular en el testículo de rata. Para comprobar la integridad de la barrera hematotesticular utilizaron nitrato de lantano como contraste. Observaron que las típicas uniones intercelulares entre células de Sertoli eran más escasas en los testículos viejos, y que el lantano pasaba por los espacios intercelulares hasta la luz tubular. Por otra parte, hallaron en las ratas viejas, grandes espacios intercelulares, resultado de la pérdida de células germinales, y una pérdida completa de variaciones cíclicas en los orgánulos de las células de Sertoli, cuyos núcleos poseían una forma más irregular que en los animales jóvenes. Asimismo, encontraron cambios en el retículo endoplásmico, con pérdida de vesiculaciones y anastomosis, siendo, por tanto, más sencillo que en los animales jóvenes. Recientemente se ha estudiado la expresión genética de diversas proteínas de unión en el epitelio seminífero envejecido –en concreto en los espermatocitos- de la rata Norway. La expresión de GTPasas y proteínas de unión/adhesión disminuye, provocando un colapso gradual de la barrera hematotesticular que probablemente permitirá el paso de sustancias potencialmente nocivas de las células germinales (Paul and Robaire, 2013).

Por último, también han sido estudiados los cambios histológicos en algunos animales con senescencia acelerada. Los primeros signos de cambios regresivos en la estructura histológica supone en los ratones SAMP1 de seis y siete meses que en la mayoría de los túbulos se observe: desintegración, separación del epitelio seminífero de la membrana basal y la presencia de células germinales con picnosis nuclear y vacuolización citoplasmática. En los animales de mayor edad (9-10 Y 12-15 meses), se observan células atípicas (Zakhidov et al., 2001).

2.2. Cambios en la lámina propia

Los túbulos seminíferos de vertebrados están rodeados por una “lámina propia”, una barrera permeable para sustancias que penetran al túbulo seminífero procedentes del intersticio (Fawcett et al., 1970), formada principalmente por miofibroblastos, fibroblastos, fibras de colágeno, sustancia fundamental y una lámina basal en la que descansa el epitelio seminífero (Burgos et al., 1970).

En el hombre adulto sano, la lámina propia juega un papel esencial en el mantenimiento de la cohesión estructural de los túbulos seminíferos y es también un componente de la barrera hemato-testicular. Las células peritubulares representan el principal tipo celular de la lámina propia (Volkman et al., 2011). La interacción entre las células peritubulares y las células de Sertoli y entre las células peritubulares y las células de Leydig son importantes para la regulación del funcionamiento de los túbulos seminíferos. En el hombre, la lámina propia contiene de 3 a 6 capas de células peritubulares (Xia et al., 2012), por el contrario en roedores la lámina propia está formada normalmente por una sola capa de células peritubulares (Albrecht et al., 2009).

Las células peritubulares que rodean los túbulos seminíferos son responsables de la contracción tubular y del transporte del esperma. El control de la propulsión testicular del fluido y del esperma debe jugar un papel muy

importante en los casos de infertilidad masculina (Albrecht et al., 2009). No son solamente un componente estructural principal de los túbulos seminíferos, también secretan activamente mediadores paracrinos, influyendo en la homeostasis del medio ambiente testicular (Xia et al., 2012).

En la lámina propia humana, los miofibroblastos (células peritubulares) expresan actina, desmina, miosina, GB42, vimentina, CD90 así como colágeno I, IV, XIII, fibronectina, laminina (Volkman et al., 2011).

Las alteraciones de las células peritubulares probablemente son las responsables de un incremento en el espesor de la lámina propia en varias enfermedades testiculares como el síndrome de Klinefelter's, por un aumento en la secreción de componentes de la matriz extracelular (Santamaría et al., 1995). En algunos desórdenes testiculares asociados con la eliminación de células germinales, el diámetro tubular disminuye mientras que la lámina propia tubular sufre un engrosamiento que finaliza en una esclerosis tubular completa (Priyono and Schirren, 1985; Söderstrom, 1986). La infertilidad masculina está asociada con la parada de la espermatogénesis y alteraciones de la lámina propia, así como con el espesor por acumulación de matriz extracelular (Volkman et al., 2011). Un aumento en el espesor de la lámina propia mayor de 10 μm con un incremento en la matriz extracelular ha sido observado en pacientes con azoo- y oligozoospermia, en pacientes que sufren criptorquidismo, seminoma, varicocele o síndrome de Klinefelters's y después de un tratamiento largo con estrógenos (Volkman et al., 2011).

Desde un punto de vista morfológico se ha identificado en algunas especies como el burro y la rata un engrosamiento y un perfil irregular de la lámina basal en los túbulos seminíferos de animales envejecidos (Nipken and Wrobel, 1997; Richardson et al., 1995). También en el caso del hombre se ha descrito un progresivo ensanchamiento de la lámina propia que es máximo en los túbulos esclerosados y que se relaciona con una depleción del epitelio germinal (Johnson et al., 1986; Paniagua et al., 1987). Así mismo, se han encontrado plegamientos de la lámina basal en dirección al epitelio seminífero, con un aumento de fibras de colágeno y de células peritubulares por sección tubular.

En el ratón no se observan cambios en los parámetros estudiados en células peritubulares con la edad por lo que parece que los cambios relacionados con la edad en estas células se centran en la función y no en el número (Xia et al., 2012). En el hombre el número de células peritubulares por testículo permanece constante con respecto a los individuos jóvenes, aunque el número de éstas que presentan inmunorreactividad a actina y desmina, disminuye (Arenas et al., 1997). El número de células reactivas a vimentina por sección tubular aumenta, encontrándose éstas situadas en la capa más exterior de la lámina propia (lo que hace suponer que se trate de fibroblastos), aunque no se observa un aumento significativo en cuanto al nº total de estas células por testículo. En la capa más interna de la lámina propia es donde se encuentra la inmunorreactividad a desmina, sugiriendo esto la presencia de células mioideas, disminuyendo su número de una manera paulatina con la esclerosis (Arenas et al., 1997). Estos resultados plantean una posible desdiferenciación de las células peritubulares a fibroblastos lo que conllevaría un incremento del tejido conjuntivo responsable de la hialinización de la lámina propia durante el envejecimiento testicular humano. Por el contrario, más recientemente otros autores como Volkman et al., (2011) indican en sus estudios que la desdiferenciación de los miofibroblastos no es la responsable de la parada de la espermatogénesis asociada con las alteraciones de la lámina propia. Aún así considera que los miofibroblastos deben contribuir a la parada de la espermatogénesis durante el desarrollo de las alteraciones de la fibrosis de la lámina propia pero no por la disfunción contráctil de los mismos (Volkman et al., 2011)

Los estudios sobre el incremento de matriz extracelular en la lámina propia en mamíferos parecen indicar que no existe un incremento en la producción en los testículos envejecidos. Así, la expresión de genes para las proteínas de matriz extracelular: laminina, colágeno IV o fibronectina, no están incrementadas con la edad, pudiendo deberse el engrosamiento de la lámina basal no a un aumento de síntesis sino a un depósito paulatino durante el envejecimiento (Richardson et al., 1995). Además, apoyando estos hechos, en el burro (Nipken and Wrobel, 1997) observan un descenso de la densidad de volumen en túbulos seminíferos, acompañado de un engrosamiento de la

lámina propia con proyecciones de su lámina basal hacia el epitelio. También existe un incremento de la densidad de volumen de las células peritubulares y del colágeno, así como un incremento del volumen intersticial, lo que sugiere un retraimiento de los túbulos seminíferos (Nipken and Wrobel, 1997). Con microscopía de luz y electrónica en el hombre se ha observado que el espesor de la lámina basal disminuye aparentemente con la edad mientras que la lámina propia presenta cambios degenerativos extremadamente variables, como un mosaico, distribución focal y no hay una tendencia de avance con el envejecimiento (Pop et al., 2011). Por otra parte, en la rata Wistar, la lámina propia aparece más engrosada con el envejecimiento, encontrándose numerosos paquetes de fibrillas de colágeno entre esta lámina basal engrosada y la delgada membrana plasmática de las células mioideas peritubulares (Ichihara et al., 1993). Así mismo, en el hámster sirio durante el envejecimiento se ha observado una mayor cantidad de tejido conjuntivo entre las células peritubulares y la lámina basal (Beltrán-Frutos et al., 2015).

El espesor de la lámina propia debido al envejecimiento encontrado en estudios morfométricos en testículo humano se ha atribuido a una reducción en la longitud tubular más que a un incremento de la lámina propia (Johnson et al., 1986, 1988) aunque Richardson et al., (1995) sugieren que el incremento en el espesor de la lámina propia puede ocurrir en túbulos individuales previamente a la degeneración de epitelio seminífero y al encogimiento del túbulo. Por último, cabe indicar que el posible incremento del tejido conjuntivo peritubular podría estar producido por una alteración del equilibrio mutuo de influencias entre las células de Sertoli y las células peritubulares, aunque también las alteraciones en las células de Leydig podrían afectar este fenómeno al actuar éstas sobre las células de Sertoli (Arenas et al., 1997). No está claro, pues, en la actualidad si existe una relación causal entre el engrosamiento de la lámina propia y la depleción del epitelio seminífero con la edad.

2.3 Cambios en las células germinales relacionados con su proliferación

Aunque existe cierta controversia hay algunas pruebas que relacionan la proliferación de las espermatogonias con los cambios del epitelio seminífero durante el envejecimiento. Algunos autores apuntan la posibilidad de una disminución en el número de espermatogonías en proliferación y un aumento de su apoptosis (Nipken and Wrobel, 1997), aunque no presenten datos cuantitativos sobre esta posible relación. Junto a esto hay alguna información un tanto fragmentaria. Por un lado, ha sido descrita una disminución de las espermatogonías por área en el testículo humano relacionada con el envejecimiento (Nistal et al. 1987). Además, se ha observado que entre animales jóvenes y envejecidos existe una disminución del índice de espermatogonías en proliferación. Así los estudios realizados en roedores, como el *Octodon degus*, han revelado que el índice de proliferación de espermatogonias tipo A en los animales jóvenes es del 27,4%, cayendo a 11,3% en los animales viejos (Obregón et al.1997). Entre las alteraciones relacionadas con la edad de la espermatogénesis en los hombres de 65-93 años de edad reportadas por Holstein et al, (1987), este autor indica que hay una reducción en las espermatogonias oscuras y pálidas en el 70% de las secciones testiculares, (Holstein. et al. 1987). Además, la identificación inmunohistoquímica del antígeno de proliferación celular (PCNA) en ratas indica una disminución en el número de células positivas PCNA con la edad (Salama et al., 1998). Sin embargo, estudios posteriores realizados en ratas parecen mostrar que las espermatogonias madre tienen una actividad proliferativa aparentemente normal en los testículos envejecidos, lo que sugiere que la posible causa de la pérdida de células germinales durante el envejecimiento sea el proceso de apoptosis (Schoenfeld et al. 2001). En contraste con esto, en un estudio de la expresión de Ki-67 en el hombre, se ha observado una disminución en el porcentaje de proliferación de espermatogonias en las personas de edad con respecto a las jóvenes (Kimura et al., 2003). Mas recientemente, algunos estudios han demostrado que el envejecimiento afectaría al entorno de células somáticas como también a la actividad de las espermatogonias madre (Zhang et al., 2006), mientras que

otros autores sugieren que la infertilidad en ratones envejecidos es resultado del deterioro del nicho de espermatogonias madre y la falta de un equilibrio adecuado entre auto-renovación de células madre y diferenciación (Ryu et al., 2006). En esta línea última estarían los estudios del testículo de *Drosophila* que muestran como cambios en los sistemas de regulación del nicho de células madre son determinantes en el envejecimiento del mismo (Boyle et al., 2007) aunque no se descarta cambios intrínsecos en las propias células madre con la edad (Inaba et al., 2011). Por último, en recientes estudios en ratón se observa que la población de espermatogonias más reducida por la edad es la de las diferenciadas. La detención de la diferenciación de las espermatogonias estaría mediada por la proteína de “finger zinc” de la leucemia promielocítica (Plzf) (Ferder and Wang, 2015).

2.4. Teorías sobre la atrofia senil del túbulo seminífero.

Como es lógico las teorías para explicar el envejecimiento testicular hacen hincapié en una u otra lesión como origen de éste, no estando todavía clara la sucesión de eventos que llevan a la progresiva atrofia del epitelio seminífero. En síntesis se podría hablar de dos teorías que, aunque un tanto opuestas, pueden ser correctas según la especie estudiada. Por una lado, la que considera que el primer defecto se produce en el eje hipotalámico-hipofisario con una influencia posterior en un déficit de síntesis de testosterona que afectaría a la depleción del epitelio seminífero, y por otro la que considera que el envejecimiento causaría un déficit intrínseco en la función de las células de Sertoli y de Leydig que conllevaría dicha depleción con la participación de la pared tubular. Por último, algunos autores, como se ha descrito, indican la posibilidad de que junto a estas alteraciones el proceso de involución del túbulo seminífero esté causado también, por una disminución en el número de espermatogonias proliferantes aunque no existe un acuerdo sobre si la disminución de esta proliferación es sólo debido a una alteración del microambiente de las espermatogonias madre o si el propio envejecimiento también afecta directamente a la actividad proliferativa de las mismas (Johnson et al., 1986 a,b, Paniagua et al., 1991, Pastor et al., 2011).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

EXPERIENCIA 1:

3.1. Animales y Sacrificio

Se utilizaron un total de 13 hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*), distribuidos en dos grupos. Un grupo de seis animales de 6 meses (control) y otro de 7 animales de 24 meses (viejos). 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.

Se inoculó intraperitonealmente a los animales el reactivo RPN 201 del kit de Amersham conteniendo 5-bromo-2-deoxiuridina y 5-fluoro-2-deoxiuridina, a razón de 1 ml por cada 100 g de peso del animal. Posteriormente, a las dos horas de la inoculación, los animales fueron pesados y sacrificados. El sacrificio se realizó en una cubeta desecadora con pastillas de CO₂ según la normativa vigente en ese momento sobre protección de animales de laboratorio (R.D. 1204/2005). Posteriormente se pesó al animal y se abrió el escroto, para extraer los testículos midiendo en cada uno de ellos su diámetro mayor, menor y oblicuo. Antes de iniciar el procesamiento se pesaron los testículos por separado en una balanza Mettler PS 360.

3.2. Microscopía de luz

Los testículos izquierdos que iban a ser usados para los estudios con microscopía de luz se fijaron en methacarn (metanol: cloroformo: ácido acético, 6:3:1) durante 8 horas. 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 paraplás 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. El factor de retracción del tejido se calculó a partir de cortes de testículo teñidos con hematoxilina eosina. Se tomaron cinco cortes transversales máximos de cada testículo y con el analizador de imagen Micron se hallaron sus diámetros equivalentes y se compararon con los diámetros menores de los testículos hallados en fresco. A partir de la media de las diferencias existentes entre los diámetros en fresco y fijados se halló el factor de retracción 1,2 que es el que se usó como factor de corrección para todas las medidas.

3.2.1.- Inmunohistoquímica

3.2.1.1.-Técnica de detección de células en proliferación (BrdU)

Después de realizar el proceso de fijación, inclusión en parafina y obtención de las secciones, como hemos descrito anteriormente, se llevó a cabo el siguiente protocolo inmunohistoquímico en 4 secciones de cada animal previamente seleccionadas al azar:

- a) Desparafinación en xilol e hidratación en alcoholes (100%, 96% y 70%).
- b) Rehidratación de las muestras mediante tres lavados de 5 minutos en PBS
- c) Incubación durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal anti-BrdU de ratón, en concentración 1:100, en una solución conteniendo TBS/BSA al 1%, cloruro de magnesio y nucleasa para la desnaturalización del DNA
- d) Tres lavados de 5 minutos en PBS
- e) Incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con peroxidasa anti-ratón IgG₂ en concentración 1:60 en PBS/BSA
- f) Tres lavados de 5 minutos en PBS

g) Inmersión durante 5 minutos en la solución de revelado con diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co) al 0.05% y 3% de peróxido de hidrógeno

h) Lavado tres veces en agua destilada y contraste con hematoxilina

i) Deshidratación en alcoholes crecientes, lavado en o-xilol y montaje de las preparaciones con DPX.

3.2.1.2.- Identificación inmunohistoquímica de laminina

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) Predigestión enzimática del tejido, con pepsina al 0,1 % a 37 °C en CIH 0,01 N durante 3 minutos

f) Incubación en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario conejo anti-laminina (Eurodiagnostic, Amsterdam, Netherlands) diluido en PBS/BSA 1:40 al 1%.

g) Tres lavados de 5 minutos en PBS.

h) Incubación con inmunoglobulina de cabra anti-conejo biotinilada (Chemicon International, AP132B) durante 30 minutos a temperatura ambiente, en una solución PBS/BSA 1:400 al 1%.

i) Tres lavados de 5 minutos en PBS.

j) 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%.

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 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

3.2.1.3.-Identificación inmunohistoquímica de fibronectina

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.
- o) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- p) Predigestión enzimática del tejido, con pepsina al 0,1 % a 37 °C en CIH 0,01 N durante 3 minutos
- q) Incubación en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario conejo anti-fibronectina (Biogenex, Dublin, U.S.A.) diluido en PBS/BSA 1:400 al 1%.
- r) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- s) Incubación con inmunoglobulina de cabra anti-conejo biotinilada (Chemicon International, AP132B) durante 30 minutos a temperatura ambiente, en una solución PBS/BSA 1:400 al 1%.
- t) Tres lavados de 5 minutos en PBS.

- u) 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%.
- v) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- w) Inmersión durante 3 minutos en una solución de TBS con H₂O₂ y diaminobenzidina (DAB).
- x) Lavado en agua y contraste con hematoxilina.
- y) 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.

3.2.2.- Estudios semicuantitativos y morfométricos

3.2.2.1.- Estudio histológico semicuantitativo

Para los análisis semicuantitativos, el grado histológico de degeneración de secciones tubulares fue clasificado en 5 categorías:

- 1) Secciones túbulares normales
- 2) Secciones túbulares hipoespermatogénicas caracterizadas por una disminución en el espesor del epitelio seminífero que contiene todos los tipos celulares de la línea germinal y ocasionalmente con descamación de células germinales
- 3) Secciones de túbulos en parada o detención donde el epitelio seminífero muestra áreas hipoespermatogénicas unidas a otras con parada en la maduración de la línea germinal, predominantemente a nivel de espermatocitos
- 4) Secciones de túbulos que contienen sólo espermatogonias y células de Sertoli en el epitelio seminífero
- 5) Secciones túbulares con solamente células de Sertoli.

De cada testículo fueron seleccionadas 2 secciones de 5µm de espesor al azar y 100 secciones tubulares de cada sección fueron analizadas. El porcentaje de cada tipo histológico de sección tubular en los dos grupos de estudio fue calculado.

3.2.2.2.- Estudio de células positivas a BrdU según tipo de sección histológica de túbulo seminífero.

En cada categoría de sección histológica de túbulo seminífero (véase apartado anterior), nosotros calculamos el número medio de células germinales proliferantes (espermatozonias+preleptene BrdU positivos) por sección tubular. La clasificación de los tipos de sección histológica de túbulo seminífero se modificó utilizándose la siguiente clasificación: (0) secciones tubulares normales; (1) secciones hipoespermatogénicas; (2) secciones hipoespermatogénicas con descamación; (3) secciones con parada o detención de la espermatogénesis. Se analizaron 100 secciones tubulares por animal en cada grupo.

3.2.2.3.- Morfometría testicular

Las variables morfométricas estudiadas fueron en primer lugar el peso testicular y el volumen testicular. Los volúmenes testiculares (V_T) se estimaron considerando el testículo como un elipsoide triaxial (Paniagua et al., 1990; Santamaría et al., 1995). Los tres ejes transversales testiculares (2a, 2b y 2c) se midieron con un calibrador Vernier inmediatamente después de retirar los testículos de los animales, y el volumen testicular en fresco (sin procesar) se calculó mediante la ecuación para elipsoide triaxial, $V_T = 4/3 \pi abc$ donde a, b y c son los radios de la elipsoide triaxial. En segundo lugar se determinó: el área epitelial, el perímetro tubular y el diámetro medio tubular (MTD) que fueron calculados usando un analizador de imagen (Micron) con un objetivo de 10X. Se eligieron 5 secciones al azar de cada testículo de 5µm de espesor y se midieron 5 secciones tubulares de cada sección (25 secciones tubulares por testículo). Con el mismo analizador de imágenes se calculó la densidad de volumen del túbulo seminífero (VD_{ST}). A partir de ella y del volumen total del testículo se determinaron:

- El volumen total del túbulo seminífero por testículo (V_{ST}).
- La longitud total del túbulo seminífero (L_{ST}). Se asumió que todos los túbulos tenían una forma de cilindro con una longitud L, un radio R (MTD/2) y un volumen (V_{ST}). La longitud del túbulo seminífero por unidad de volumen (L_V) fue calculada empleando la siguiente fórmula: $L_V = VD_{ST}/\pi R^2$ (Wing and Christensen, 1982; Santamaría y cols., 1995). $L_{ST} = L_V \times V_T$.

- El área media del túbulo seminífero que es igual a $2\pi R \times L_{ST}$.
- El volumen total del túbulo seminífero (V_{SE}) que se calculó al multiplicar el área del epitelio seminífero por L_{ST} .

3.2.2.4.- Índice de proliferación, número total de espermatogonias en proliferación y número total de espermatogonias

Para cuantificar la proliferación de las espermatogonías+preloptenes BrdU + se utilizó un monitor de TV acoplado al microscopio a fin de obtener un mejor contraste y facilitar el reconocimiento de las mismas. Se utilizó el objetivo de 40 X y se estudiaron cinco secciones al azar de cada testículo, realizándose recuentos en 20 campos al azar (1 campo = 0.018 mm²) de cada sección de espermatogonías BrdU+, preleptotene BrdU+, espermatogonias y espermatocitos BrdU-. Se obtuvo así el número total de ellas en los 100 campos, a partir del cual se halló la media por campo. A partir de estos datos se calculó el índice total de proliferación por cada cien espermatogonías+preloptenes, (n° células en proliferación / n° células proliferantes + n° células no proliferantes x 100).

Para el cálculo del número de espermatogonías proliferantes más preleptotenes BrdU+ y no proliferantes y espermatocitos (totales) por μm^3 se utilizó la fórmula de Floderus (Floderus, 1994; Horn *et al*, 1996):

$$Nv = \frac{Na}{T+D-2H}$$

Siendo: **Nv** = número de células por unidad de volumen

Na = número de células por unidad de área

T = espesor de la preparación

D = el diámetro medio del núcleo

H = 0,1 XD

D se calculó midiendo con el objetivo de 40 X con una regleta graduada 20 núcleos cortados transversalmente en su parte media, y hallando la media de los valores obtenidos.

Con los datos obtenidos se calculó el número total de espermatogonías proliferantes y no proliferantes y de espermatocitos por testículo, multiplicando el valor obtenido por el volumen total del testículo.

3.2.2.5.- *Proteínas de matriz extracelular: laminina y fibronectina*

Para el estudio del área de inmunorreacción se utilizaron cuatro secciones al azar de cada animal en las cuales se tomaron cinco campos al azar de cada una (20 campos al azar de cada animal), para cada uno de los dos anticuerpos estudiados. Para la medición de área de inmunorreacción, se utilizaron cuatro secciones transversales de 5 μm de espesor secciones por testículo. En cada sección se examinaron cinco campos elegidos al azar. La densidad de volumen de inmunoreactividades (VD_i) se calculó como la media de la zona inmunoreactiva / área de referencia (8947 μm^2) utilizando un sistema analizador de imágenes con un objetivo X40, y los volúmenes totales de los inmunoreactividades (VI) se calcularon multiplicando $\text{VD}_i \times \text{V}_T$.

Para hallar la densidad de volumen en fresco se multiplicó la densidad de volumen hallada por el factor de corrección (1,2) para corregir la disminución de volumen debida a la retracción del tejido producida por la fijación.

EXPERIENCIA 2:

3.3. Animales y Sacrificio

Se utilizaron un total de 10 hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*), de 12 meses de edad. 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.

El sacrificio se realizó en una cubeta desecadora con pastillas de CO₂ según la normativa vigente en ese momento sobre protección de animales de laboratorio (R.D. 53/2013). Posteriormente se pesó al animal y se abrió el escroto, para extraer los testículos midiendo en cada uno de ellos su diámetro mayor, menor y oblicuo. Antes de iniciar el procesamiento se pesaron los testículos por separado.

3.4. Microscopía de luz

Los testículos izquierdos que iban a ser usados para los estudios con microscopía de luz se fijaron en methacarn (metanol: cloroformo: ácido acético, 6:3:1) durante 8 horas. 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 paraplast 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.

3.4.1.-Estudio histológico semicuantitativo

Para los análisis semicuantitativos, del grado histológico de degeneración de sección tubular fue clasificado en 3 categorías:

- 1) Secciones túbulares normales
- 2) Secciones túbulares hipoespermatogénicas caracterizadas por una disminución en el espesor del epitelio seminífero que contiene todos los tipos

celulares de la línea germinal y ocasionalmente con descamación de células germinales

3) Secciones de túbulos en parada o detención donde el epitelio seminífero presenta parada en la maduración de la línea germinal en cualquiera de sus etapas.

De cada testículo fueron seleccionadas 2 secciones de 5µm de espesor al azar y 100 secciones tubulares de cada sección fueron analizadas. El porcentaje de cada tipo de sección tubular en los dos grupos de estudio fue calculado.

3.4.2.- Inmunocitoquímica

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

Para poner de manifiesto las espermatogonias que proliferan 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.

3.4.2.2.- Estudio semicuantitativo de células positivas a PCNA

En cada categoría histológica de degeneración tubular se calculó el número medio de espermatogonias PCNA (+) por cada tipo histológico de sección tubular. Se contabilizó también el número de espermatogonias PCNA (+) y PCNA (-) así como las totales. Para estos propósitos fueron analizadas 100 secciones tubulares por animal. El índice de proliferación total de espermatogonias fue igual a: n° de espermatogonias PCNA(+)/ n° de espermatogonias PCNA(+) + n° de espermatogonias PCNA (-) todo ello multiplicado por 100.

3.5.- Microscopía electrónica de transmisión (Experiencia 1 y 2)

3.5.1.- Ultraestructura convencional

Los fragmentos procedentes de cada uno de los testículos y destinados al estudio ultraestructural (testículos derechos), se seccionaron en fragmentos de 1mm^3 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 (OsO_4) 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 Philips.

3.5.2.- Estudio semicuantitativo ultraestructural del grosor de la lámina propia

El espesor medio de la lámina propia fue calculado en 5 zonas diferentes de cada tipo de túbulo ($n=7$, para cada tipo ultraestructural de túbulo) midiendo la distancia desde la lámina basal hasta la membrana basal interna de las células peritubulares usando las imágenes de microscopía electrónica de los túbulos seminíferos. Los tipos de secciones ultraestructurales fueron:

- 1) Secciones túbulares normales
- 2) Secciones túbulares hipoespermatogénicas caracterizadas por una disminución en el espesor del epitelio seminífero que contiene todos los tipos celulares de la línea germinal y ocasionalmente con descamación de células germinales

3) Secciones de túbulos en parada o detención donde el epitelio seminífero presenta parada en la maduración de la línea germinal en cualquiera de sus etapas.

3.6.-Método estadístico (Experiencia 1 y 2)

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 o mediante un test de la t de Student para datos independientes, con el objeto de determinar el grado de significancia. Estos análisis han requerido, para ciertas variables, una transformación conveniente de éstas, con el fin de que se adecuaran a las condiciones de aplicabilidad de los mismos. 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

EXPERIENCIA 1

4.1. Microscopía de luz

4.1.1.- Histología convencional

A los seis meses de edad, los túbulos seminíferos no mostraban ninguna alteración morfológica relevante. El epitelio seminífero presentaba todas las asociaciones de células germinales y de Sertoli no apreciándose alteraciones inflamatorias ni signos de necrosis en el mismo, con secciones de túbulos seminíferos íntegros, en sus diversos estadios (I-XIII). La mayoría de las secciones transversales tubulares mostraban un epitelio seminífero normal. Sin embargo también se observaron algunas secciones tubulares hipoespermatogénicas. Las células mioides localizadas en la pared tubular y las células de Leydig ubicadas cerca de los vasos sanguíneos intersticiales mostraron una morfología normal (Fig. 1A)

A los 24 meses de edad se observó un parénquima formado por secciones de túbulos con epitelio seminífero normal alternando con otros con diversos grados de alteración o degeneración histológica incluyendo la hipoespermatogénesis (Fig. 1B), detención de la maduración celular a nivel de espermatocitos y espermátidas (Fig. 1C); túbulos con espermatogonias y células de Sertoli, túbulos con sólo células de Sertoli. Los túbulos hipoespermatogénicos presentaron un aumento de la luz tubular, debida a la disminución del espesor del epitelio seminífero. En estos túbulos aparecen todos los tipos celulares que componen normalmente el epitelio tubular (Fig. 1B). En otros túbulos con mayor grado de degeneración se encontró un epitelio hipoespermatogénico con descamación celular en la luz tubular. La detención

de la espermatogénesis se observó con un epitelio formado sólo por espermatogonías, células de Sertoli y espermatocitos. Por último, se encontró túbulos en los que el epitelio se reducía sólo a escasas espermatogonías y células de Sertoli o sólo células de Sertoli (Fig. 1C).

No se observaron alteraciones en el intersticio testicular de animales viejos. Las células de Leydig se localizaron principalmente alrededor de los vasos sanguíneos (Fig. 1B, 1C)

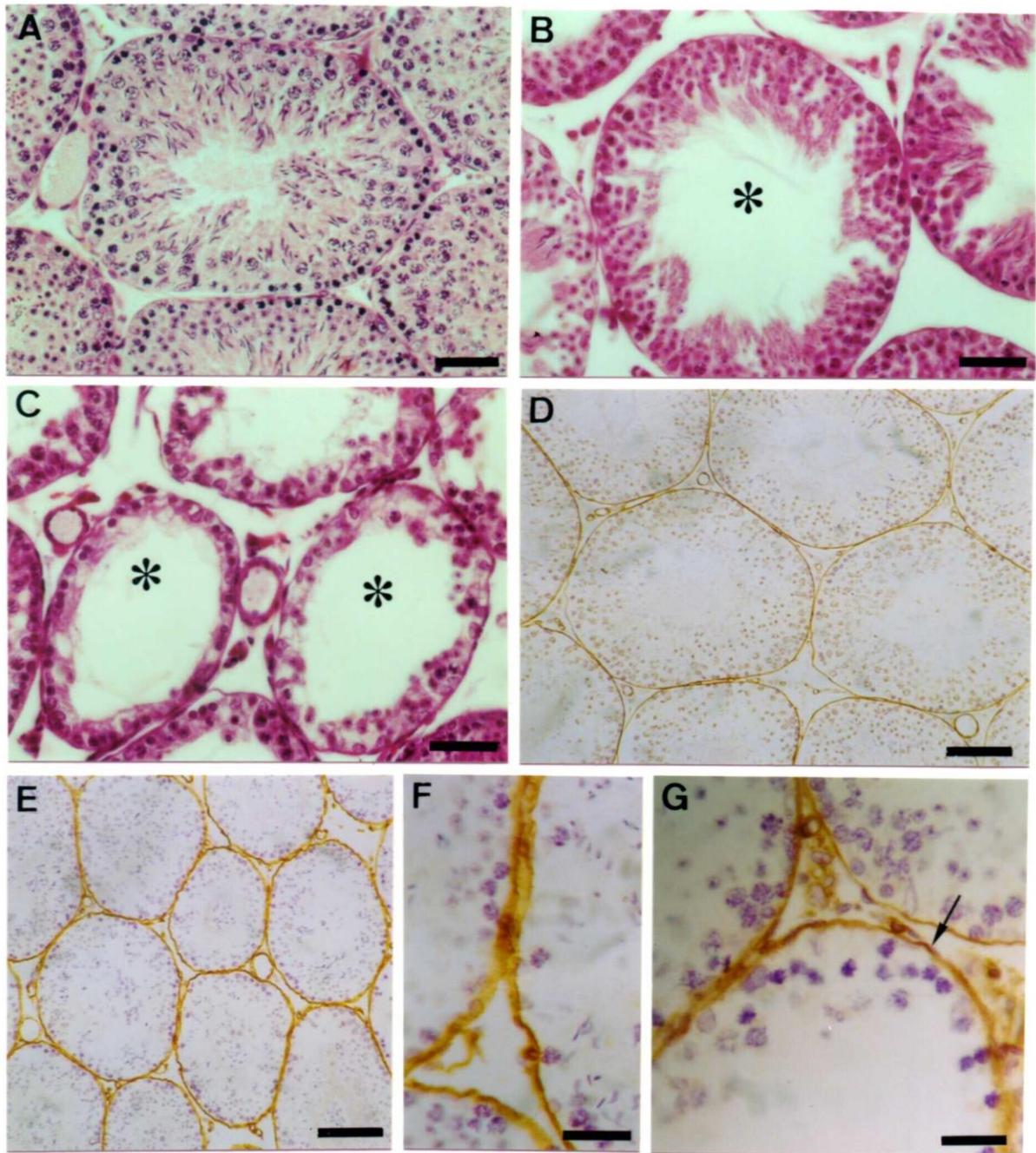


Fig.1.A. Sección de testículo de hámster de 6 meses de edad teñida con hematoxilina-eosina. **(B,C)** Sección testicular de hámsters de 24 meses de edad que muestran túbulos alterados (asterisco). Hipoespermatogénicos **(B)** y túbulos en parada de la maduración **(C)** teñidos con hematoxilina-eosina. **(D, E y F)** Inmunohistoquímica que demuestra la inmunoreactividad en hámster de 6 meses **(D)** y 24 meses **(E, F)**. **G.** Inmunohistoquímica de fibronectina en hámster de 24 meses. Célula mioide (flecha). Barras de escala. **A,** 94 μm ; **B,** 97 μm ; **C,** 71 μm ; **D,** 315 μm ; **E,** 267 μm ; **F,** 100 μm ; **G,** 75 μm .

4.1.2. Proteínas de matriz extracelular en la pared tubular

a) Laminina

La inmunotinción a laminina reveló su presencia a nivel de la lámina propia de los túbulos seminíferos, fundamentalmente en la parte más interna de la misma. También se encontró laminina rodeando el endotelio de los capilares intersticiales (Fig. 1D). En los testículos envejecidos la laminina se disponía de forma ondulada, siguiendo los plegamientos de lámina propia (Fig. 1E,1F), a diferencia de los testículos de 6 meses, en donde la lámina propia no presenta estas irregularidades, siendo además, en los envejecidos, el espesor de la laminina aparentemente mayor que en los animales de 6 meses.

b) Fibronectina

Se encontró inmunorreactividad a la fibronectina a lo largo de toda la lámina propia. El intersticio mostró una positividad a fibronectina fundamentalmente a nivel de los vasos sanguíneos. En los animales de 24 meses se pudo observar un fuerte aumento de la positividad, con un mayor espesor de la zona positiva a nivel de la lámina propia. Asimismo, se observó diversos plegamientos a lo largo de la lámina propia de estos animales envejecidos (Fig. 1G). Las células mioides también estaban intensamente teñidas con fibronectina (Fig. 1G), aunque también se encontró positividad en las células mioides de los controles.

4.1.3.-Análisis cualitativo de la proliferación celular

En animales jóvenes y viejos se observaron espermatogonias y espermatocitos en preleptotene positivos a BrdU en túbulos con un epitelio espermatogénico normal. En túbulos histológicamente degenerados se observaron algunos cambios en el grado de proliferación, aunque aparecen células germinales BrdU positivas en túbulos hipoespermatogénicos (Fig. 2A), además también se observó un pequeño número de células germinales BrdU positivas en túbulos hipoespermatogénicos con células descamadas en la luz tubular (Fig. 2B). Los túbulos con parada muestran escasas células germinales positivas a BrdU (Fig. 2C)

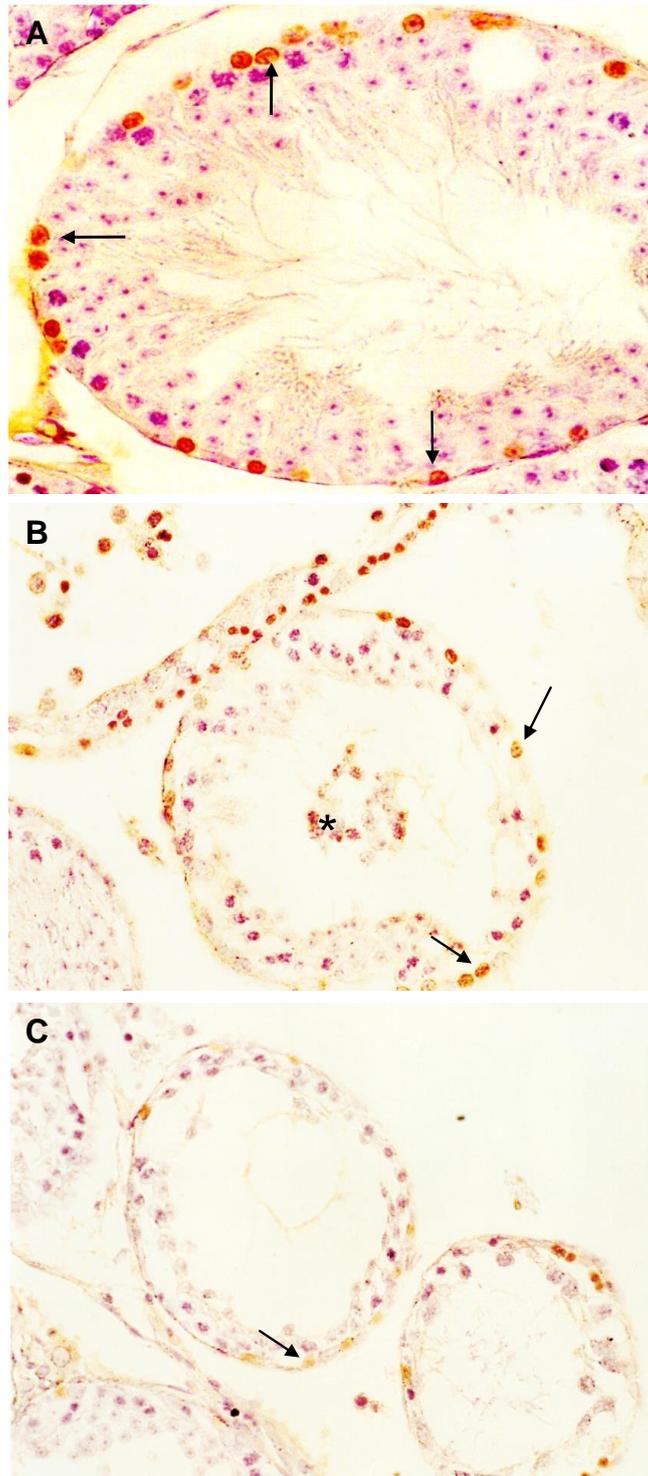


Fig.2. Células germinales BrdU positivas (flechas) en secciones tubulares de hámster sirio con diferentes grados de degeneración del epitelio seminífero: **(A)** epitelio hipoespermatogénico, **(B)** descamación de células germinales (asterisco) y **(C)** parada de espermatogénesis. **(A-C)** x147

4.2. Determinación semicuantitativa de los tipos de sección histológica de túbulo seminífero.

Los resultados obtenidos quedan resumidos en la tabla 1.

Tabla1. *Porcentaje de secciones tubulares histológicas*

Porcentaje de tipos de secciones tubulares	6 meses	24 meses
Túbulos normales	68.87 ± 4.10	48.25 ± 6.80*
Túbulos hipo-espermatogénicos	29.52 ± 3.49	44.55 ± 5.35*
Túbulos con maduración detenida	1.77 ± 0.77	6.31 ± 2.53*
Túbulos con células SG y de Sertoli	0	0.32 ± 0.27
Túbulos con solo células de Sertoli	0	0.44 ± 0.44

Los valores representan medias ± SEM. *p<0,05

A lo largo del intervalo que va desde los 6 a los 24 meses de vida en los animales estudiados el porcentaje de túbulos normales se fue reduciendo al tiempo que el porcentaje de los túbulos hipoespermatogénicos y con maduración detenida se incrementó significativamente. En cambio, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de los túbulos que contenían células de Sertoli y espermatogonias o sólo células de Sertoli (Tabla 1).

4.3. Volumen testicular y actividad proliferativa

Los resultados obtenidos quedan resumidos en la tabla 2.

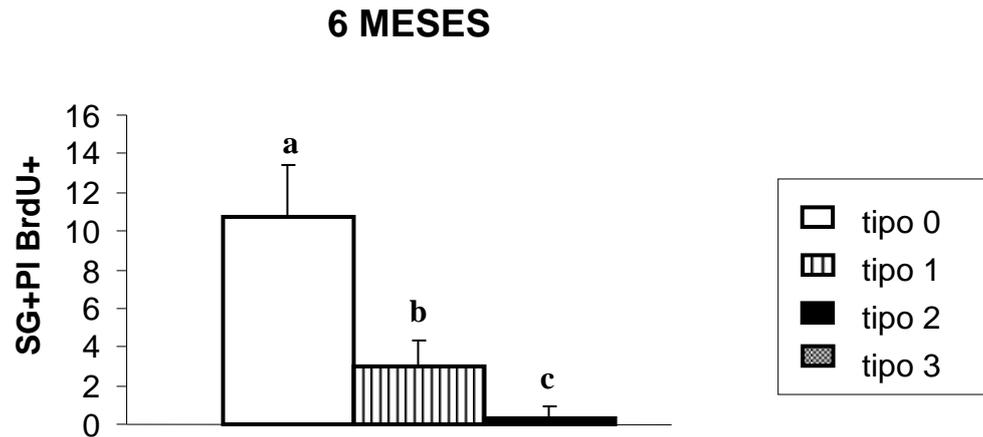
Tabla 2. Volumen testicular y actividad proliferativa

	6 meses	24 meses
Volumen testicular (cc)	2.27 ± 0.16	1.84 ± 0.05*
Total SG+PI por unidad de volumen	88210 ± 2784	549774 ± 3346*
Total SG +PI por testículo	204.5×10 ⁶ ± 16×10 ⁶	101.2×10 ⁶ ± 5.7×10 ⁶ *
BrdU(+) SG +PI por unidad de volumen	27158 ± 1062	13719 ± 1345*
BrdU(+) SG +PI por testículo	63.2×10 ⁶ ± 6.7×10 ⁶	25.3×10 ⁶ ± 2.6×10 ⁶ *
Índice de proliferación SG+PI (%)	30.8 ± 1.2	24.8 ± 1.6*
Total SG+SC per unit volume	171061 ± 3517	147463 ± 1754*
Total SG+SC per testis	389.8×10 ⁶ ± 29×10 ⁶	271.3×10 ⁶ ± 6.5×10 ⁶ *

Los valores representan medias ± SEM. **Abreviaturas:** SG, espermatogonias, PI, espermatocitos en preleptotene. *En todas las variables estudiadas se produce una disminución significativa (p<0,05)

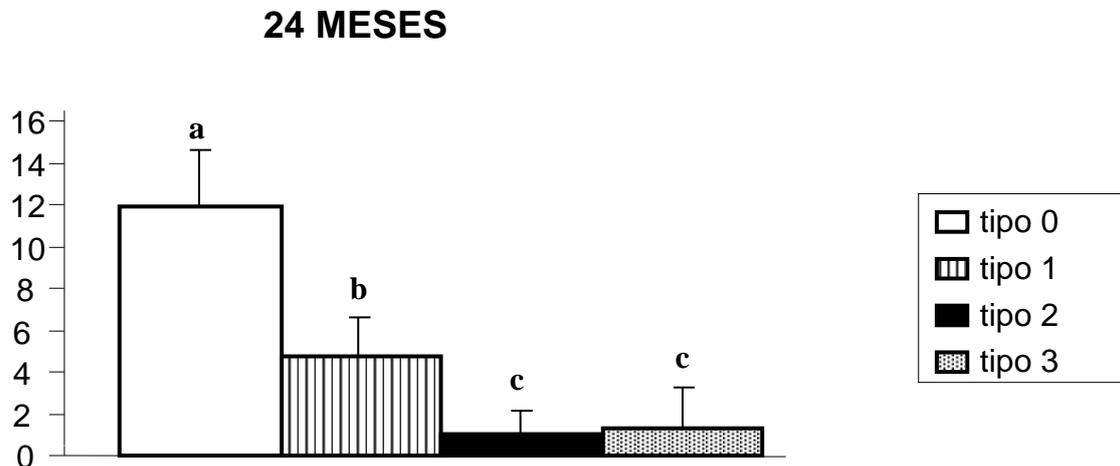
4.4 Índice de la actividad proliferativa (BrdU) por tipo de sección histológica de túbulo seminífero

El número de espermatogonias + preleptotene BrdU (+) en relación con el tipo de sección histológica del túbulo seminífero en testículos de seis meses se muestra en la gráfica 1.



Gráfica 1. Las letras de las barras de error indican la significación. Las barras con distintas letras son significativamente diferentes. (a) La sección tubular de tipo 0 es significativamente diferente a la del tipo 1 y el tipo 2 ($p < 0.05$). (b) La sección tubular de tipo 1 es significativamente diferente a la del tipo 0 y el tipo 2 ($p < 0.05$). (c) La sección tubular de tipo 2 es significativamente diferente a la del tipo 0 y el tipo 1 ($p < 0.05$). Tipo 0: túbulo normal. Tipo 1: túbulo hipoespermatogénico. Tipo 2: túbulo hipoespermatogénico con descamación de células germinales.

El número de espermatogonias + preleptotene BrdU (+) en relación con el tipo de sección histológica del túbulo seminífero en testículos de veinticuatro meses se muestra en la gráfica 2.



Gráfica 2. Las letras de las barras de error indican la significación. Las barras con distintas letras son significativamente diferentes. (a`) La sección tubular de tipo 0 es significativamente diferente a la del tipo 1, tipo 2 y tipo 3 ($p < 0.05$). (b`) La sección tubular de tipo 1 es significativamente diferente a la del tipo 0, tipo 2 y tipo 3 ($p < 0.05$). (c`) La sección tubular de tipo 2 es significativamente diferente a la del tipo 0, tipo 1 y tipo 3 ($p < 0.05$). (d`) La sección tubular de tipo 3 es significativamente diferente a la del tipo 0, tipo 1 y tipo 2 ($p < 0.05$). Tipo 0: túbulo normal. Tipo 1: túbulo hipoespermatogénico. Tipo 2: túbulo hipoespermatogénico con descamación de células germinales. Tipo 3: túbulo hipoespermatogénico y en parada

En la gráfica 1 se observa una disminución significativa del número de espermatogonias más preleptotene positivos a medida que la sección de túbulo seminífero está más alterada histológicamente. En la gráfica 2 se observa el mismo fenómeno aunque no existen diferencias entre las secciones tubulares más alteradas tipo 2 y 3. Es de destacar que con respecto al número medio de SG+PI positivos a BrdU en cada tipo de túbulo seminífero (tipo 0-3), no hay diferencias significativas entre animales de 6 meses y 24 meses (Gráfica 1 y 2).

4.5. Estudio morfométrico testicular

Los resultados obtenidos quedan resumidos en la tabla 3.

Tabla 3. Valores de los parámetros testiculares generales

	6 meses	24 meses
Nº de animales machos	6	7
Peso (g)	148.33 ± 15.21	150.28 ± 4.43
Peso testicular (g)	1.84 ± 0.13	1.50 ± 0.09
Túbulos Seminíferos		
VD _{ST} (%)	87 ± 2	81 ± 5*
V _{ST} (mm ³) (×10 ³)	1.92 ± 0.15	1.50 ± 0.07*
L _{ST} (µm) (×10 ⁷)	2.38 ± 0.14	2.87 ± 0.11*
MTD(µm)	320 ± 8.31	257 ± 5.03*
MLD (µm)	157 ± 3.86	141 ± 3.63*
Area media cilíndrica (µm ²) (×10 ¹⁰)	2.40 ± 0.15	2.31 ± 0.09
V _{SE} (mm ³) (×10 ³)	1.48 ± 0.10	1.03 ± 0.04*

Los valores representan medias ± SEM. **Abreviaturas:** VD_{ST}, densidad de volumen de los túbulos seminíferos; V_{ST}, volumen de los túbulos seminíferos; L_{ST}, longitud total de túbulos seminíferos; MTD: diámetro medio tubular; MLD, diámetro medio de luz; V_{SE}, volumen de el epitelio seminífero; V_I, volumen total de inmunoreactividad

* Diferencia significativa entre grupos (P < 0.05)

No se observan diferencias significativas en el peso del animal y peso testicular entre hámsteres jóvenes y viejos. El volumen total de túbulo seminíferos, el diámetro tubular, el diámetro de luz y el volumen total del epitelio seminífero disminuyó significativamente en animales viejos con respecto a animales jóvenes (p < 0,05). Sin embargo, la longitud del túbulo seminífero en animales viejos fue significativamente más alta comparado con el grupo control (p < 0,05) (Tabla 3).

4.6. Proteínas de matriz extracelular en la pared tubular

El área de inmunorreacción media por campo arrojó los siguientes resultados: para la laminina: $350 \pm 88 \mu\text{m}^2$ en los animales de 6 meses, y $653 \pm 110 \mu\text{m}^2$ en los de 24 meses. Para la fibronectina: $353 \pm 140 \mu\text{m}^2$ en los controles, y $636 \pm 136 \mu\text{m}^2$ en los envejecidos.

El volumen de inmunorreacción medio por testículo dio los siguientes resultados: para la laminina: $0,1002 \pm 0,0101$ ml en los animales de 6 meses, y $0,1715 \pm 0,0134$ ml en los de 24 meses. Para la fibronectina: $0,0983 \pm 0,026$ ml en los controles, y $0,1557 \pm 0,008$ ml en los envejecidos. El área y el volumen total de inmunorreactividad por testículo para laminina y fibronectina fue significativamente más alto en animales viejos comparados con el grupo control ($p < 0,05$).

4.7. Microscopía electrónica de transmisión

a) Animales jóvenes

El epitelio del túbulo seminífero de los animales de 6 meses presentaba células germinales de aspecto normal en sus diversos estadios, sin alteraciones inflamatorias ni signos de necrosis. Las células de Sertoli se extendían desde la base del túbulo rodeando a las células germinales del entorno. Los núcleos de células de Sertoli se hallaban en la zona basal del epitelio seminífero, directamente adyacentes a la membrana basal mostrando un patrón ultraestructural normal. Se observaron nucléolos en estos núcleos irregulares. Las organelas citoplasmáticas mostraron su morfología habitual (Fig. 3A).

El compartimento basal del epitelio seminífero incluía espermatogonias y espermatocitos tempranos dispuestos cerca de los núcleos de las células de Sertoli (Fig. 3A). El compartimento germinal contenía los otros tipos de células germinales: espermatocitos tardíos, espermatidas redondas o alargadas y espermatozoides (Fig. 3B). Se observaron también las típicas agrupaciones de células germinales en varios estadios del ciclo seminífero del epitelio. La lámina propia presenta una lámina basal con una capa fina de tejido conjuntivo y células mioideas (Fig. 3C)

b) Animales envejecidos

Se observaron ultraestructuralmente los diversos tipos de secciones tubulares vistas con microscopía de luz.

a) túbulos hipoespermatogénicos. Las diferentes fases de transformación normales y de espermatidas en espermatozoides fueron identificadas en túbulos normales como hipoespermatogénicos. Algunas anomalías fueron frecuentemente observadas en la ultraestructura del acrosoma y el núcleo de espermatidas y en la cabeza del espermatozoide en formación (Fig. 3D-F). En espermatidas tardías y espermatozoides del lumen se encontró múltiples flagelos rodeados por una sola membrana. Frecuentemente se observan en estos flagelos alteraciones ultraestructurales (Fig. 3G).

Los túbulos hipoespermatogénicos presentaron una completa espermatogénesis con una disminución en el espesor del epitelio seminífero y un relativo incremento de la luz tubular. Además, la descamación de células germinales fue observada en algunos túbulos. Las células de Sertoli mostraron numerosos gránulos electrodensos de lipofucsina, cuerpos residuales, gotas lipídicas electro-lúcidas (Fig. 4A) y vacuolas intracelulares. En la lámina propia, la membrana basal mostró un perfil ondulado con algunas proyecciones irregulares (Fig. 4A). La capa interna no celular de la matriz extracelular fue más espesa y presentó abundantes fascículos de fibras de colágeno. La degeneración de células germinales fue un proceso común en túbulos hipoespermatogénicos. Las células degeneradas principalmente espermatocitos y espermatidas (Fig. 4B) estuvieron caracterizadas por condensación de cromatina nuclear a lo largo del perímetro del núcleo.

b) los túbulos con parada de la maduración de espermatocitos y espermatidas fueron caracterizados por un epitelio seminífero que contiene espermatogonia, espermatocitos, células de Sertoli y unas pocas espermatidas redondas. El núcleo de la célula de Sertoli fue reducido en altura y algunas veces fue desplazado de la posición basal al compartimento luminal (Fig. 4C). El citoplasma de la célula de Sertoli mostró abundantes lípidos y vacuolas situadas principalmente en el compartimento basal. La degeneración de células fue observada en este epitelio seminífero. La lámina propia fue notablemente engrosada. La lámina basal es más grande con repliegues profundos hacia el epitelio seminífero y la capa interna no celular de tejido conectivo fue ampliándose y conteniendo abundantes fascículos de fibras de colágeno.

c) los túbulos con solamente espermatogonia y células de Sertoli y túbulos solamente con células de Sertoli. En ellos, algunas células de Sertoli carecen de indentaciones nucleares y mostraron una forma regular del núcleo. Sin embargo, otras células de Sertoli presentaron grandes y numerosas vacuolas citoplasmáticas (Fig. 4D). Las vacuolas presentaban un perfil irregular y fueron localizadas en diferentes niveles del citoplasma de Sertoli desde la zona basal a la luminal. Las vacuolas contienen material amorfo similar al

observado en el lumen tubular y estuvieron rodeadas por cisternas de retículo endoplásmico liso. También, se observaron abundantes gotas lipídicas (Fig. 4E). La lámina propia fue más gruesa. El núcleo de células mioides perdió la forma de huso y fue más grueso, mostrando una forma irregular con profundas invaginaciones (Fig. 4E). La lámina basal presentó numerosos pliegues irregulares y debajo de ella se observaron fascículos de fibras de colágeno (Fig. 4F)

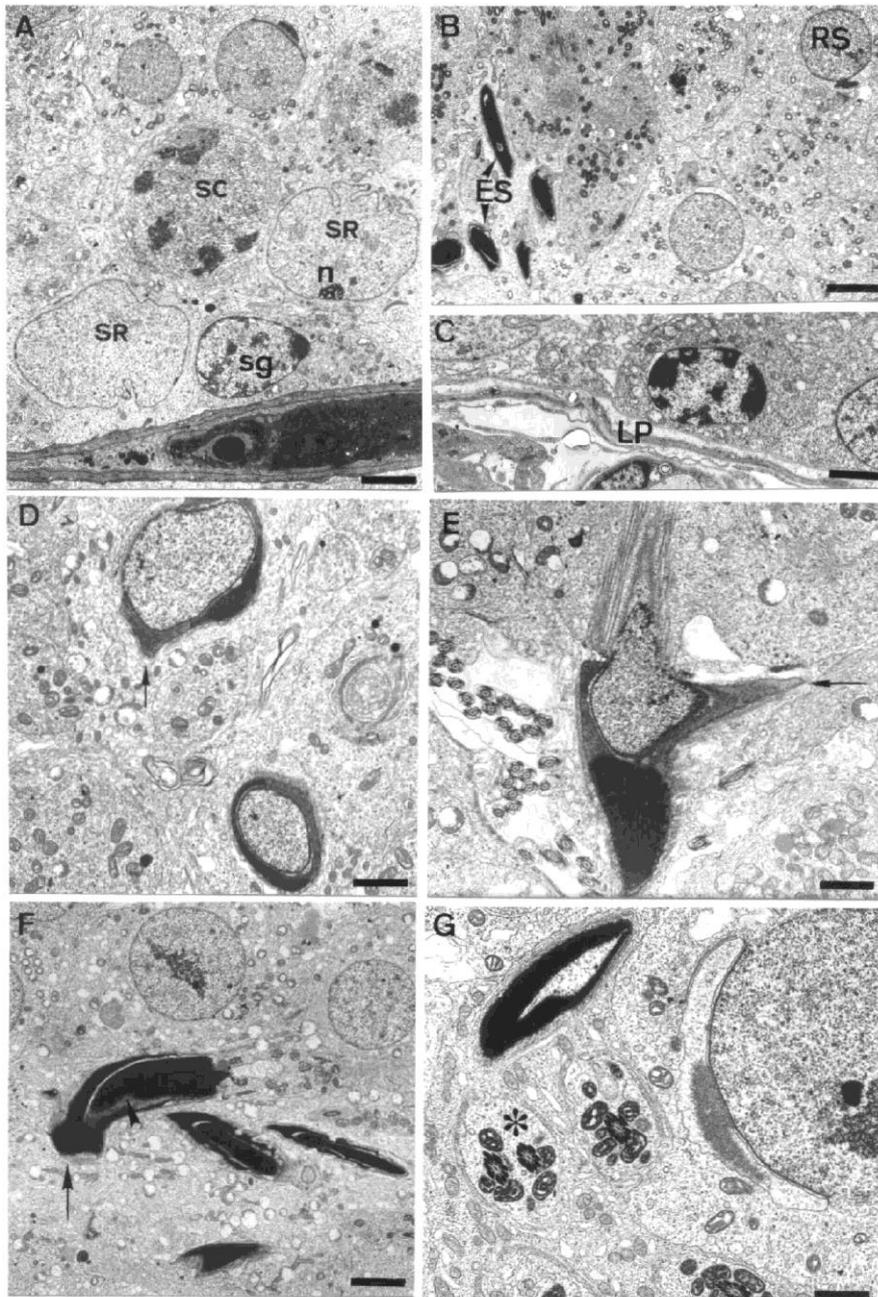


Fig. 3. A, B y C. Imágenes de microscopía electrónica del epitelio seminífero de hámster de 6 meses. **A.** El compartimento basal está compuesto de células de Sertoli (SR), el núcleo muestra un prominente nucléolo (n), espermatogonia (sg) y espermatocito (SC). **B.** El compartimento luminal está compuesto fundamentalmente de espermátidas redondas (RS) y alargadas (ES). **C.** Aspecto típico de la lámina propia (LP) en animales jóvenes. **D, E, F y G.** Alteraciones en la espermiogénesis en hámsteres de 24 meses. **D.** Deformación del acrosoma (flecha) en una fase temprana de formación. **E.** extensión anormal (flecha) del acrosoma de un espermatozoide en formación. **F.** La cabeza de espermatozoide muestra una forma de “mazo” y un núcleo indentado (cabeza de flecha). **G.** Flagelo doble rodeado por una membrana (asterisco). Barra de escala: **A, B,** 4 μm ; **C,** 3,3 μm ; **D,** 2,64 μm ; **E,** 1,8 μm ; **F, G,** 3,33 μm

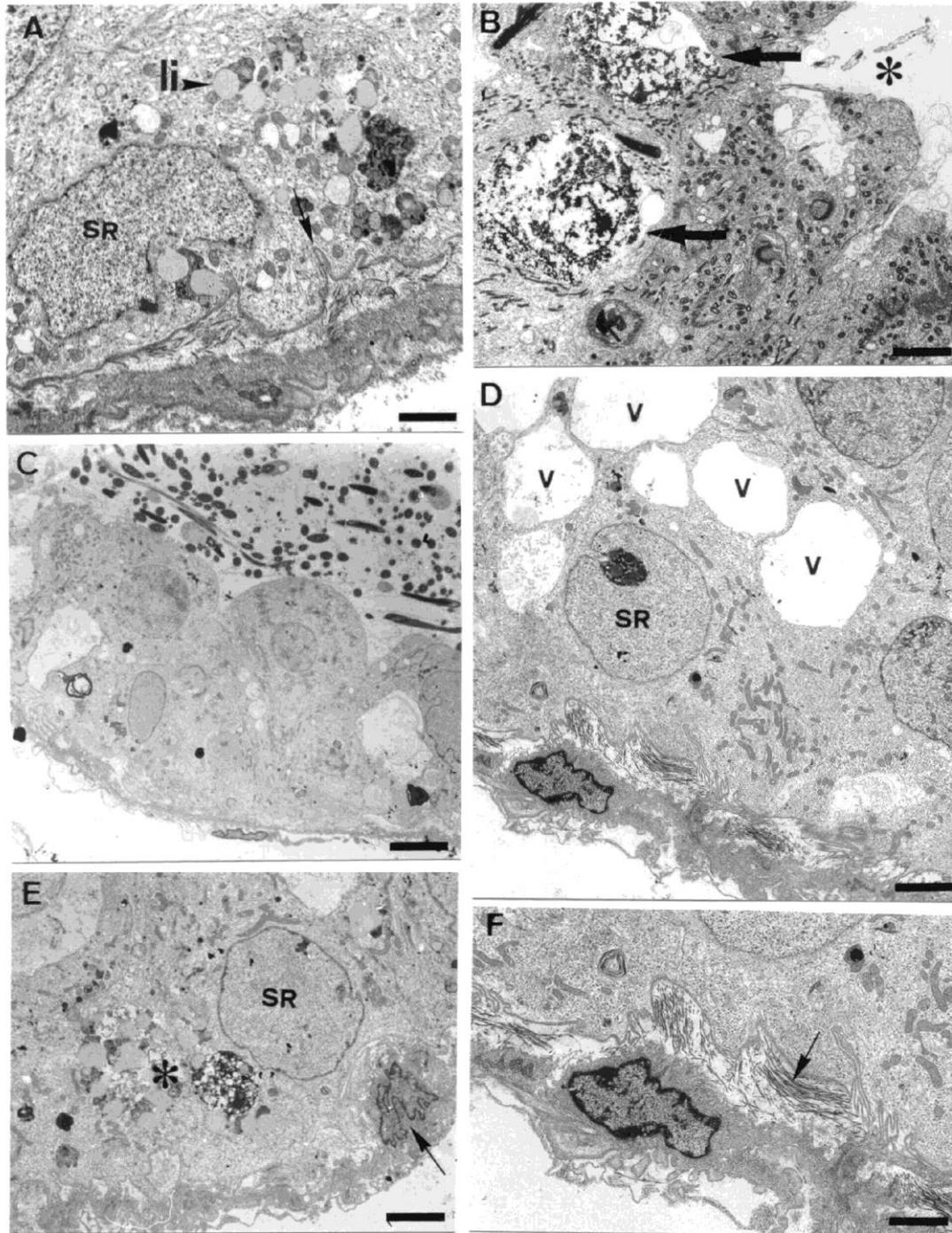


Fig. 4. Imágenes de microscopía electrónica de hámsters de 24 meses. **A.** El compartimento basal del epitelio seminífero muestra una lámina basal replegada (flecha) y gotas lipídicas (li) en el citoplasma de células de Sertoli (SR). **B.** Zona hipoespermátogónica de túbulos seminíferos (asterisco) que muestra espermátidas redondas en degeneración (flechas). **C.** Secciones tubulares de parada en maduración de espermátocitos. **(D)** Túbulos con sólo células de Sertoli (SR) caracterizados por la presencia de grandes y numerosas vacuolas (V). **E.** Citoplasma de células de Sertoli que contiene numerosas gotas lipídicas y cuerpos residuales (asterisco). También, el núcleo de células mioides presenta un relieve irregular (flecha). **F.** En una fase avanzada de degeneración tubular la lámina propia está engrosada. La lámina basal muestra pliegues irregulares y debajo hay abundantes fascículos de fibras de colágeno. Barras de escala: **A,** 2,36 μm ; **B,** 5 μm ; **C,** 6,25 μm ; **D,** 1,93 μm ; **E,** 3,63 μm ; **F,** 1,2 μm .

4.8. Cambios semicuantitativos del grosor de la lámina propia.

Los resultados obtenidos quedan resumidos en la tabla 4.

Tabla 4. Valores de los parámetros medidos en la lámina propia

Lámina propia	6 meses	24 meses
Túbulos normal e hipoespermatogénicos	0.376 ± 0.013*	0.811 ± 0.032 ^{*a}
Túbulos con maduración detenida	-	1.777 ± 0.113 ^{*a}
Túbulos con SG y células de Sertoli y solo con células de Sertoli	-	1.614 ± 0.114*

Los valores representan medias ± SEM. * Diferencia significativa entre grupos (P< 0.05).

^{*a} Diferencias significativas (P<0.0001).

EXPERIENCIA 2

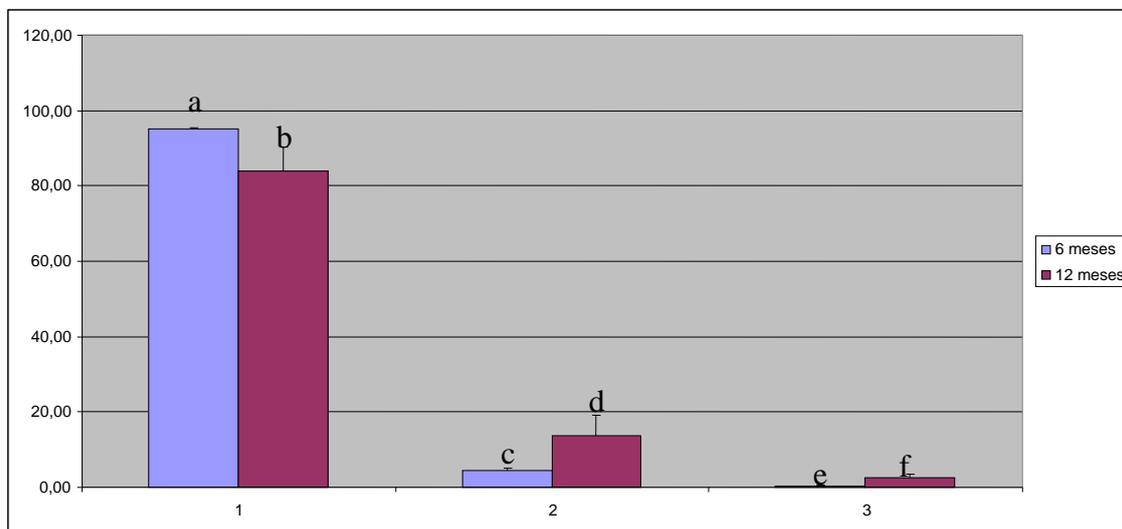
4.9. Microscopía de luz

En las secciones de animales de 6 y 12 meses se observaron secciones de túbulos seminíferos normales, hipoespermatogénicas y de forma esporádica en detención o parada.

4.10. Resultados semicuantitativos

4.10.1.-Porcentaje de tipos histológicos de sección tubular en animales de 6 y 12 meses

De 6 a 12 meses el porcentaje de secciones tubulares normales disminuyó y el porcentaje de túbulos hipoespermatogénicos y en parada aumentó significativamente con la edad ($p < 0,05$). En ambos grupos (6 y 12 meses) el porcentaje de túbulos normales fue mayor que el porcentaje de túbulos hipoespermatogénicos y éste fue mayor que el de túbulos en parada (Gráfica 3).

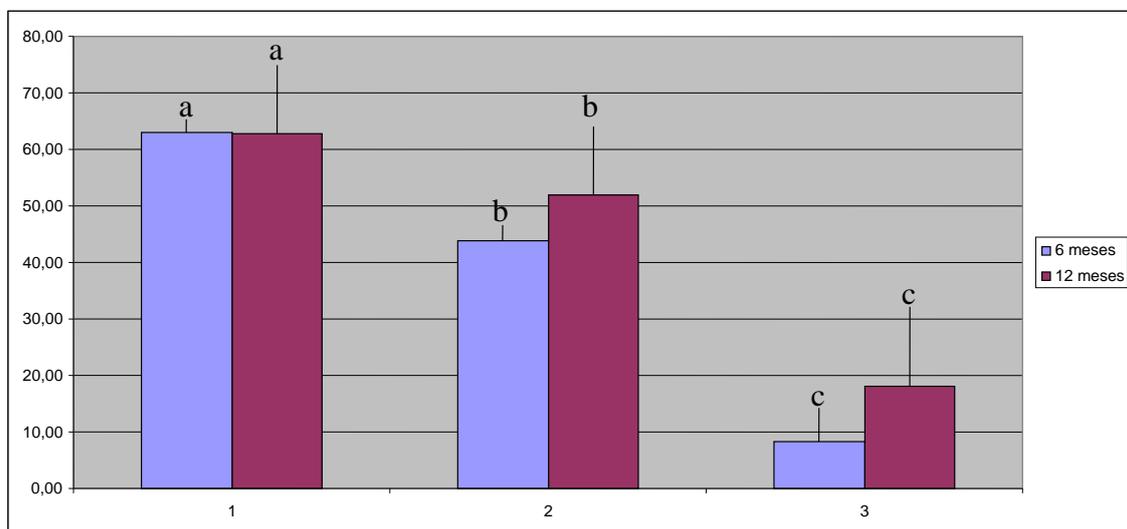


Gráfica 3. ^{a,b}Diferencias significativas en el porcentaje de túbulos normales entre 6 y 12 meses ($p < 0,05$). ^{c,d}Diferencias significativas en el porcentaje de túbulos hipoespermatogénicos entre 6 y 12 meses ($p < 0,05$). ^{e,f}Diferencias significativas en el porcentaje de túbulos en parada entre 6 y 12 meses ($p < 0,05$). ^{a,c,e}Diferencias significativas en el porcentaje de túbulos normales, hipoespermatogénicos y en parada en animales de 6 meses ($p < 0,05$). ^{b,d,f}Diferencias significativas en el porcentaje de túbulos normales, hipoespermatogénicos y en parada en animales de 12 meses ($p < 0,05$)

4.10.2.- Índice de proliferación total y número de espermatogonias PCNA (+) por tipo histológico de sección tubular en animales de 6 y 12 meses.

No se encontró diferencia significativa en el índice de proliferación total entre los animales de seis meses, 84.11 ± 1.47 y, el de doce meses 85.85 ± 1.25 .

Se observó una disminución en el número de espermatogonias proliferando en las secciones tubulares con hipoespermatogénesis, descamación de células germinales y parada de la maduración de cada uno de los grupos de edad. Los cambios son similares en ambos grupos. Entre los grupos de edad no se observó variación significativa por tipo de sección tubular (Gráfica 4).



Gráfica 4. ^{a,b,c}Diferencias significativas en el número de espermatogonias PCNA (+) entre túbulos normales, hipoespermatogénicos y en parada ($p < 0,05$).

5. DISCUSIÓN

Como ya se ha descrito en varias especies animales, la función testicular sufre una importante involución con el envejecimiento. Esta hipofunción tiene su traducción en alteraciones morfológicas que afectan al túbulo seminífero, y al tejido peritubular e intersticial (Johnson et al., 1986a; Paniagua et al., 1987).

En nuestro estudio, en hámsteres viejos, observamos una disminución significativa en el porcentaje de secciones tubulares con un epitelio normal, por lo que el número de secciones tubulares hipoespermatogénicas con descamación de células germinales y parada de la maduración fue mucho más alta que en animales jóvenes. Esto es similar, aunque con más frecuencia, a lo encontrado en estudios previos, que indican que en el envejecimiento del hámster, el epitelio seminífero sufre un proceso gradual, que no está homogéneamente distribuido en el testículo y donde las secciones de túbulos afectados pueden ser vistas junto a otras aparentemente normales (Horn et al., 1996). En contraste a las observaciones hechas en otros animales como en la rata Norway o ratón, en los que muchos de los túbulos están completamente regresados a los 24 meses (Takano et al., 1987, Wright et al., 1993; Levy et al., 1999), los hámsteres de 24 meses de nuestro estudio muestran un porcentaje todavía alto de secciones tubulares normales y un incremento en el número de secciones con hipoespermatogénesis y parada de la maduración.

Los resultados morfológicos cuantitativos indican que los túbulos seminíferos de hámster sufren una disminución en el diámetro tubular, diámetro de la luz y volumen total con el envejecimiento y que estas alteraciones están acompañadas por un incremento en la longitud total de los túbulos. La regresión testicular por envejecimiento está también caracterizada por una disminución en el volumen total del epitelio seminífero. Todas estas alteraciones coinciden con datos previos investigados en el hombre (Johnson et al., 1986 a, b; Paniagua et al., 1987; 1991), burro (Nipken and Wrobel, 1997) y rata (Wang et al., 1993); excepto para el incremento en la longitud del túbulo observado en hámsteres viejos. Pensamos que este incremento en la longitud tubular con el envejecimiento en el hámster debe ser característico de esta especie o debe ser un fenómeno que ocurre en fases tempranas del envejecimiento testicular, dado que los testículos viejos de hámster no presentan una completa y generalizada regresión de túbulos seminíferos como ocurre en la rata Norway (Wang et al., 1994). Los resultados sugieren que el envejecimiento de los túbulos seminíferos en el hámster está caracterizado por un encogimiento de los túbulos en el plano transversal pero no en el plano longitudinal.

El presente estudio también muestra que el espesor de la lámina propia estaba significativamente incrementado en comparación entre los túbulos seminíferos normales y los diferentes grados de degeneración tubular observados en hámsteres viejos. La expansión de la capa intercelular de la matriz de tejido conectivo fue la responsable del espesor de la lámina propia. Esto se puso de manifiesto a nivel ultraestructural en los hámsteres viejos.

Investigaciones previas han sugerido que el espesor relacionado con la edad del tejido de la pared tubular resulta de una reducción en ambos planos, en la longitud y en el diámetro de los túbulos seminíferos (Johnson et al., 1986 a,b, 1988). Sin embargo, el espesor de la lámina propia ha sido observado en túbulos previos a la degeneración y el encogimiento del túbulo en ratas Norway envejecidas (Richardson et al., 1995) y ha sido asociado a la disminución funcional con el envejecimiento de la barrera hematotesticular (Fukuda et al.,

2001). En el presente estudio el espesor de la lámina propia estuvo asociado con un incremento en la longitud tubular por lo que supone un incremento del volumen de la misma. Además, el incremento significativo en el espesor de la lámina propia fue también observado en secciones de túbulos seminíferos previos a la degeneración total por el envejecimiento, en hámsteres viejos tanto en túbulos normales como hipoespermatogénicos. Por lo tanto, pensamos que nuestros datos sugieren que el espesor de la lámina propia no es probablemente un resultado del encogimiento tubular en nuestra especie, sino debe ser debido a un incremento en la síntesis o deposición de matriz extracelular, aunque las imágenes ultraestructurales del espesor de la lámina propia y las proyecciones de la lámina basal no son específicas de los procesos de envejecimiento de los túbulos seminíferos ya que estas alteraciones han sido encontradas en otras situaciones como varicocele (Santamaría et al., 1992), criptorquidismo (Paniagua et al., 1990) y azoospermia (Gülkesen et al., 2002). Un dato reciente que confirma nuestra hipótesis es que con el envejecimiento se produce un incremento del tejido conjuntivo peritubular mientras que en regresión debida a fotoperiodo corto no se produce en esta localización sino en el tejido conjuntivo intertubular (Beltran-Frutos et al., 2015).

Unido a lo anterior hemos observado en nuestro estudio que el volumen de inmunoreactividad de laminina y fibronectina por testículo estuvo significativamente incrementado en testículos viejos comparado con testículos jóvenes lo cual confirmaría el incremento de deposición de matriz extracelular asociado a la edad. Resultados similares han sido obtenidos en testículos atrofiados después del tratamiento de epinefrina (Santamaría et al., 1995) y en azoospermia (Gülkensen et al., 2002). En ratas, la laminina teñida ha sido descrita principalmente en la membrana basal de los túbulos seminíferos (Hadley and Dym, 1987; Yazama et al., 1997). Con el envejecimiento, la inmunorreactividad a laminina muestra un perfil ondulado, que probablemente corresponde con las proyecciones de la membrana basal hacia el epitelio seminífero. La laminina es producida principalmente por células de Sertoli (Skinner and Fritz, 1985; Borland et al., 1986). Las células peritubulares en testículos normales no tienen una síntesis activa de laminina, pero mediante el

efecto directo o indirecto del deterioro de la estructura testicular, las células peritubulares comienzan la síntesis de laminina (Gülkesen et al., 2002). Por lo que, el incremento en el contenido de laminina en el envejecimiento puede deberse a una desregulación en la producción de la misma de las células de Sertoli o a una activa síntesis de laminina por las células peritubulares. Se ha sugerido que las células mioides peritubulares pueden cambiar su inmunofenotipo e incrementar la secreción de los componentes de matriz extracelular que provocan la fibrosis tubular (Santamaría et al., 1995).

La fibronectina ha sido observada en la capa no celular externa de la lámina propia de ratas (Hadley and Dym, 1987) y hombres (Davidoff et al., 1990). La fibronectina también ha sido detectada en células peritubulares (Tung and Fritz, 1984; Gülkesen et al., 2002) y es bien conocido que la fibronectina es secretada por las células mioides peritubulares (Tung and Fritz, 1984; Skinner et al., 1985; Hadley and Dym, 1987). Bajo situaciones patológicas las células de la lámina propia producen niveles incrementados de componentes de matriz extracelular (Davidoff et al., 1990). En este sentido el volumen más alto de inmunorreactividad de fibronectina en testículos viejos encontrado en el hamster debería ser causado generalmente no sólo por un incremento en la producción de material extracelular de tejido conectivo sino también por la posible transformación de miofibroblastos a fibroblastos durante los procesos de envejecimiento como han propuesto otros autores (Arenas et al., 1997; Fukuda et al., 2001). Estas células solamente establecen sus características mioides cuando interaccionan continuamente con los componentes de la matriz extracelular y con células de Sertoli vecinas, sino ellas aparecen como fibroblastos (Tung and Fritz, 1986). Además, el espesor y la hialinización de la lámina propia parecen dificultar la relación entre las células de Sertoli y los miofibroblastos y contribuyen a las alteraciones observadas en estas células (Heindel and Treinen, 1989). Los presentes resultados sugieren que los incrementos en los depósitos de fibronectina y laminina parecen deberse a un incremento en la deposición o síntesis durante el envejecimiento de los túbulos seminíferos que podría estar relacionada con la transformación fenotípica de las células mioides en miofibroblastos.

El índice de proliferación total observado en nuestro trabajo indica una disminución en el epitelio seminífero de nuestros hámsteres envejecidos. Una disminución en el índice de proliferación de espermatogonias se ha observado en *Octodon degus* y ratas (Obregón & Ramírez, 1997; Salama et al., 1998) También en testículo humano, una disminución en el porcentaje de proliferación de espermatogonias ha sido documentado en individuos viejos con respecto a jóvenes (Kimura et al., 2003). Además, junto a esto, una disminución en la expresión del receptor del “Stem Cell Factor” denominado c-kit ha sido documentada en ratones viejos y hámsteres, lo cual podría estar relacionado con la involución testicular (Tanemura et al., 1996; Vigodner et al., 2001). Éstas observaciones sugieren que existe una relación del envejecimiento del epitelio seminífero con la disminución de la actividad proliferativa de las espermatogonias diferenciadas que son estimuladas a proliferar por el “Stem Cell Factor” y en consecuencia expresan los receptores c-kit (Meachem et al., 2001). Este fenómeno, junto con la apoptosis germinal podría ser responsable de la pérdida de células germinales en testículos envejecidos (Pastor et al., 2011, Morales et al., 2007).

Junto a este resultado de la proliferación total, en nuestro estudio, la disminución en la actividad proliferativa en el epitelio seminífero de animales viejos estuvo relacionada con el grado de degeneración histológica de los túbulos seminíferos. De hecho, las secciones tubulares con un epitelio normal en animales viejos presentan un número similar de células germinales BrdU-positivas que los animales jóvenes; las secciones de túbulos seminíferos hipoespermatogénicos, con desprendimiento de células germinales y parada de la maduración, va acompañada por una mayor disminución en la proliferación, siendo estos cambios similares en animales jóvenes y viejos. Los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren que en el hámster sirio, en términos absolutos la disminución en la proliferación total de espermatogonias observada con la edad estaría principalmente relacionada con el incremento en el número de zonas alteradas de los túbulos seminíferos. De esta manera, el incremento en el número de porciones de túbulos seminíferos que muestran un índice de proliferación más bajo en animales viejos causaría probablemente la disminución general de la proliferación observada en esta edad. Este hallazgo pensamos que esta mas relacionado –dentro de las posibles causas de

deterioro de la proliferación de espermatogonias con la edad- con una alteración en el microambiente de las mismas. Así, el deterioro de las células de Sertoli con el envejecimiento podría ser causante de un efecto directo en la disminución de la actividad proliferativa de las espermatogonias en cuanto éstas células sintetizan factores necesarios para la proliferación de las mismas (Chen and Liu, 2015). En conclusión, la actividad proliferativa de espermatogonias fue más baja en hámsters viejos que en jóvenes y esta disminución estuvo relacionada con un incremento en el número de secciones de túbulos seminíferos con histología alterada.

Los resultados obtenidos en nuestra segunda experiencia en hámsteres de doce meses también parecen indicar una relación estrecha entre la disminución de la proliferación y el deterioro del epitelio seminífero de forma zonal dentro del túbulo. En ese estudio hemos podido comprobar que aunque no disminuye la proliferación total del testículo respecto a la de los jóvenes, en las secciones tubulares que presentan un epitelio alterado sí que se aprecia un menor número de células en proliferación por tubo. Este resultado apunta a que la proliferación total empezara a disminuir de una forma significativa con la edad cuando se alcance un porcentaje de túbulo determinado que este lesionado histológicamente. De esta manera, la participación del fenómeno de la proliferación en la involución del epitelio seminífero con la edad, estaría muy unida al deterioro del mismo en su conjunto. Teniendo en cuenta, que en anteriores estudios (Horn et al., 1996) ya se apreciaba un cambio temprano, en los hámsteres de doce meses, debido al envejecimiento en el epitelio seminífero del hámster, en concreto la disminución del número de espermatocitos en paquitene, con un bajo porcentaje de secciones tubulares anormales, tal como también ocurre en nuestra segunda experiencia, es posible que otros mecanismos, como por ejemplo, la apoptosis, este ya aumentada afectando al epitelio e iniciando su involución con la edad (Pastor et al., 2011).

En esta tesis también se han observado cambios ultraestructurales con el envejecimiento en el epitelio seminífero, afectando principalmente al proceso de espermiogénesis, especialmente en el acrosoma y el flagelo de las

espermatidas y en las células de Sertoli. Estudios previos han documentado un incremento de las anomalías del espermatozoide en hámsteres viejos en el tracto epididimario, que incluyen la ausencia de acrosoma, espermatozoides sin cabeza y espermatozoides con cola enrollada (Calvo et al., 1997). Otras anomalías han sido observadas con el envejecimiento: espermatozoides con doble cabeza; piezas intermedias engrosadas y, doble axonema encerrado en la misma membrana plasmática (Calvo et al., 1997). Nuestros resultados ultraestructurales en el epitelio seminífero no han detectado modificaciones de la pieza intermedia, cuello o cabeza del espermatozoide, como la ausencia del acrosoma, sugiriendo que estas anomalías son un defecto secundario que probablemente se origine en el epidídimo (Calvo et al., 1997; Syntin and Robaire, 2001). Sin embargo, las alteraciones en el flagelo y el acrosoma observadas en hámsteres viejos podrían ser un defecto primario originado durante el proceso de espermiogénesis pues estas sí que las hemos observado en el epitelio en nuestro estudio. La presencia de dos flagelos rodeados por una simple membrana ha sido descrita en ratas (Syntin and Robaire, 2001), y esto puede ocasionar en algunas ocasiones el denominado “Dag defect” (Blom and Birch-Andersen, 1996) que se relaciona con el enrollamiento posterior de la cola de los espermatozoides (Calvo et al., 1995). Esta alteración podría deberse a un defecto primario en hámsteres viejos y que está asociado con modificaciones mitocondriales. Éste defecto se corresponde con los espermatozoides con varias colas descritos por Nistal et al., (1977). En resumen, el envejecimiento principalmente afecta los procesos de espermiogénesis relacionados con la formación del acrosoma y la estructura de la cola.

También se ha podido evidenciar alteraciones ultraestructurales en las células de Sertoli en nuestro estudio en el envejecimiento que incluyen vacuolización citoplasmática, un incremento en gotas lipídicas, lipofuscina y cuerpos residuales. La vacuolización de célula de Sertoli, es una lesión no específica, un fenómeno que ocurre en varias condiciones patológicas como en túbulos con sólo células de Sertoli, atrofia testicular radioactiva y atrofas causadas por la administración de drogas en tratamientos de tumores (Nistal and Paniagua, 1984). Aparece antes de la degeneración extendida de las células germinales

y es considerado como un indicador temprano del daño de las células de Sertoli (Russell et al., 1990). Además, la pérdida de células germinales probablemente determina el desarrollo de vacuolas en las células de Sertoli (Paniagua et al., 1991). La progresiva acumulación de gotas lipídicas en células de Sertoli con la edad también ha sido descrita en el hombre (Lynch and Scout, 1950); Paniagua et al., 1987, 1990). Se ha sugerido que la acumulación de gotas lipídicas es debida a la digestión de las células germinales que han sido fagocitadas por células de Sertoli (Paniagua 1987; Sinha Hikim et al., 1988). Los numerosos cuerpos residuales observados en el citoplasma de células de Sertoli viejas apoyaría esta hipótesis. La acumulación de lipofucsina suele encontrarse en tejidos viejos (Sohal and Brunk, 1989; Serre and Robaire, 1998; Calvo et al., 1999). Esta acumulación suele ser causada por una disminución en las rutas de degradación o por la formación de stress oxidativo asociado al proceso de envejecimiento.

En síntesis, esta tesis muestra que las modificaciones de la lámina propia del túbulo seminífero con la edad están acompañadas por varios cambios en el epitelio. Como indican otros autores, la lámina propia juega una parte en el mantenimiento (Davidoff et al., 1990) y diferenciación del epitelio (Lustig et al., 2000). Una lámina propia es necesaria para la estructura normal y la integridad funcional del epitelio seminífero y sus modificaciones con el envejecimiento deben contribuir a la degeneración del epitelio. Ahora bien, nuestro estudio aporta evidencias adicionales que indican que la lámina propia no es sólo el factor que debe estar involucrado, también las células de Sertoli deben estar implicadas en la atrofia del epitelio seminífero del hámster con el envejecimiento, dado que estas células están alteradas y están implicadas en el mantenimiento y diferenciación de las células germinales (Tindall et al., 1985). La pérdida de espermatoцитos en paquitene (Horn et al., 1996) y la disminución en la actividad proliferativa con el incremento en la apoptosis de células germinales observadas en los túbulos seminíferos de hámsteres envejecidos (Morales et al., 2007) sugiere la aparición durante el envejecimiento de modificaciones de las interacciones entre la célula de Sertoli y las germinales. Varias hipótesis pueden ser deducidas de los resultados de esta tesis. Por ejemplo, que haya una alteración primaria de la célula de Sertoli

que sea responsable de las alteraciones en el epitelio y la lámina propia. O que sea el espesor de la lámina propia el responsable de las alteraciones observadas en las células de Sertoli en testículos viejos y posteriormente esto conduzca al deterioro de la espermatogénesis; o quizás ambas, tanto el daño en la célula de Sertoli y el espesor de la lámina propia sean procesos independientes que contribuyen a la degeneración del epitelio seminífero al mismo tiempo.

En conclusión, en testículos de los hámsteres viejos, los túbulos seminíferos muestran importantes cambios ultraestructurales tanto en la lámina propia como en el epitelio. La lámina propia tiene un incremento de proteínas de la matriz extracelular y el epitelio seminífero muestra importantes modificaciones en las células de Sertoli y la espermiogénesis. Se observa una disminución de la proliferación total de las espermatogonias. Ésta se asocia con el tipo de grado de degeneración o atrofia epitelial de las secciones de los túbulos seminíferos, y con el aumento del porcentaje de las mismas con la edad. Este fenómeno acontece en parte en los animales de mediana edad, en los que aunque no se observa una disminución significativa de la proliferación total, ésta sí ocurre en relación con al grado de degeneración epitelial de las secciones de los túbulos seminíferos.

6. CONCLUSIONES

1. A los seis meses de edad, los túbulos seminíferos del hámster *Mesocricetus auratus* no muestran ninguna alteración morfológica relevante. A los 24 meses de edad se observa un parénquima formado por secciones de túbulos con epitelio seminífero normal alternando significativamente con otras con diversos grados de alteración o degeneración histológica, incluyendo la hipoespermatogénesis, detención de la maduración celular a nivel de espermatocitos y espermátidas; túbulos con espermatogonias y células de Sertoli, túbulos con sólo células de Sertoli.

2. Los resultados morfológicos cuantitativos indican que el volumen total del testículo disminuye con la edad. También los túbulos seminíferos de hámster sufren una disminución en el diámetro tubular, diámetro de la luz y volumen total tubular con el envejecimiento. Estas alteraciones están acompañadas por un incremento en la longitud total del túbulo. Así mismo el volumen epitelial disminuye significativamente con la edad.

3. El envejecimiento supuso un incremento del volumen de inmunotinción de fibronectina y laminina, junto con esto, el grosor de la lámina propia determinado mediante microscopía electrónica se incrementó significativamente en las secciones tubulares con diferente grado de degeneración epitelial.

4. Ultraestructuralmente se observa en nuestro estudio que el envejecimiento principalmente afecta a la célula de Sertoli y el proceso de espermiogénesis, especialmente, en la formación del acrosoma y la estructura de la cola del espermatozoide.

5. En los hámsteres envejecidos se observa una disminución de la proliferación total de las espermatogonias. Tal disminución se asocia con el tipo de grado de degeneración o atrofia epitelial de las secciones de los túbulos seminíferos. Este fenómeno acontece también en los animales de mediana edad en los que aunque no se observa una disminución significativa de la proliferación total, ésta sí ocurre en relación con al grado de degeneración epitelial de las secciones de túbulos seminíferos.

6. En síntesis, en los testículos de hámsteres viejos, los túbulos seminíferos muestran importantes cambios histológicos en su lámina propia y de una forma no uniforme en su epitelio seminífero que afectan a diversos parámetros del tubo. Tales alteraciones parecen relacionarse con la involución de la célula de Sertoli con la edad. Así mismo, la atrofia o degeneración epitelial se asocia con una disminución total de la proliferación total de las espermatogonias que especialmente sucede en las zonas de los túbulos seminíferos donde existe esa degeneración epitelial.

7. RESUMEN/ SUMMARY

Un área muy actual de investigación es el estudio de las causas del envejecimiento. En el ámbito de la biología reproductiva también lo está siendo por sus implicaciones tanto en la medicina como en la veterinaria. Si durante muchos años los estudios se han centrado en la mujer o en las hembras para explicar el descenso reproductivo con la edad actualmente se está prestando más atención al factor masculino. Estos estudios abordan varios aspectos: cambios endocrinos, alteraciones de los espermatozoides, transmisión de enfermedades hereditarias, o la necesidad de terapias sustitutivas de testosterona en la vejez. Respecto a los cambios histológicos del testículo envejecido, se han realizado diversos estudios desde hace décadas, pero han dejado ciertas cuestiones sin aclarar y se han centrado en el hombre y en la rata. Junto a esto, durante los últimos años, diversos autores han propuesto que el mecanismo tisular implicado en la progresiva disminución de la espermatogénesis con la edad, está relacionado con cambios en el equilibrio entre la proliferación/apoptosis en el epitelio seminífero. En la presente tesis doctoral nos hemos propuesto por un lado, realizar un completo análisis histológico tanto cualitativo como cuantitativo de los cambios que acontecen con la edad en el epitelio seminífero y pared tubular del hámster sirio. Por otro, hemos investigado también si la proliferación está o no alterada en este epitelio relacionándola con las alteraciones histológicas observadas en el mismo. Para

ello, utilizamos hámsteres machos de 6, 12 y 24 meses de edad. Los testículos fueron fijados y procesados para microscopia de luz convencional e inmunohistoquímica y, electrónica de transmisión. Se realizó un estudio semicuantitativo del tipo histológico de degeneración de las secciones de los túbulos seminíferos determinando el grado de progresiva alteración de su epitelio con la edad. Inmunohistoquímicamente se identificó la inmunoreactividad a laminina y fibronectina en la pared tubular y las células en proliferación. Morfométricamente se calculó una serie de parámetros testiculares y el volumen total de inmunoreactividad a fibronectina y laminina. Respecto a la proliferación se calculó el índice total de proliferación como el número de células proliferando por tipo histológico de sección tubular. Por último, con las secciones ultrafinas se realizó una descripción ultraestructural del epitelio seminífero y se calculó el grosor de la pared tubular. En los animales envejecidos se observó un incremento significativo de las secciones tubulares con diversas alteraciones del epitelio seminífero especialmente hipoespermatogénesis y detención de la espermatogénesis. El volumen del testículo, el diámetro y volumen del túbulo como el volumen de epitelio del túbulo seminífero sufrieron un descenso significativo con la edad, por el contrario la longitud del túbulo se incrementó. El volumen de fibronectina y laminina aumento en los animales viejos siendo el índice de proliferación menor en estos animales. El número de células en proliferación por tipo histológico de sección de túbulo seminífero fue progresivamente y significativamente menor en las secciones alteradas respecto a las secciones normales. No se observó diferencias significativas respecto a la edad entre tipos histológicos de sección de túbulo seminífero. Ultraestructuralmente se observó alteraciones citológicas importantes en la célula de Sertoli así como en el proceso de espermiogénesis. La pared presentó un engrosamiento significativo tanto en los túbulos normales como en los hipoespermatogénicos o en detención de la espermatogénesis. En conclusión, el envejecimiento del túbulo seminífero del hámster supone una pérdida progresiva de la actividad espermatogénica que está relacionada con cambios del túbulo y de su pared. Estos cambios no se producen de forma uniforme en todo él y se asocian a una disminución de la proliferación celular en sus zonas alteradas histológicamente. Éstas presentan además células de Sertoli modificadas ultraestructuralmente.

A very current area of research is the study of the causes of aging. In the field of reproductive biology the aging is important by their implications both in medicine and veterinary. If for many years the studies have focused on women or females to explain the reproductive decline with age it is now being paid more attention to male factor. These studies address several aspects: endocrine changes, abnormal sperm, transmission of hereditary diseases, or the need for testosterone replacement therapy in older age. Regarding the histological changes of aging testes, they have conducted several studies for decades, but have left some issues unclear and have focused on humans and rats. Alongside this, in recent years, several authors have proposed that the mechanism involved in decrease of spermatogenesis with age, is related to changes in the balance between proliferation / apoptosis in the seminiferous epithelium. In this thesis we have proposed on the one hand, a complete histological analysis of qualitative and quantitative changes that occur with age in the seminiferous epithelium and tubular wall of the Syrian hamster. Furthermore, we have also investigated whether this proliferation in the epithelium altered is linked with the histological changes observed in it. To do this, we use male hamsters 6, 12 and 24 months old. The testes were fixed and

processed for conventional light microscopy, immunohistochemistry and transmission electron microscopy. A semiquantitative histological study of sections of seminiferous tubules for determining the degree of gradual deterioration with age, in its epithelium was performed with age. Immunoreactivity to laminin and fibronectin in the tubular wall and proliferating cells was identified. Morphometrically a series of testicular parameters and the total volume of fibronectin and laminin immunoreactivity was calculated. The total proliferation index as the number of proliferating cells by histologic type of tubular section was calculated. Finally, with ultrathin sections, an ultrastructural description of seminiferous epithelium, and thickness determination of tubular wall was performed. In aged animals a significant increase in the tubular sections with various disorders especially hypospermatogenesis of seminiferous epithelium and arrest of spermatogenesis was observed. The testicular volume, diameter and volume as epithelial volume of seminiferous tubule suffered a significant decrease with age, on the contrary an increased tubule length was observed. An increase in fibronectin and laminin volume in old animals and less proliferation rate in these animals was determined. The number of proliferating cells per histologic section of seminiferous type tubule, progressively and significantly decrease in altered sections respect to normal sections. No significant differences respect to age between histological types sections of seminiferous tubule was observed. Ultrastructurally important cytological changes were observed in the Sertoli cell and the process of spermiogenesis. The wall thickening showed an increase significant in normal, hipospermatogenic and spermatogenesis arrest tubules. The number of proliferating cells per histologic section of seminiferous type tubule, progressively and significantly decrease in altered sections respect to normal sections. In conclusion, the aging of the seminiferous tubule hamster suppose a loss of spermatogenic activity which is related to changes in the tubule and its wall. These changes do not occur uniformly throughout the tubule and they associated with a decrease in cell proliferation in altered tubular areas. These areas also have Sertoli cells with a modified ultrastructure.

8. BIBLIOGRAFÍA

-Albrecht ED, Lane MV, Marshall GR, Merchenthaler I, Simorangkir DR, Pohl CR, Plant TM, Pepe GJ. Estrogen promotes germ cell and seminiferous tubule development in the baboon fetal testis. *Biology of Reproduction*. 81(2), 406-414. 2009.

-Arenas MI, Bethencourt R, DE Miguel MP, Fraile B, Romo E, Paniagua R. Immunocytochemical and quantitative study of actin, desmin and vimentin in the peritubular cells of the testes from elderly men. *Journal of Reproduction and Fertility* 110, 183-193. 1997.

-Beltrán-Frutos E, Seco-Rovira V, Ferrer C, Madrid JF, Sáez FJ, Canteras M, Pastor LM. Cellular changes in the hamster testicular interstitium with ageing and after exposure to short photoperiod. *Reproduction, Fertility and Development*. Dec 2. doi: 10.1071/RD14117. [Epub ahead of print]. 2014.

-Beltrán-Frutos E, Seco-Rovira V, Ferrer C, Martínez-Hernández J, Madrid JF, Saez FJ, Canteras M, LM Pastor. Changes in testicular interstitial connective tissue of hamsters (*Mesocricetus auratus*) during ageing and after exposure to short photoperiod. *Reproduction in Domestic Animals*. doi: 10.1111/rda.12644. 2015.

-Bernal-Mañas CM, Morales E, Pastor LM, Pinart E, Bonet S, Rosa Pde L, Dolors Briz M, Zuasti A, Ferrer C, Canteras M. Proliferation and apoptosis of spermatogonia in postpuberal boar (*Sus domesticus*) testes with spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchidism. *Acta Histochemica*. 107(5), 365-372. 2005.

-Blottner S, Roelants H, Wagener A, Wenzel UD. Testicular mitosis, meiosis and apoptosis in mink (*Mustela vison*) during breeding and non-breeding seasons. *Animal Reproduction Science*. 57(3-4), 237-249. 1999.

- Blom and Birch-Andersen. The ultrastructure of the new hereditary sterilizing defect (the Dag defect) in the bull sperm tail. *Proc. Vth. Congr. Fertil. Excerpt. Med. Fdn. Int. Congr. Ser. 133*, 602-605. 1996.
- Borland K, Muffly KE, Hall PF. Production of components of extracellular matrix by cultured rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction*. 35(4), 997-1008. 1986.
- Boyle M, Wong C, Rocha M, Jones DL. Decline in self-renewal factors contributes to aging of the stem cell niche in the *Drosophila* testis. *Cell Stem Cell*. Oct 11;1 (4):470-8. doi: 10.1016/j.stem. 2007
- Burgos MH, Vitale-Calpe R, Aoki A. Fine structure of the testis and its functional significance. In: *The testis*. Johnson AD, Gomes WR and Van Demark NL (eds). Academic Press. New York. Pp 551-649. 1970.
- Calvo A, Pastor LM, Gallego-Huidobro J, Horn R, Pallares J. Abnormal spermatozoa in the cauda epididymidis of adult and aged hamsters (*Mesocricetus auratus*): a study by electron microscopy. *Acta Anatomica*. 154(3), 186-195. 1995.
- Calvo A, Bustos-Obregón E, Pastor LM. Morphological and histochemical changes in the epididymis of hamsters (*Mesocricetus auratus*) subjected to short photoperiod. *Journal of Anatomy*. 191, 77-88. 1997.
- Calvo A, Pastor LM, Martínez E, Vázquez JM, Roca J. Age-related changes in the hamster epididymis. *The Anatomical Record*. 256(4), 355-346. 1999.
- Chen SR, Liu YX. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction*. 149(4), R159-167. 2015.

- Dakouane M, Bicchieray L, Bergere M, Albert M, Vialard F, Selva J. A histomorphometric and cytogenetic study of testis from men 29-102 years old. *Fertility and Sterility*. 83(4), 923-928. 2005.
- Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell and Tissue Research*. 262(2), 253-261. 1990.
- De Miguel, Bethencourt FR, Arenas MI, Fraile B, Paniagua R. Intermediate filaments in the Sertoli cells of the ageing human testis. *Virchow's Archives* 431, 131-138. 1997.
- Dunkel L, Hirvonen V, Erkkilä K. Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis. *Cell Death and Differentiation*. 4(3), 171-179. 1997.
- 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.
- Ferder IC, Wang N. Hypermaintenance and hypofunction of aged spermatogonia: insight from age-related increase of Plzf expression. *Oncotarget*. 6(18), 15891-15901. 2015.
- Fukuda T, Kikuchi M, Kurotaki T, Oyamada T, Yoshikawa H, Yoshikawa T. Age-related changes in the testes of horses. *Equine Veterinary Journal*. 33(1), 20-25. 2001.
- Gosden RG, Richardson DW, Brown N, Davidson DW. Structure and gametogenic potential of seminiferous tubules in ageing mice. *Journal of Reproduction and Fertility*. 64, 127-133. 1982.

-Gueresi P, Miglio R, Monti D, Mari D, Sansoni P, Caruso C, Bonafede E, Bucci L, Cevenini E, Ostan R, Palmas MG, Pini E, Scurti M, Franceschi C. Does the longevity of one or both parents influence the health status of their offspring? *Experimental Gerontology*. 48(4), 395-400. 2013.

-Gülkesen KH, Erdoğan T, Sargin CF, Karpuzoğlu G. Expression of extracellular matrix proteins and vimentin in testes of azoospermic man: an immunohistochemical and morphometric study. *Asian Journal of Andrology*. 4(1), 55-60. 2002.

-Hadley MA, Dym M. Immunocytochemistry of extracellular matrix in the lamina propria of the rat testis: electron microscopic localization. *Biology of Reproduction*. 37(5), 1283-1289. 1987.

-Hamden K, Silandre D, Delalande C, Elfeki A, Carreau S. Protective effects of estrogens and caloric restriction during aging on various rat testis parameters. *Asian Journal of Andrology*. 10(6), 837-845. 2008.

-Harbitz TB. Morphometric studies of Leydig cells in elderly men with special references to the histology of the prostate. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*. 81A, 301-313. 1973.

-Heindel JJ, Treinen KA. Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Toxicologic Pathology*. 17(2), 411-445. 1989.

-Holstein AF, Schütte B, Becker H, Hartmann M. Morphology of normal and malignant germ cells. *International Journal of Andrology*. 10(1), 1-18. 1987.

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

-Ichirara I, Kawamura H, Pelliniemi 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.

-Inaba M, Yuan H, Yamashita YM. String (Cdc25) regulates stem cell maintenance, proliferation and aging in *Drosophila* testis. *Development*. 138(23), 5079-5086. 2011.

-Itoh M, Li XQ, Miyamoto K, Takeuchi Y. Degeneration of the seminiferous epithelium with ageing is a cause of spermatoceles? *International Journal of Andrology*. 22(2), 91-96. 1999.

-Jiang H, Zhu WJ, Li J, Chen QJ, Liang WB, Gu YQ. Quantitative histological analysis and ultrastructure of the aging human testis. *International Urology and Nephrology*. 46(5), 879-885. 2014.

-Johnson L, Zane RS, Petty CS, Neaves WB. Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age related decline. *Biology of Reproduction* 31, 785-95. 1984.

-Johnson L. Spermatogenesis and aging in the human. *Journal of Andrology* 7, 331-354. 1986a.

-Johnson L, Petty CS, Neaves WB Age-related variation in seminiferous tubules in men. A stereologic evaluation. *Journal of Andrology*. Sep-Oct;7 5):316-22. 1986b

-Johnson L, Nguyen HB, Petty CS, Neaves WB. Quantification of human spermatogenesis: germ cell degeneration during spermatocytogenesis and meiosis in testes from younger and older adult men. *Biology of Reproduction* 37, 739-747. 1987.

- Johnson L, Abdo JG, Petty CS, Neaves WB. Effect of age on the composition of seminiferous tubular boundary tissue and on the volume of each component in humans. *Fertility and Sterility*. 49, 1045-1051.1988.
- Johnson SL, Dunleavy J, Gemmell NJ, Nakagawa S. Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Research Reviews*. 19:22-33. 2015
- Kim GH, Wright WW. A comparison of the effects of testicular maturation and aging on the stage-specific expression of cp-2/catehpsin L messenger ribonucleic acid by Sertoli cells of the Brown Norway rats. *Biology of Reproduction* 57, 1467-1477. 1997.
- Kimura M, Itoh N, Takagi S, Sasao T, Takahashi A, Masumori N, Tsukamoto T. Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *Journal of Andrology*. 24(2), 185-191. 2003.
- Kirkwood TB, Austad SN. Why do we age? *Nature*. 408(6809), 233-238. 2000.
- Levy S, Serre V, Hermo L, Robaire B. The effects of aging on the seminiferous epithelium and the blood-testis barrier of the Brown Norway rat. *Journal of Andrology*. 20(3), 356-365. 1999.
- Lustig L, Denduchis B, Ponzio R, Lauzon M, Pelletier RM. Passive immunization with anti-laminin immunoglobulin G modifies the integrity of the seminiferous epithelium and induces arrest of spermatogenesis in the guinea pig. *Biology of Reproduction*. 62(6), 1505-1514. 2000.
- Lynch KM Jr, Scott WW. The lipid content of the Leydig cell and Sertoli cell in the human testis as related to age, benign prostatic hyperplasia, and prostatic cancer. *The Journal of Urology*. 64(6), 767-776. 1950.

- Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *European Journal of Endocrinology*. 145(5), 561-571. 2001.
- Miething A. Proliferative activity of the developing seminiferous epithelium during prespermatogenesis in the golden hamster testis measured by bromodeoxyuridine labelling. *Anatomy and Embryology*. 187, 249-258. 1993.
- Miething A. The bridge-partitioning complex of germ-cell intercellular bridges in the testis of the golden hamster. *Cell and Tissue Research*. 281(2), 359-365. 1995.
- Morales E, Pastor LM, 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, Ferrer C, Zuasti A, Garcia-Borron JC, Canteras M, Pastor LM. Apoptosis and molecular pathways in the seminiferous epithelium of aged and photoinhibited Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Andrology*. 28(1), 123-135. 2007.
- Nipken C, Wrobel H. A quantitative morphological study of age-related changes in the donkey testis in the period between puberty and senium. *Andrologia* 29, 149-161. 1997.
- Nistal M, Paniagua R. Infertility in adult males with retractile testes. *Fertility and Sterility*. 41(3), 395-403. 1984.
- Nistal M, Codesal J, Paniagua R, Santamaría L. Decrease in the number of human Ap and Ad spermatogonia and in the Ap/Ad ratio with advancing age. New data on spermatogonial Stem Cell. *Journal of Andrology* 8, 64-68. 1987.

- Obregon EB, Ramirez O. Ageing and testicular function in *Octodon degus*. *Andrologia* 29, 319-326. 1997.
- Ozkosem B, Feinstein SI, Fisher AB, O'Flaherty C. Advancing age increases sperm chromatin damage and impairs fertility in peroxiredoxin 6 null mice. *Redox Biology*. 5, 15-23. 2015.
- Paniagua R, Amat P, Nistal M, Martin A. Ultrastructural changes in Sertoli cells in ageing humans. *Internacional Journal of Andrology*. 8(4). 295-312. 1985.
- Paniagua R, Nistal M, Amat P, Rodríguez MC, Alonso JR. Quantitative differences between variants of A spermatogonia in man. *Journal of Reproduction and Fertility*. 77(2):669-73. 1986.
- Paniagua R, Nistal M, Amat P, Rodriguez MC, Martin A. Seminiferous tubule involution in elderly men. *Biology of Reproduction*. 36(4), 939-947. 1987.
- Paniagua R, Martinez-Onsurbe P, Santamaria L, Saez FJ, Amat P, Nistal M. Quantitative and ultrastructural alterations in the lamina propria and Sertoli cells in human cryptorchid testes. *International Journal of Andrology*. 13(6), 470-487. 1990.
- Paniagua R, Nistal M, Sáez FJ, Fraile B. Ultrastructure of the aging human testis. *Journal of Electron Microscopy Technique*. 19, 241-260. 1991.
- Pastor LM, Zuasti A, Ferrer C, Bernal-Mañas 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.

- Paul C, Robaire B. Impaired function of the blood-testis barrier during aging is preceded by a decline in cell adhesion proteins and GTPases. *PLoS One*. 8 (12):e84354. doi: 10.1371/journal.pone.0084354. eCollection 2013.
- Priyono H, Schirren U. Importance of the tubular diameter in testicular biopsy of oligozoospermia. *Andrología*. 17(6), 541-545. 1985.
- Pop OT, Cotoi CG, Pleșea IE, Gherghiceanu M, Enache SD, Mandache E, Hortopan G, Pleșea RM. Histological and ultrastructural analysis of the seminiferous tubule wall in ageing testis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 52(1), 241-248. 2011.
- Rajesh Kumar T, Muralidhara. Oxidative stress response of rat testis to model prooxidants in vitro and its modulation. *Toxicology in Vitro*. 16(6), 675-682. 2002.
- Rajeswary S, Kumaran B, Ilangovan R, Yuvaraj S, Sridhar M, Venkataraman P, Srinivasan N, Aruldas MM. Modulation of antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats. *Reproductive Toxicology*. 24(3-4), 371-380. 2007.
- Richardson LL, Kleinman HK, Dym M. The effects of aging on basement membrane in the testis. *Journal of Andrology* 16, 118-126. 1995.
- Roosa KA, Zysling DA, Place NJ. An assessment of anti-Müllerian hormone in predicting mating outcomes in female hamsters that have undergone natural and chemically-accelerated reproductive aging. *General and Comparative Endocrinology*. 214, 56-61. 2015.
- 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.

-Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells*. 24(6), 1505-1511. 2006.

-Salama M, Tsuji M, Tamura M, Kagawa S. Impact of aging and diabetes mellitus on the expression of the proliferating cell nuclear antigen in rat testicular tissue. *Archives of Andrology*. 40(2), 95-107. 1998.

-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.

-Schoenfeld HA, Hall SJ, Boekelheide K. Continuously proliferative stem germ cells partially repopulate the aged, atrophic rat testis after gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. *Biology of Reproduction*. 64(4), 1273-1282. 2001.

-Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos E, Ferrer C, Saez FJ, Madrid JF, Canteras M, Pastor LM. Testicular histomorphometry and the proliferative and apoptotic activities of the seminiferous epithelium in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) during regression owing to short photoperiod. *Andrology*. 3(3), 598-610. 2015.

-Serre V, Robaire B. Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. *Biology of Reproduction*. 58(2), 497-513. 1998.

-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. 1988.

-Skinner MK, Fritz IB. Structural characterization of proteoglycans produced by testicular peritubular cells and Sertoli cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 260(21), 11874-11883. 1985.

-Söderström KO. Tubular hyalinization in human testis. *Andrología*. 18(1), 97-103. 1986.

-Sohal RS, Brunk UT. Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. *Advances in experimental medicine and biology*. 266, 17-26. 1989.

-Schulze C, Schütte B. Concretions in the human testis are derived from the basal lamina of seminiferous cords. *Cell and Tissue Research*. 260, 1-12. 1990.

-Swanson LJ, Desjardins C, Turke FW. Aging of the reproductive system in the male hamster: behavioural and endocrine patterns. *Biology of Reproduction* 26, 791-799. 1982

-Syntin P, Robaire B. Sperm structural and motility changes during aging in the Brown Norway rat. *Journal of Andrology*. 22(2), 235-244. 2001.

-Takano H, Abe K. Age-related histologic changes in the adult mouse testis. *Archivum Histologicum Japonicum*. 50(5), 533-544. 1987

-Tanemura K, Kurohmaru M, Kuramoto K, Matsumoto M, Hayashi Y. Age-related changes in cytoskeletal components of the BDF mouse Sertoli cells *Tissue and Cell*. 26, 447-455. 1994.

- Tanemura K, Kanai Y, Kanai-Azuma M, Kurohmaru M, Kuramoto K, Yazaki K, Hayashi Y. Reinitiation of spermatogonial mitotic differentiation in inactive old BDF1 mouse seminiferous tubules transplanted to W/W^v mouse testis. *Biology of Reproduction*. 55(6), 1237-1242. 1996.
- Tindall DJ, Rowley DR, Murthy L, Lipshultz LI, Chang CH. Structure and biochemistry of the Sertoli cell. *International Review of Cytology*. 94, 127-149. 1985.
- Tsitouras PD. Effects of age on testicular function. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 16(4), 1045-1059. 1987.
- Tung PS, Fritz IB. Extracellular matrix promotes rat Sertoli cell histotypic expression in vitro. *Biology of Reproduction*. 30(1), 213-229. 1984.
- Vigodner M, Lewin LM, Shochat L, Golan R. Spermatogenesis in the golden hamster: the role of c-kit. *Molecular Reproduction and Development*. 60(4), 562-568. 2001.
- Volkman J, Müller D, Feuerstacke C, Kliesch S, Bergmann M, Mühlfeld C, Middendorff R. Disturbed spermatogenesis associated with thickened lamina propria of seminiferous tubules is not caused by dedifferentiation of myofibroblasts. *Human Reproduction*. 26(6), 1450-1461. 2011.
- Wang C, Leung A, Sinha-Hikim AP. Reproductive aging in the male brown-Norway rat: a model for the human. *Endocrinology*. 133(6), 2773-2781. 1993.
- Wilding M. Potential long-term risks associated with maternal aging (the role of the mitochondria). *Fertility and Sterility*. 103(6), 1397-1401. 2015.
- Wright WW, Fiore C, Zirkin BR. The effect of aging on the seminiferous epithelium of the Brown Norway Rat. *Journal of Andrology* 14, 110-117. 1993.

-Xia ZP, Zheng XM, Zheng H, Liu XJ, Liu GY, Wang XH. Downregulation of cold-inducible RNA-binding protein activates mitogen-activated protein kinases and impairs spermatogenic function in mouse testes. *Asian Journal of Andrology*. 14(6), 884-889. 2012.

-Zakhidov ST, Gordeeva OF, Marshak TL. A biological model of accelerated aging. III. Histological characteristics of age-related changes of spermatogenic epithelium in mice SAM (senescence-accelerated mouse). *Izvestiia Akademii nauk. Serii biologicheskaja*. (4), 389-395. 2001.

-Zakhidov ST, Khokhlov AN, Malolina EA, Kulibin Alu, Marshak TL. Ageing of the spermatogenesis system. *Izvestiia Akademii nauk. Serii biologicheskaja*. (1), 16-24.2010

-Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY, Wang RS, Chang YJ, Mendis-Handagama C, Hu L, Lardy H, Chang C. Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 103(47), 177718-17723. 2006.