

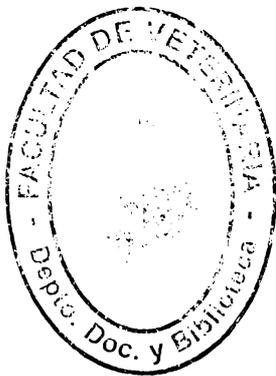
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DISTRIBUCIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN EL EPIDÍDIMO
DEL CORDERO NEONATO Y EL EFECTO DE LA NUTRICIÓN FETAL**

por

Javier ITHURRALDE LEMES



TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias (orientación Higiene,
Inspección, Control, Tecnología de
los Alimentos de Origen Animal)

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2009**

TG 158
Distribución del
FV/28451



PÁGINA DE APROBACIÓN.



TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de mesa:

Celia Tasende:

Celia Tasende

Segundo miembro (Tutor):

Alejandro Bielli:

Alejandro Bielli

Tercer miembro:

Graciela Pedrana:

Graciela Pedrana

Fecha: 18 de Diciembre del 2009.

Autor:

Javier Ithurralde

JAVIER ITHURRALDE

✓

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con *12 (doce)* *ts*

DEDICATORIA

A la memoria de mi querido abuelo "Bebelo".

PÁGINA DE AGRADECIMIENTOS

A mi familia, abuelos, padres y hermanos; a mi novia; y a mis amigos.

A todos ellos les agradezco todo su importante apoyo y sus estímulos.

A mi Tutor, Alejandro Bielli, muchas gracias por su tiempo, su dedicación y por todo lo aprendido.

A Patricia Genovese quien realizó las corridas inmunohistoquímicas y trabajó junto a mí en las evaluaciones.

A Raquel Pérez, Graciela Pedrana, John T.B. Milton, Álvaro Lopez, Margaret A. Blackberry, Gregory Duncombe, Heriberto Rodríguez-Martínez y Graeme B. Martin, autores del artículo original cuyo diseño experimental fue utilizado para mi tesis.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	Página
	II
AGRADECIMIENTOS.....	Página
	IV
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	Página
	VII
1. RESUMEN.....	Página
	VIII
2. SUMMARY.....	Página
	IX
3. INTRODUCCIÓN.....	10
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
4.1 RESEÑA HISTÓRICA SOBRE EL EPIDÍDIMO.....	12
4.2 DESARROLLO DEL EPIDÍDIMO.....	13
4.2.1 Aspectos genéticos del desarrollo epididimario.....	14
4.2.2 <u>Los andrógenos, el receptor de andrógenos (AR), y el desarrollo epididimario</u>.....	15
4.2.3 <u>Factores de crecimiento y desarrollo epididimario</u>.....	15
4.2.4 <u>Desarrollo embrionario de las regiones epididimarias</u>	16
4.2.5 <u>Desarrollo epididimario postnatal.</u>	16
4.2.5.1 El período indiferenciado.	16
4.2.5.2 El período de diferenciación.....	17
4.2.5.3 El período de expansión.....	17
4.3 ASPECTOS GENERALES DE LA FISIOLÓGÍA EPIDIDIMARIA..	17
4.3.1 <u>Funciones epididimarias</u>.....	17
4.3.1.1 El transporte de los espermatozoides.....	17
4.3.1.2 La maduración espermática.....	18
4.3.1.3 Almacenamiento y protección de los espermatozoides.....	19
4.3.2 <u>La barrera hemato-epididimaria</u>.....	20
4.4 ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL EPIDÍDIMO.....	21
4.5 LOS ANDRÓGENOS Y OTROS FACTORES VINCULADOS A LAS FUNCIONES EPIDIMARIAS.....	22
4.6 EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN EL EPIDÍDIMO.....	24
4.7 TIPOS CELULARES EPITELIALES EPIDIDIMARIOS Y FUNCION EPIDIDIMARIA.....	25
4.8 ONTOGENIA DE LAS REGIONES HISTOLÓGICAS EPIDIDIMARIAS.....	28

4.9 LA INMUNOHISTOQUÍMICA DEL AR COMO EN CARE ADECUADO PARA PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD EPIDIMARIA Y LA INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN.....	30
4.10 INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN SOBRE LA REPRODUCCIÓN..	30
5. OBJETIVOS.....	32
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	32
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
6. HIPOTESIS.....	33
7. MATERIALES Y METODOS.....	34
7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL, ANIMALES Y TRATAMIENTO.....	34
7.2 INMUNOHISTOQUÍMICA DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENO.....	35
7.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
8. RESULTADOS.....	37
8.1 PESO CORPORAL.....	37
8.2 PESO TESTICULAR Y PESO EPIDIDIMARIO.....	37
8.3 INMUNOPOSITIVIDAD AL AR.....	38
9. DISCUSIÓN.....	44
9.1 LA DISTRIBUCIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN EL EPIDÍDIMO DEL CORDERO NEONATO.....	44
9.2 ABUNDANCIA RELATIVA DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN LAS DISTINTAS REGIONES Y TIPOS CELULARES.....	44
9.3 DIFERENCIAS EN LA INMUNOPOSITIVIDAD AL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS SEGÚN COMPARTIMIENTOS HISTOLÓGICOS.....	47
9.4 EFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN FETAL SOBRE LA INMUNOPOSITIVIDAD AL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN EL EPIDÍDIMO DEL CORDERO NEONATO.....	48
10. CONCLUSIONES.....	49
11. BIBLIOGRAFÍA.	50

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Fig. I: Representación esquemática del desarrollo del tracto genital en humanos (Hannema y Hughes, 2007)	14
Fig. II: Regiones histológicas del epidídimo del carnero adulto (Nicander, 1958).	21
Fig. III: Representación esquemática de los tipos celulares presentes en el epitelio epididimario. (Adaptado de Robaire y col, 2006).....	26
Fig. IV: Distribución de regiones histológicas en el epidídimo de corderos neonatos seleccionados de una majada más grande.....	29
Fig. V: Ejemplos de compartimientos histológicos a evaluar en el estudio inmunohistoquímico.....	36
Tabla 1: Pesos testiculares y epididimarios (medias \pm errores std de la media).....	37
Tabla 2: Índices de inmunopositividad al AR para los distintos compartimientos histológicos y regiones epididimarias (medias \pm errores std de la media).....	39
Gráfico 1: índices de inmunopositividad (IIP) para las células principales según regiones histológicas (valores pooleados por región). (medias \pm errores std de la media).....	40
Gráfico 2: índices de inmunopositividad (IIP) para las células musculares lisas según regiones histológicas (valores pooleados por región). (medias \pm errores std de la media).....	40
Gráfico 3: índices de inmunopositividad (IIP) para las células intersticiales según regiones histológicas (valores pooleados por región). (medias \pm errores std de la media).....	41
Gráficos 4a; 4b; 4c y 4d: índices de inmunopositividad al AR para los distintos compartimientos histológicos (ICP, IML e IIT) dentro de cada una de las regiones histológicas: 4a (E), 4b (Cabeza), 4c (Cuerpo) y 4d (Cola). (medias \pm errores std de la media).....	42
Fig VI: Ejemplo de diferencias en la inmunopositividad al AR entre regiones histológicas.....	43

1. RESUMEN

El epidídimo es un órgano andrógeno-dependiente, esencial para la reproducción dadas sus funciones de transporte, maduración y almacenamiento de espermatozoides. El receptor de andrógeno (AR) se expresa en todas las regiones del epidídimo ovino adulto. En el cordero neonato el epidídimo presenta menor número de regiones histológicas que en el adulto. Para estudiar la distribución y la abundancia relativa del AR en el epidídimo neonatal ovino, y el efecto de la subnutrición fetal sobre dichas variables, ovejas Merino australiano gestando un único feto macho fueron sometidas a 110% (Grupo alto, n=12) o 70% (Grupo bajo, n=13) de sus requerimientos gestacionales de energía metabolizable, desde la semana 10 hasta el parto. Los corderos recién nacidos fueron pesados y sacrificados a las 48 horas. Sus epidídimos se pesaron, fijaron en formol bufferado al 4% y se procesaron histológicamente. Cortes de 5µm en láminas silanizadas fueron tratados con un anticuerpo primario de ratón anti AR humano (AR 441, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) y con un kit revelador LSAB+ (código K0679, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), en las regiones histológicas epididimarias de los conductillos eferentes (región e), cabeza, cuerpo y cola. Se evaluó la presencia del AR al microscopio óptico (400X), y se determinó un índice de inmunopositividad para las células principales del epitelio epididimario, el músculo liso y el intersticio, en las regiones histológicas e, cabeza, cuerpo y cola epididimarias. Los valores de índices de inmunopositividad fueron comparados por análisis de varianza (ANOVA). El AR está presente en todas las regiones y compartimientos histológicos epididimarios, mostrando diferencias regionales en su distribución, y siendo más abundante en las células intersticiales que en otros compartimientos histológicos. Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre en el testículo, en el cual hay diferencias importantes en poblaciones celulares, un tratamiento de subnutrición fetal que afecta el peso corporal al nacimiento, pero no afecta el peso testicular ni epididimario, tampoco afecta la abundancia relativa ni la distribución del AR en el epidídimo del cordero neonato.

2. SUMMARY

The epididymis - an androgen-dependent organ – is essential for reproduction given its functions of maturation, transport, and storage of spermatozoa. The androgen receptor (AR) is present in all regions of the adult ovine epididymis. In the newborn lamb the epididymis consists of a smaller number of histological regions than in the adult ram. In order to study the distribution and relative abundance of the AR in the ovine neonatal epididymis, and the effect of fetal undernutrition on these variables, Merino ewes carrying a single male fetus were submitted to 110% (High group, n=12) or 70% (Low group n=13) of its metabolizable energy gestational requirements, from week 10 until birth. Newborn lambs were weighed and slaughtered 48 hours later. Their epididymides were weighed, fixed in 4% buffered formaldehyde, and processed for histology. Slides (5µm sections) were treated with a mouse primary antibody anti-human AR (AR 441, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) and with an LSAB+ (code K0679, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) kit, in the following epididymal histological regions: efferent ductules, caput, corpus and cauda. The presence of AR was evaluated using an light microscope (400X). An immunoreactivity index for principal cells, smooth muscle and stroma cells was determined in the efferent ductules, caput, corpus and cauda epididymidis. Differences in immunoreactivity indexes values were compared by analysis of variance (ANOVA). The AR is present in all histological regions and compartments of the ovine neonatal epididymis, with regional differences in its distribution, and being more abundant in stroma cells than in any other epididymal cell type. Furthermore, unlike what happens in the testis, which shows important differences in cell populations, an undernutrition treatment that affects the birth weights, without affecting testicular or epididymal weight, does not affect the relative abundance nor the distribution of AR in the ovine neonatal epididymis.

3. INTRODUCCIÓN

La reproducción es uno de los factores que incide de manera más significativa sobre los resultados obtenidos en los sistemas productivos animales. En este sentido resulta evidente que todos aquellos estudios que favorezcan un aumento de la eficiencia de la tasa reproductiva (nro. de crías/madre/año), conducen a mejorar los sistemas de producción animal en su conjunto.

Para que en un sistema productivo se obtengan los mejores resultados en lo que a reproducción se refiere, es fundamental conocer y cuidar minuciosamente todos los aspectos vinculados a la fisiología reproductiva, tanto de hembras como de machos.

En el caso de los ovinos, una mejora en la capacidad reproductiva (mayor potencial de producción espermática) de los machos utilizados para encarnear las ovejas de una majada, puede representar importantes beneficios para un productor. En la medida que se utilicen machos más eficientes en las encarneras, los resultados obtenidos serán mejores, significando relaciones de costos y beneficios más favorables para el sistema de producción.

Cada vez que un carnero monta a una oveja y eyacula, eyacula espermatozoides que luego de haberse formado en los testículos, se volvieron fertilizantes tras un complejo proceso de maduración que ocurre durante el transcurso de los mismos a lo largo del epidídimo. Es así que el epidídimo resulta ser un órgano fundamental para garantizar la calidad del eyaculado de un carnero utilizado como reproductor, ya sea en situaciones de monta natural, o bien en el caso de la inseminación artificial.

Todos los eventos fisiológicos epididimarios que conducen a que los espermatozoides que son eyaculados sean de calidad aceptable para la fertilización, están directamente vinculados con los elementos celulares que componen los tejidos de este órgano.

A su vez, la actividad de los tejidos funcionales epididimarios está altamente influida por los andrógenos. El epidídimo es un órgano andrógeno-dependiente por excelencia. Los andrógenos (testosterona, androsterona y androstenediona) producen sus efectos mediante la interacción con su receptor específico, el receptor de andrógenos (AR), a nivel celular.

La expresión de este receptor en las células del epidídimo puede determinar cambios en la capacidad del órgano para llevar adelante sus importantes funciones de maduración, transporte y protección de espermatozoides.

Por otra parte, la nutrición es uno de los factores limitantes de mayor peso sobre los sistemas de producción animal. El nivel y la calidad de la nutrición de una hembra gestante es decisivo para el desarrollo futuro de sus crías. El término "programación fetal" se refiere a las consecuencias permanentes generadas a partir de la exposición a determinados efectos en etapas claves del desarrollo animal. En este sentido, la subnutrición fetal puede "programar"

el desarrollo de un órgano, afectando de forma definitiva aspectos tales como la cantidad de elementos celulares en su parénquima, o bien la expresión de algún receptor hormonal clave para la fisiología de dicho órgano. Es así que es posible pensar que aquellos corderos que sufrieron deficiencias nutricionales durante su desarrollo prenatal, puedan sufrir alteraciones definitivas en algunos de sus tejidos, ya sean alteraciones morfológicas o bien cambios en la expresión de ciertas proteínas fundamentales para la actividad de un órgano en particular.

En el caso de la eficiencia reproductiva en carneros, este concepto nos permite especular con que aquellos carneros que durante su vida fetal sufrieron mala nutrición, pueden nacer con alteraciones en sus órganos reproductivos que modifiquen su capacidad de producción de espermatozoides viables, afectando los rendimientos de los sistemas de producción en los que se los utilice.

Como se verá más adelante, la hipótesis y los objetivos planteados para el presente trabajo se refieren a un aspecto particular de esta última especulación.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

4.1 RESEÑA HISTÓRICA SOBRE EL EPIDÍDIMO (basado en Robaire y col, 2006).

Las primeras descripciones escritas del epidídimo datan del siglo IV antes de Cristo, cuando Aristóteles lo describió en su *Historia Animalium*. Sin embargo, la primera descripción anatómica de un epidídimo disecado fue realizada por de Graaf en su monografía *Tractatus de Virorum Organis Generationi Inservientibus*, en 1668. Entre los años 1888 y 1928, se realizaron varias descripciones histológicas del epitelio epididimario y se comenzó a manejar como hipótesis que los fluidos epididimarios servían de “alimento” para los espermatozoides que transitaban por el conducto epididimario. En 1913 Tournade demostró que los espermatozoides que eran liberados de los segmentos proximales epididimarios no eran móviles, mientras que aquellos espermatozoides liberados desde los segmentos más distales del epidídimo eran completamente móviles. En 1926, Benoit afirmó que la función de las secreciones epididimarias es mantener la vitalidad espermática para permitir el desarrollo de la motilidad de los espermatozoides, así como posiblemente también protegerlos de agentes nocivos externos. Desde aproximadamente el año 1931 la mayoría de las interrogantes generales relacionadas con la fisiología del epidídimo se han resuelto, y la mayor parte del trabajo realizado por los investigadores desde entonces ha tenido como finalidad proveer la evidencia experimental correspondiente a las ideas desarrolladas por los primeros investigadores (Robaire y col, 2006). Los estudios publicados luego hasta la década de los sesentas referidos al epidídimo fueron realmente escasos, lo que hizo que Thaddeus Mann en 1964 se refiriera al epidídimo como el “niño abandonado” del sistema reproductivo. Entre mediados y finales de la década de 1960s resurgió el interés sobre el epidídimo a raíz de las demostraciones realizadas por Orgebin-Crist y Bedford, sobre los eventos claves en la maduración espermática. Desde 1980 han surgido un sinnúmero de estudios sobre la presencia, caracterización, inmunolocalización y regulación de un gran número de proteínas específicas del epidídimo y sus ARNs, involucradas en el control de diversas funciones del órgano. Muchos de estos estudios han estado relacionados al manejo de la fertilidad masculina, y al mismo tiempo han contribuido a concluir que este órgano representa un nuevo modelo de estudio celular por segmentos y con regiones específicas de expresión de genes, para la comprensión de fenómenos tales como el envejecimiento y la identificación de procesos que confieran protecciones selectivas frente a ciertas infecciones o enfermedades como el cáncer.

4.2 DESARROLLO DEL EPIDÍDIMO.

El aparato urogenital tiene su origen embriológico en el mesodermo intermedio. El desarrollo prenatal del epidídimo está vinculado con dos estructuras embrionarias específicas, el conducto mesonéfrico o de Wolff y los túbulos mesonéfricos (Fig. 1: Representación esquemática del desarrollo del tracto genital en humanos). El desarrollo epididimario ha sido estudiado en detalle en el ratón y la rata, mientras que la información es mucho más escasa con respecto al desarrollo en rumiantes. Alrededor del día 8 de vida embrionaria en el ratón, el conducto mesonéfrico está constituido por un cordón de células epiteliales que luego experimenta la formación de una luz y rápidamente se extiende a lo largo del embrión siguiendo un sentido cráneo-caudal (Dressler y col, 1990). Paralelamente a su elongación, el conducto mesonéfrico induce al mesénquima adyacente a formar los túbulos mesonéfricos. La presencia del conducto mesonéfrico se considera esencial para la formación de los túbulos mesonéfricos. Aunque en las hembras todos los túbulos mesonéfricos degeneran, en los machos sólo lo hacen los túbulos mesonéfricos más caudales, al tiempo que aquellos túbulos más craneales persisten para derivar en la formación de los conductos eferentes (Sainio y col, 1997). El mecanismo por el cual el conducto mesonéfrico induce la formación de los túbulos mesonéfricos involucra una serie de complejas interacciones entre el mesénquima y las células epiteliales. El hecho es que solamente aquellos túbulos mesonéfricos ubicados cerca de la gónada sobreviven, mientras que aquellos que se ubican en posiciones más alejadas sufren muerte por apoptosis. El desarrollo de los túbulos mesonéfricos está relacionado con el desarrollo de la vesícula renal en los túbulos renales proximales y distales. Es así que tal vez muchos genes de los que regulan este proceso también jueguen un papel importante en la formación de los conductillos eferentes o del segmento inicial del epidídimo.

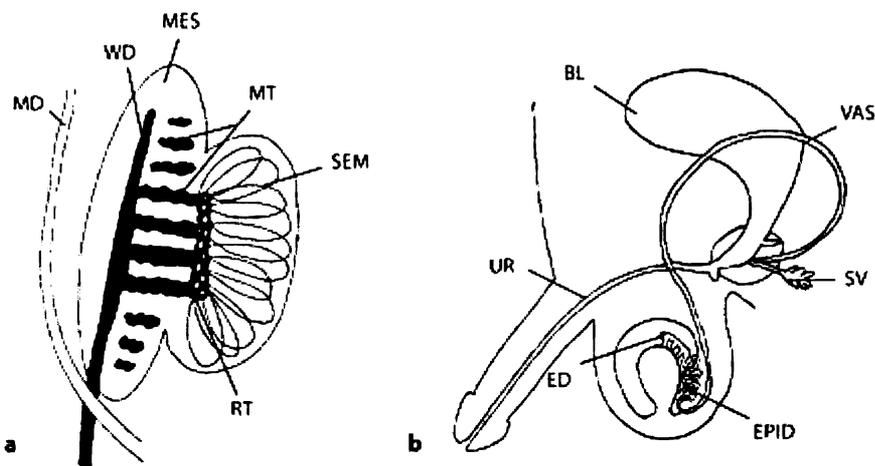


Fig. 1: Representación esquemática del desarrollo del tracto genital en humanos (Hannema y Hughes, 2007).

- a) Estructuras embrionarias vinculadas al desarrollo del aparato urogenital masculino: MD: conducto de Muller; MES: mesonefros; MT: túbulos mesonefricos; RT: rete testis; SEM: cordones seminíferos; WD: conducto mesonefrico.
- b) Esquema del aparato reproductor masculino adulto: ED: conductillos eferentes; EPID: epidídimo; SV: glándula vesicular; UR: uretra; VAS: conducto deferente.

4.2.1 Aspectos genéticos del desarrollo epididimario.

Muchos son los genes involucrados en el desarrollo inicial del conducto mesonefrico y los túbulos mesonefricos. La expresión de estos genes está regulada por factores de regulación transcripcional como el Pax 2, un factor que se expresa en el epitelio del conducto mesonefrico y de los túbulos mesonefricos. En los ratones con deficiencias en este factor transcripcional, se producen fallas en el desarrollo renal y de los túbulos genitales, mientras que las gónadas se desarrollan con normalidad. La porción anterior de los túbulos genitales se degenera poco después de formarse, al tiempo que los túbulos mesonefricos nunca se desarrollan (Torres y col, 1995). El Pax 8 es otro factor de regulación transcripcional que se expresa en conjunto con el Pax 2. Su carencia no resulta en anomalías urogenitales, pero en ratones con deficiencias conjuntas de Pax 2 y de Pax 8, el conducto mesonefrico falla en su desarrollo, y aquellas células que expresan Pax 2 de forma normal, sufren apoptosis. Esto sugiere que las proteínas Pax 2 y Pax 8 son necesarias para el diálogo mesénquima–epitelio, proceso esencial para la formación del conducto mesonefrico y de los túbulos mesonefricos (Bouchard y col, 2002).

4.2.2 Los andrógenos, el receptor de andrógenos (AR), y el desarrollo epididimario.

Una vez formado el conducto mesonéfrico, regresará a no ser que sea activamente estimulado para continuar desarrollándose. Se cree que la testosterona es el factor determinante de la estabilización del conducto mesonéfrico. La testosterona interactúa con su receptor específico, el AR, para generar sus efectos. Los ratones con deficiencias en la expresión de AR padecen agenesia del epidídimo, del conducto deferente y las vesículas seminales (Yeh y col, 2002). Durante el desarrollo del conducto mesonéfrico la expresión del AR está regulada por los andrógenos. En ratas macho normales en etapa fetal, el AR se expresa primero en las células del mesénquima, y luego lo hace en las células epiteliales (Bentvelsen y col, 1995). El hecho de que el AR se exprese primero en el mesénquima y luego en el epitelio sugiere que los andrógenos inicialmente inducen sus efectos sobre el epitelio vía señales transmitidas desde el mesénquima adyacente. Se piensa que la expresión epitelial del AR es inducida por el mesénquima (Cunha y col, 1980) a lo largo del tracto genital y sus glándulas anexas. El AR presumiblemente cumple el rol de regulador de los factores que afectan las interacciones existentes entre el mesénquima y las células epiteliales (Hannema y Hughes, 2007).

4.2.3 Factores de crecimiento y desarrollo epididimario.

Los andrógenos juegan un papel importante en el desarrollo epididimario, pero también se ven involucrados una serie de factores adicionales, tales como factores de crecimiento que pueden ser importantes en el desarrollo de los túbulos mesonéfricos y del segmento inicial del epidídimo. Estudios realizados por Le Barr y col. (1986), demostraron que el desarrollo del segmento inicial epididimario falla en ratones mutantes (XXSxr) a pesar de existir un ambiente androgénico normal. El factor genético Sxr provoca la reversión sexual en ratonas cromosómicamente hembras (XX o XO), generando masculinización a través de la inducción a la formación de testículos productores de andrógenos. Anteriormente se aceptaba que los "pseudomachos" (XXSxr) desarrollaban con total normalidad sus aparatos reproductores, atribuyendo toda la responsabilidad de este desarrollo genital normal a los andrógenos. Sin embargo se ha demostrado varios efectos de esta mutación genética sobre el desarrollo tanto del testículo como del epidídimo (Griffin y Blecher, 1994; Le Barr y Blecher, 1987; Wilkinson y col, 1988). Los niveles de andrógenos testiculares y epididimarios no son diferentes entre ratones genéticamente normales y ratones mutantes (XXSxr), por lo que la carencia de andrógenos no parecería ser la causa de las anomalías epididimarias encontradas en los ratones mutantes (Le Barr y col, 1991).

El factor de crecimiento fibroblástico 2 ha sido postulado como un elemento clave en el desarrollo epididimario. La neutralización de los factores de

crecimiento fibroblásticos (FGF) endógenos usando anticuerpos específicos anti-FGF limita el desarrollo de la cresta gonadal masculina. Este hecho se acompaña de inhibición en el desarrollo del epidídimo, lo que permite afirmar que los FGFs juegan un rol esencial en el desarrollo del aparato reproductor masculino, y específicamente en el desarrollo epididimario (Alaird y col, 1991).

4.2.4 Desarrollo embrionario de las regiones epididimarias.

El origen embriológico de las diferentes regiones epididimarias ha recibido cierto interés; parece que los conductillos eferentes derivan de los túbulos mesonéfricos, mientras que desde la cabeza epididimaria hasta el conducto deferente, todas estas estructuras derivarían del conducto mesonéfrico. Por su parte, el origen del segmento inicial, característico de muchos roedores, todavía no es claro. Las células que componen este segmento inicial son diferentes a las de los conductillos eferentes, así como también son diferentes a las células que componen las regiones más distales del epidídimo, pero su función (reabsorción de agua) es similar a la que ejercen las células que revisten los conductillos eferentes, por lo que se cree posible que el origen del segmento inicial del epidídimo esté dado por los túbulos mesonéfricos (Robaire y col, 2006).

4.2.5 Desarrollo epididimario postnatal.

El desarrollo postnatal del epidídimo puede dividirse en 3 etapas: el período indiferenciado, el período de diferenciación y el período de expansión.

4.2.5.1 El período indiferenciado.

El proceso de enrollamiento que sufre el conducto epididimario no ocurre simultáneamente en todas sus regiones. En el ratón, al nacimiento el conducto ya ha experimentado un considerable enrollamiento en las regiones proximales (segmento inicial y cuerpo), mientras que en la cola el proceso de enrollamiento del conducto todavía no ha concluido. En los primeros días de vida, aparecen tabiques individuales que delimitan al conducto epididimario en segmentos. En ese momento el epitelio que reviste el conducto se halla indiferenciado y contiene células columnares conteniendo numerosas figuras mitóticas.

En el transcurso del desarrollo postnatal del epidídimo de la rata se produce un aumento progresivo de la densidad epitelial. Desde el día 15 en adelante, el volumen que ocupa el epitelio epididimario aumenta alcanzando valores definitivos al día 45 en el segmento inicial, 60 en la cabeza, y 90 tanto en el cuerpo como en la cola. Paralelamente, el volumen relativo que ocupan los tejidos intersticiales decrece (Jiang y col, 1994).

4.2.5.2 El período de diferenciación.

Durante el período de diferenciación las células epiteliales indiferenciadas se diferencian a los tipos celulares clásicos descritos en el epidídimo adulto. Las células epiteliales que revisten el conducto epididimario se mantienen indiferenciadas hasta aproximadamente los 20 días de vida en la rata; a partir de ese momento comienzan a observarse por primera vez células estrechas y columnares. Aproximadamente al día 28 las células columnares se diferencian en células basales y principales. Las células estrechas se ven exclusivamente en el segmento inicial, en tanto que las células claras se observan a lo largo de todo el conducto desde el día 36 en adelante. Al día 49 todas las células epiteliales del conducto epididimario se encuentran completamente diferenciadas (Robaire y col, 2006).

4.2.5.3 El período de expansión.

El periodo de expansión describe el crecimiento continuo del epidídimo y la aparición de espermatozoides en la luz del órgano.

Los mecanismos que regulan el crecimiento y la diferenciación celular en el epidídimo son inciertos. Además de la acción clave de los andrógenos, es probable que sea importante el papel desempeñado por ciertos factores presentes en el fluido luminal provenientes del testículo o de los segmentos más proximales del epidídimo. Sumado a esto, se prevén complejas interacciones célula a célula, en las cuales múltiples factores luminales serían secretados en las regiones más proximales del conducto, y del testículo, las cuales provocarían que las células ubicadas más distalmente secretaran factores que a su vez regularían la función de aquellas células ubicadas en las regiones más distales del epidídimo (cola). Múltiples reacciones de tipo cascada podrían estar involucradas en el desarrollo y la diferenciación del conducto epididimario (Robaire y col, 2006).

4.3 ASPECTOS GENERALES DE LA FISIOLÓGÍA EPIDIDIMARIA.

4.3.1 Funciones epididimarias.

El epidídimo es un órgano esencial para la actividad reproductiva de los vertebrados que practican la fertilización interna (elasmobranchios, reptiles, aves y mamíferos) (revisión: Cooper, 1999). Sus principales funciones son el transporte, la maduración y el almacenamiento de los espermatozoides (Jones, 1999).

4.3.1.1 El transporte de los espermatozoides.

Cuando se sigue el avance de un espermatozoide marcado a través de las diferentes regiones epididimarias, el tiempo de tránsito por las regiones de la cabeza y el cuerpo resulta similar en todas las especies estudiadas hasta el momento. El tiempo empleado en el transporte de espermatozoides a través de la región de la cabeza epididimaria es de aproximadamente 1 día, tanto en el hombre, como en el mono y en el caballo. Sin embargo estas tres especies muestran importantes diferencias en la duración total del transporte

epididimario de los espermatozoides (Amann y Howards, 1980; Amann y col, 1982; Gebauer y col, 1974). Las diferencias halladas al respecto radican en los tiempos de tránsito por la cola del epidídimo (Robaire y col, 2006).

El transporte de los espermatozoides a través del conducto epididimario debe realizarse en contra de un gradiente de presión. La presión hidrostática intraluminal de los testículos es significativamente más baja que la presión hidrostática intraluminal de todas las regiones epididimarias. Además existe un gradiente de aumento de dicha presión en el epidídimo, desde la cabeza hacia la cola (Pholpramool y col, 1984). El transporte de los espermatozoides a través del conducto epididimario está vinculado a las contracciones rítmicas del músculo liso que rodea el conducto. Dicha actividad contráctil está influida por diversos factores hormonales y neurológicos. Tanto la oxitocina como la vasopresina producen un aumento en la frecuencia de las contracciones epididimarias, acompañado de una reducción proporcional durante cada contracción, en el diámetro del conducto epididimario (Studdard y col, 2002). Se ha descrito la presencia y distribución del receptor específico para la oxitocina en el epidídimo de diversas especies. El receptor de oxitocina se ha encontrado no sólo en el músculo liso epididimario, sino también en las células epiteliales del epidídimo del carnero (Whittington y col, 2001). Dado que la oxitocina induce a la liberación de otro potente factor estimulador de la contractilidad epididimaria, la endotelina 1, y que al bloquear los receptores para la endotelina 1, el efecto de la oxitocina sobre la contractibilidad epididimaria se reduce, se piensa que existan ciertas interacciones entre estos dos factores (Filippi y col, 2002).

Los andrógenos también regulan la contractilidad del conducto epididimario, y su presencia es fundamental para asegurar un transporte óptimo de los espermatozoides (Meistrich y col, 1975). La actividad contráctil del epidídimo también está regulada por las prostaglandinas. En el bovino la contractilidad del músculo liso epididimario depende de la liberación epitelial de prostaglandinas excitatorias (Mewe y col, 2006).

Además de los factores de tipo hormonal, la actividad motriz del epidídimo está regulada por el sistema nervioso (Simeone, 1933; Zankl y col, 1969). Tanto el conducto deferente como la cola epididimaria están dotados de un importante nivel de inervación. Además de un alto nivel de inervación simpática, el epidídimo también cuenta con cierto grado de inervación parasimpática (Baumgarten y col, 1971). En la rata, la contractibilidad del músculo liso en la cola epididimaria fue afectada tanto por drogas adrenérgicas como colinérgicas (Laitinen y Talo, 1981). Sin embargo, parece ser que las influencias parasimpáticas sobre la contractibilidad del músculo liso epididimario son menos importantes que las simpáticas. De hecho, el uso de atropina en carneros generó solo efectos leves sobre la emisión de espermatozoides (Dziuk y Mann, 1963).

4.3.1.2 La maduración espermática.

En los vertebrados inferiores (peces y anfibios) los espermatozoides que son liberados desde los testículos son totalmente móviles y dotados de completa habilidad fecundante. Sin embargo en los vertebrados más desarrollados, los

espermatozoides se vuelven funcionalmente maduros a medida que circulan por el epidídimo (Robaire y col, 2006).

La maduración de los espermatozoides, con la adquisición de motilidad y habilidad fecundante, es esencial para que ocurra la fertilización en el tracto genital femenino. La maduración espermática no ocurre en función del transcurso del tiempo sino como consecuencia de la exposición paulatina de los espermatozoides al medio luminal epididimario (Orgebin-Crist, 1967). Este es un medio muy complejo, altamente especializado y que cambia progresivamente a lo largo del conducto epididimario (Turner, 1991; Hinton & Palladino, 1995).

La motilidad espermática en el epidídimo ha sido confirmada en muchas especies tales como el ratón (Soler y col, 1994), el hámster (Yeung y col, 1994), y el carnero (Amann y col, 1982). La adquisición de motilidad involucra un incremento cuantitativo en el porcentaje de espermatozoides que se mueven, y un incremento cualitativo en el patrón de la motilidad (Robaire y col, 2006).

Otros cambios de mayor importancia que ocurren durante la maduración espermática son aquellos asociados a la capacidad de los espermatozoides para inducir la reacción acrosómica y unirse a la zona pelúcida. En el ratón, los espermatozoides adquieren la capacidad de unirse a la zona pelúcida durante su transcurso por el epidídimo (Sailing, 1982).

Concomitantemente con los cambios ocurridos en la fisiología de los espermatozoides durante el avance a través del conducto epididimario, se generan una serie de cambios morfológicos tales como la migración de la gota citoplasmática a lo largo del flagelo, cambios en la cromatina nuclear y algunos cambios asociados a la membrana plasmática del espermatozoide (Bedford, 2004).

4.3.1.3 Almacenamiento y protección de los espermatozoides.

El almacenamiento de los espermatozoides luego de su maduración constituye un elemento de gran relevancia para la fisiología reproductiva masculina de los mamíferos. Dicho almacenamiento tiene lugar en la cola epididimaria. En la rata, los espermatozoides son almacenados y mantenidos en la cola epididimaria en estado inmóvil por medio de una glicoproteína de alto peso molecular llamada inobilina, la cual ha sido efectivamente aislada de los fluidos más caudales del epidídimo (Usselman y Cone, 1983). En el bovino no parecen ser importantes los factores inhibitorios de la motilidad tales como la inobilina, sino que la quiescencia de los espermatozoides producida por los fluidos de la cola del epidídimo bovino, estaría fuertemente relacionada al pH extracelular, de forma tal que la iniciación de la motilidad espermática coincide con la elevación del pH a nivel de la cola epididimaria (Acott y Carr, 1984).

Los espermatozoides son altamente sensibles al daño oxidativo. Entre otros factores, la presencia de la enzima superóxido dismutasa en el epidídimo contribuye a la protección de los espermatozoides frente a estos riesgos, al menos en el conejo (Alvarez y Storey, 1983).

4.3.2 La barrera hemato-epididimaria.

Dada la presencia en los espermatozoides de ciertas proteínas que son reconocidas por el sistema inmunitario como antígenos, se hace necesaria la continuación más allá del testículo de una barrera funcional, la barrera hemato-epididimaria. La formación de una zona continua de uniones estrechas apicales entre las células epiteliales adyacentes del epidídimo, y la creación de la barrera hemato-epididimaria, representan un elemento clave en la fisiología del epidídimo. La estructura de la barrera hemato-epididimaria está dada por la presencia de uniones complejas entre las células principales del epitelio epididimario. Estas incluyen uniones adherentes, uniones ocluyentes y uniones gap, que serían las responsables de la intercomunicación entre las células principales adyacentes. La zonula occludens del epidídimo es una de las uniones estrechas más desarrolladas en los tejidos de mamíferos (Friend y Gilula, 1972). En el epidídimo, las zonulae occludentes adyacentes a la superficie luminal del epitelio epididimario son las responsables exclusivas del mantenimiento de la barrera hemato-epididimaria, ya que ni los endotelios capilares ni las células musculares lisas son capaces de impedir el pasaje de marcadores a través del lumen epididimario (Hoffer y Hinton, 1984). En ratas, el desarrollo de la barrera hemato-epididimaria estaría completo para el final de la tercera semana de vida postnatal, aproximadamente al mismo tiempo en que se establece la barrera hemato-testicular (Agarwal y Hoffer, 1989). Todos los nexos establecidos entre las células del epitelio epididimario involucran complejas interacciones entre una gran familia de proteínas, las cuales están altamente influidas por factores testiculares que regulan la expresión de los diferentes genes en las células epiteliales del epidídimo. Las uniones adherentes constituyen un cinturón continuo y mantienen juntas a las células vecinas, a través de una familia de moléculas de adhesión celular calcio dependientes conocidas como cadherinas. Estas forman un complejo con varias proteínas, tales como cateninas, actina, vinculina y zonula occludens-1, las cuales unen las cadherinas al citoesqueleto celular. Tres tipos de cateninas están presentes en el epidídimo (alfa, beta y p120). Todas estas proteínas se ubican a lo largo de la membrana plasmática lateral de las células epiteliales adyacentes. Sin embargo, existen diferencias específicas regionales en la distribución de estas proteínas. Las cateninas alfa y beta son más abundantes en las regiones del cuerpo epididimario, en tanto que la proteína p120 es igualmente abundante en todas las regiones del epidídimo, lo que sugiere que los diferentes tipos de cateninas se distribuyen siguiendo patrones de especificidad regional a lo largo del epidídimo (DeBellefeuille y col, 2003). La existencia de la barrera hemato-epididimaria no sólo se justifica por razones de protección contra posibles reacciones inmunitarias, sino que además contribuye con la regulación de la composición del ambiente luminal en el conducto epididimario, colaborando con las funciones de secreción y endocitosis de las células epiteliales, y así como con el fenómeno de la maduración espermática. La barrera hemato-epididimaria mantiene un micro ambiente luminal especializado para el mantenimiento de los espermatozoides mediante la restricción en el pasaje de iones, solutos y macromoléculas a través del epitelio epididimario (Hinton y Palladino, 1995).

4.4 ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL EPIDÍDIMO.

El epidídimo puede subdividirse macroscópicamente en tres regiones anatómicas: cabeza, cuerpo y cola. A su vez, cada una de estas regiones anatómicas se encuentra organizada en una serie de lóbulos separados entre sí por tabiques de tejido conjuntivo, los cuales además de prestar funciones de sostén podrían ser responsables de una separación funcional entre dichos lóbulos. Por otra parte, del punto de vista histológico y funcional es posible subdividir al epidídimo en más regiones. En el caso del carnero 7 son las regiones histológicas identificadas. Estas corresponden a una primera región que contiene la porción epididimaria de los conductillos eferentes (región E) y seis regiones más, cuyos nombres corresponden a los números arábigos del 1 al 6, que contienen distintas porciones del conducto epididimario (ver Fig. II: Regiones histológicas del epidídimo del carnero adulto).

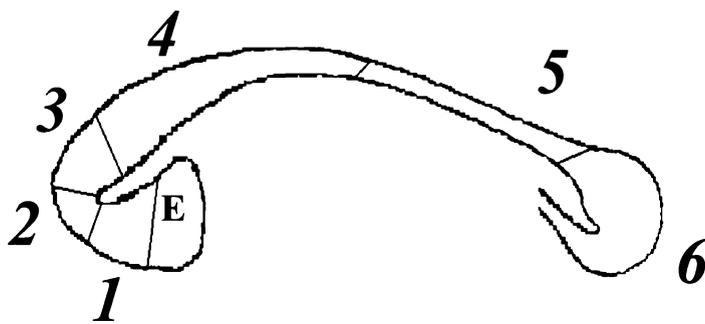


Fig. II: Regiones histológicas del epidídimo del carnero adulto (Nicander, 1958).

Las distintas regiones histológicas epididimarias cumplen funciones diferentes pero complementarias. De hecho, una misma función puede ser cumplida por más de una región y eso explica por qué la maduración de los espermatozoides en el epidídimo es un proceso paulatino que se completa a distintas alturas del conducto epididimario para distintos espermatozoides.

La composición del fluido luminal depende del epitelio que reviste la pared del conducto epididimario. Este epitelio segrega a la luz del conducto tanto sustancias sintetizadas por el mismo como otras tomadas del torrente sanguíneo. Asimismo, tiene gran capacidad de absorción de distintas sustancias que se encuentran en el fluido luminal. Los grandes cambios asociados con la maduración espermática ocurren mientras el espermatozoide atraviesa la cabeza y el cuerpo epididimarios, mientras que el almacenamiento ocurre en la cola epididimaria (Jones, 1998). La segmentación funcional se

manifiesta a nivel morfológico por distintos diámetros del conducto epididimario y de su luz y por cambios en la altura y las proporciones entre distintos tipos celulares.

El conducto epididimario está rodeado por una capa de músculo liso, que es progresivamente más ancha a medida que se avanza hacia la cola del epidídimo. Esta capa muscular es esencial para que ocurra el transporte de los espermatozoides a lo largo del conducto epididimario y a nivel de la cola epididimaria, para la eyaculación.

El tejido intersticial del epidídimo es un tejido conjuntivo relativamente celular. Se ha demostrado recientemente que la influencia de gran número de hormonas - y en particular de las hormonas esteroideas sexuales - sobre la diferenciación y el desarrollo de los epitelios está mediada en buena medida por los tejidos conjuntivos acompañantes. Esto ha sido demostrado tanto en órganos reproductores femeninos: glándula mamaria y útero, como masculinos: próstata (Cunha, 1994) utilizando, entre otras metodologías, la inmunohistoquímica al AR.

4.5 LOS ANDRÓGENOS Y OTROS FACTORES VINCULADOS A LAS FUNCIONES EPIDIDIMARIAS.

En el año 1926 Benoit demostró la dependencia del epidídimo de una sustancia testicular no identificada para el mantenimiento de su estructura y sus funciones. Esta sustancia fue identificada cinco años más tarde como testosterona por Butenandt (Butenandt, 1931). Desde ese entonces han sido muchos los estudios publicados a cerca de la influencia ejercida por los andrógenos sobre diferentes aspectos morfológicos, bioquímicos y moleculares del epidídimo. Se sabe que en regímenes de privación de andrógenos los espermatozoides ven alterada su motilidad, pierden capacidad fecundante e incluso mueren. La carencia de andrógenos produce alteraciones morfológicas en el epidídimo, tales como la reducción del diámetro del conducto y de la altura del epitelio, mientras que el estroma intertubular aumenta. Interesantemente, todos estos cambios recuerdan la etapa anterior a la pubertad. En la rata, la orquiectomía produce una reducción en la altura de las células principales epididimarias con disminución de los organelos citoplasmáticos implicados en la secreción (Delongas y Col, 1987). Algunos cambios morfológicos observados en las células principales sugieren una particular sensibilidad de este tipo celular a la carencia de andrógenos, con respecto a otras células epiteliales epididimarias, las cuales parecen ser menos afectadas por la orquiectomía (Moore y Bedford, 1979). La carencia de estimulación androgénica provocada con la orquiectomía induce una oleada de muertes celulares por apoptosis en el epidídimo, que se inician en el segmento inicial y progresan hacia la cola (Fan y Robaire, 1998). Además de los andrógenos, muchos otros factores tanto hormonales como no hormonales se han postulado como importantes actores en la regulación de las funciones epididimarias. Entre ellos el estradiol, el cual probablemente actúe como regulador específico de ciertas funciones en el epidídimo (Hess, 2003).

En lo que respecta a los factores no hormonales involucrados en la regulación de las funciones epididimarias, es bien reconocida la dependencia del epidídimo de la presencia de factores luminales provenientes del testículo o incluso del mismo epidídimo. En ausencia de estos factores muchas células epiteliales epididimarias sufren muerte por apoptosis. El tipo de secreción paracrina existente en el caso de las células epiteliales epididimarias se ha denominado secreción luminacrina, dado que el modo de regulación ocurre en un sistema de conductos y túbulos. Estudios realizados por Abe y col. en 1984, demostraron que la ligadura del cuerpo epididimario en el ratón resulta en la diferenciación anormal de las células principales ubicadas por debajo de la ligadura.

El primer factor no esteroideo propuesto como probable regulador de las funciones epididimarias fue la proteína ligadora de andrógenos (ABP). Se trata de una glicoproteína secretada a nivel de los compartimentos basal y adluminal de los túbulos seminíferos testiculares. En la rata es producida por las células de Sertoli y transportada al epidídimo vía rete testis (Bardin y col, 1981). Un 80% de la ABP es secretada a la luz de los túbulos seminíferos, alcanza el epidídimo y es metabolizada por las células epididimarias u otras células epiteliales del tracto genital masculino. El restante 20% se secreta directamente al torrente sanguíneo (Bardin y col, 1988). La ABP fue postulada como factor luminal regulador de la función de las células principales del epitelio epididimario (Brown y Col, 1983). Además de esta proteína, se ha propuesto a los factores de crecimiento fibroblásticos 2, 4 y 8 y a los propios espermatozoides como posibles elementos reguladores de la función epididimaria. Los factores de crecimiento testiculares alcanzan el epidídimo vía rete testis para ejercer sus influencias sobre receptores específicos en las células epiteliales epididimarias. Las primeras evidencias a cerca de que los factores de crecimiento fibroblásticos actúan como reguladores de las funciones del segmento inicial epididimario, derivaron de estudios que demostraban que luego de la ligadura de los conductillos eferentes, la actividad de la enzima gamma glutamil transpeptidasa (enzima vinculada a la protección celular contra el daño oxidativo) decrecía en el segmento inicial del epidídimo de ratas. Sin embargo, si el tejido era tratado con factor de crecimiento fibroblástico 2 (factor de crecimiento de origen conjuntivo), la actividad de dicha enzima regresaba a niveles normales. El tratamiento de este tejido con factores epidermales de crecimiento no surtía efecto alguno (Lan y col, 1998). La presencia de los factores de crecimiento fibroblásticos 2, 4 y 8 ha sido confirmada en el fluido de la rete testis ingresando al segmento inicial epididimario. El factor de crecimiento fibroblástico 1 IIIc fue identificado en las células principales del epitelio epididimario, las cuales son responsables de la expresión del ARNm para la enzima gamma glutation transpeptidasa (Kirby y col, 2003). Las restantes variedades de factores de crecimiento fibroblásticos se expresarían en las células endoteliales e intersticiales del epidídimo (Robaire y col, 2006).

Las interacciones entre los factores de crecimiento fibroblásticos y sus receptores, así como las de los andrógenos con su receptor específico, son esenciales para el funcionamiento normal del epidídimo y el desarrollo de la próstata. La cascada de señales desencadenada por estos factores en el

epidídimo, es fundamental para el desarrollo y la maduración espermática (Cotton y col, 2008).

4.6 EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN EL EPIDÍDIMO.

La actividad del AR en el epidídimo está vinculada a mantener la citoarquitectura epitelial normal de los conductillos eferentes y del conducto epididimario y a las actividades de reabsorción y secreción epididimarias. Para que se haga efectiva la acción de la testosterona sobre las células epididimarias, es necesaria la presencia del AR y también de la ABP. La testosterona es transportada desde su lugar de síntesis hacia zonas más alejadas por medio de la ABP. En algunos tejidos ocurre que la testosterona actúa directamente sobre el AR, como sucede en el caso del tejido muscular. En otras ocasiones como ocurre en el tejido nervioso, la testosterona es previamente aromatizada a estradiol para accionar sobre el AR. Por el contrario, en ciertos tejidos andrógeno dependientes como la próstata y las glándulas vesiculares, la testosterona es convertida por la enzima 5 α reductasa en 5 α dihidrotestosterona (5 α DHT), un metabolito que se liga al AR con mayor grado de afinidad que la propia testosterona. El primer reporte informando que la testosterona es convertida en 5 α DHT y ligada a una proteína (AR) en el epidídimo, fue casi coincidente con el descubrimiento de otro componente vinculado a los andrógenos, la ABP, identificada en los testículos y el epidídimo. El AR se ha encontrado en el epidídimo de todas las especies examinadas hasta la fecha. Está presente en todo el órgano, y su abundancia y distribución ha sido descrita para varias especies (rata, primates), tanto en adultos (Pelletier, 2000) como durante el desarrollo epididimario. La abundancia y distribución del AR también ha sido descrita en el carnero (Tekpetey y Amann, 1988; Tekpetey y col, 1989).

Existen relativamente pocas variaciones en las concentraciones de este receptor a lo largo del conducto epididimario, las cuales normalmente se corresponden con un patrón de distribución caracterizado por un descenso progresivo de la concentración de AR a medida que se avanza hacia las regiones más caudales del epidídimo. En el ser humano el AR se distribuye a lo largo de todo el epidídimo, expresando mayores concentraciones en la porción distal de la cabeza y porción proximal del cuerpo, decreciendo hacia la cola y el conducto deferente. Los conductillos eferentes no muestran positividad, al tiempo que el nivel de positividad en los conductos deferentes es pobre (Ungefroren y col, 1997). En el carnero post puberal, las concentraciones de AR son similares tanto en la cabeza como en la cola del epidídimo, mientras que en el cuerpo la presencia del AR es sensiblemente menor (Carreau y col, 1984). En el ratón adulto, la presencia de los receptores de andrógenos y estrógenos es igualmente intensa en todas las células epiteliales del segmento inicial epididimario, en tanto que las células intersticiales muestran escasa positividad para el AR. En la cabeza y el cuerpo, todas las células epiteliales, y algunas células peritubulares son positivas para el AR (Zhou y col, 2002). Tanto en la rata como en la cabra, las células epiteliales epididimarias expresan una positividad uniforme a lo largo de todo el conducto (Cooke y col, 1991; Goyal y col, 1997). La presencia del AR se ha identificado en las células

principales de la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo del caballo, sin evidencias de que existan diferencias en la expresión de dicho receptor entre grupos de diferentes edades. Esto sugiere que la presencia de los andrógenos es fundamental tanto para el desarrollo como para el mantenimiento de las funciones del epidídimo (Parleviet y col, 2006). También se ha estudiado la distribución de los receptores de estrógenos en la misma especie. El estradiol y sus receptores (ER α y β) también poseen un papel clave estimulando la maduración del epidídimo equino (Parleviet y col, 2006).

Se ha descrito la presencia de AR y ER en las células principales y basales del epitelio epididimario en la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo del verraco (Pearl y col, 2007). El epidídimo del verraco es dependiente tanto de los andrógenos como de los estrógenos. Dado que las concentraciones de testosterona y estradiol no se modifican demasiado a lo largo del epidídimo, las variaciones regionales en la regulación ejercida por las hormonas esteroideas en el epidídimo del verraco, parecen estar debidas a diferencias en la expresión de los receptores hormonales específicos (Pearl y col, 2007).

La distribución del AR también ha sido descrita en el testículo y el epidídimo de aves. En el testículo de gallos y patos, el AR se halla restringido a las células de Sertoli, las células de Leydig y algunas células mioepiteliales. A nivel del epidídimo, el AR se expresa a lo largo de todo el epitelio, aunque con algunas diferencias en la intensidad de su expresión según regiones. Las células principales son las que muestran mayor positividad para el AR en los epidídimos de gallos y patos. El tejido conjuntivo en los patos fue menos positivo para la expresión del AR que en los gallos (Dornas y col, 2008).

Utilizando tratamientos con agonistas de la GnRH en cerdos, se ha demostrado que las células estromales del epidídimo son más sensibles que las células epiteliales a la regulación ejercida por los andrógenos sobre la expresión del AR (Kopera y col, 2009).

4.7 TIPOS CELULARES EPITELIALES EPIDIDIMARIOS Y FUNCION EPIDIDIMARIA.

Existen varios tipos de células epiteliales en el epidídimo dentro de las cuales algunas se distribuyen por todo el conducto, mientras que otras sólo se localizan en determinadas regiones específicas. Se ha publicado varias investigaciones referidas a los tipos celulares y la histología del epidídimo. En general, los tipos celulares se muestran de forma similar en todos los mamíferos, incluyendo a los seres humanos. Las células aparecen en regiones dadas, comparten características morfológicas y funcionales, y muestran patrones similares de expresión de algunas proteínas secretoras.

Una representación esquemática de los diferentes tipos celulares epiteliales del conducto epididimario se presenta en la figura III.

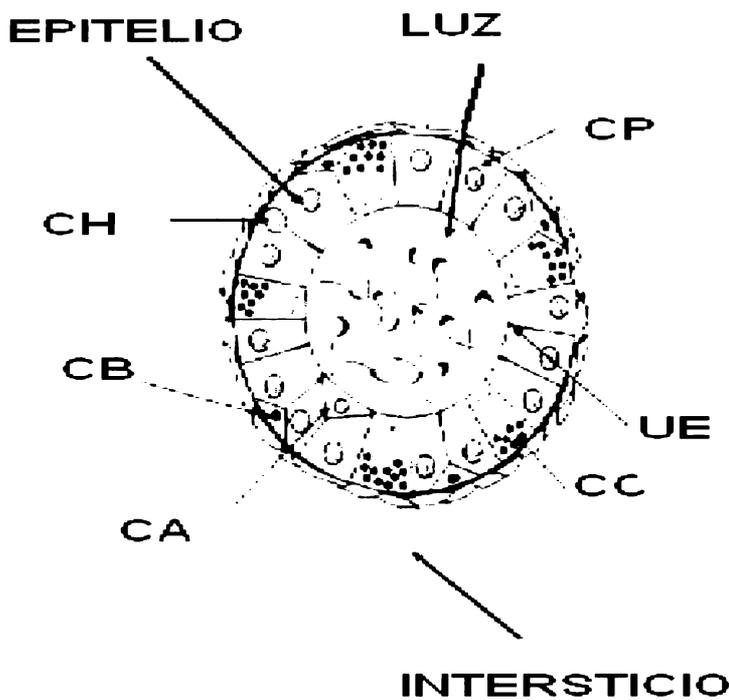


Fig. III: Representación esquemática de los tipos celulares presentes en el epitelio epididimario: CP (célula principal); CC (célula clara); CB (célula basal); CH (célula en halo); CA (célula apical); UE (unión estrecha). (Adaptado de Robaire y col, 2006).

Las células principales son las más importantes del epidídimo de los mamíferos y aparecen a lo largo de todo el conducto epididimario, aunque muestran algunas diferencias estructurales en cada región. Se caracterizan por poseer una maquinaria secretora y endocítica altamente desarrollada. Dependiendo de la porción del conducto epididimario que se considere, las células principales constituyen entre el 65 y el 80% del total de las células epiteliales epididimarias. Las diferencias que presentan las células principales según su ubicación en las distintas regiones epididimarias, se ven reflejadas en el aspecto y la organización de su aparato secretorio y endocítico. Las células principales sintetizan un enorme número de proteínas de las cuales algunas son retenidas en la célula y otras son activamente secretadas al compartimiento luminal. También juegan un papel activo en la endocitosis de proteínas provenientes del compartimiento luminal. El principal efector de las funciones epididimarias es la célula principal del epitelio epididimario, que intercambia proteínas con la membrana plasmática del espermatozoide y regula la composición y el pH del líquido epididimario (revisión: Jones, 1999).

Las células apicales se encuentran principalmente en el epitelio del segmento inicial y de la zona intermedia. Poseen un núcleo con forma esférica ubicado

hacia el sector apical de la célula, y no contactan con la membrana basal. Difieren claramente de sus células vecinas (estrechas y principales) en cuanto a su patrón de expresión de proteínas, sin embargo sus funciones específicas son poco conocidas. La identificación de ciertas enzimas como la catepsina D y la beta hexosaminidasa A, tanto en las células apicales como en las estrechas, sugiere que estos tipos celulares estarían involucrados en la degradación de ciertas proteínas a través de sus lisosomas. Por otra parte la presencia de la enzima glutatión S transferasa involucra a estas células en la protección de los espermatozoides frente a posibles cambios ambientales (Adamali y Hermo, 1996).

Las células estrechas son más delgadas que las células principales y envían una fina prolongación de citoplasma para alcanzar la membrana basal. Estas células se caracterizan por la presencia de numerosas vesículas apicales involucradas en procesos de endocitosis y de secreción de hidrogeniones al lumen. Tanto las células estrechas como las células claras están involucradas en la acidificación del medio luminal epididimario, una actividad considerada esencial para la maduración, transporte y almacenamiento de los espermatozoides en el epidídimo (Herme y col, 2000). La presencia de células estrechas se ha descrito en el segmento inicial y zona intermedia del epidídimo del ratón y la rata adulta (Adamali y Herme, 1996). Células similares se han identificado en las mismas regiones en otras especies incluidos los bovinos (Goyal, 1985) y los seres humanos (Palacios y col, 1991).

Las células claras son células grandes con función de endocitosis activa, presentes en la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo de varias especies. Se caracterizan por contener numerosas vesículas apicales, endosomas, lisosomas y una porción basal donde se ubica el núcleo, sumado a un número variable de gotitas lipídicas. Luego de inyectar marcadores en la luz de la cola del epidídimo, las vesículas apicales, endosomas y lisosomas de las células claras, aparecen marcados. Esto pone en evidencia el rol endocítico de estas células. Dicha actividad endocítica es marcadamente más intensa en las células claras que en las células principales. Las células claras normalmente recogen las gotas citoplasmáticas liberadas por los espermatozoides en su trayecto por el epidídimo (Herme y col, 1988). Además de las funciones anteriormente citadas, las células claras se encuentran involucradas en la acidificación del medio luminal epididimario. Aunque las células principales contribuyen con la acidificación luminal mediante la reabsorción de bicarbonato en las regiones más proximales del epidídimo, las células estrechas y las células claras juegan un rol fundamental en este proceso mediante la secreción de protones a la luz del conducto. Las células claras expresan altísimos niveles de ATPasas de hidrogeniones (V-ATPasa) en su membrana apical, y son las mayores responsables de la secreción de protones a la luz del conducto epididimario (Da Silva y col, 2007).

Las células basales tienen forma redondeada y se adhieren a la lámina basal, sin acceso directo al lumen, pero emitiendo prolongaciones que a veces se extienden hasta la luz del conducto. Sus características morfológicas están asociadas en parte al volumen y la presión ejercida en el epitelio del conducto por los fluidos luminales y los espermatozoides provenientes del testículo. El

número de células basales se reduce cuando los espermatozoides se ausentan de la luz epididimaria como consecuencia de la castración (Seiler y col, 2000). Durante el desarrollo postnatal en la rata, las células basales pasan de ser células abovedadas a tener una forma más aplanada, a medida que los espermatozoides y los fluidos testiculares arriban al cuerpo y la cola epididimaria (Herms y col, 1994). Las células basales ejercen funciones de endocitosis y de secreción. De la misma forma que ocurre en otras células típicamente secretoras, las células basales del epitelio epididimario muestran acumulaciones de gránulos secretores y material de secreción, cercanas al complejo de Golgi. El destino de estas secreciones podría ser regular la función de las células principales, o bien estar destinadas a ser volcadas a la sangre para cumplir funciones todavía desconocidas. También se ha propuesto que las células basales podrían desempeñar un rol inmunitario debido a su habilidad para expresar antígenos de macrófagos. Una función clave de las células basales consiste en la regulación que ejercen estas sobre la actividad de las células principales del epitelio epididimario. A través de la formación local de prostaglandinas, las células basales regulan el transporte de agua y electrolitos que realizan las células principales. Esta regulación involucra a dos proteínas que se expresan exclusivamente en las células basales (Leung y col, 2004).

Las células en halo son pequeñas células con un estrecho borde de claro citoplasma que están presentes a lo largo del epitelio epididimario. Usualmente se ubican en la base del epitelio y contienen un número variable de gránulos densos. Las células en halo fueron descritas como linfocitos o monocitos, aunque su naturaleza exacta ha sido controversial desde su primera descripción realizada por Reid y Cleland en 1957. Actualmente se sabe que tienen un origen inmunitario, y que su número se ve incrementado paralelamente con el envejecimiento. La población de células epididimarias que son identificadas como células en halo incluye monocitos, linfocitos T helpers y linfocitos T citotóxicos. En el epitelio epididimario de ratas jóvenes, el número de células que fijan anticuerpos anti monocitos, anti macrófagos fijos, anti linfocitos T helpers (CD4+) y anti linfocitos T citotóxicos (CD8+), es equivalente al número de células en halo, lo que sugiere que estas células son bajo condiciones normales, las principales células inmunitarias del epidídimo (Serre y Robaire, 1999).

4.8 ONTOGENIA DE LAS REGIONES HISTOLÓGICAS EPIDIDIMARIAS.

A pesar de la importancia del epidídimo para la reproducción, se conoce muy poco sobre su desarrollo postnatal. Se sabe que las regiones histológicas no se desarrollan por igual: en la rata, la cabeza se desarrolla antes que la cola (Jiang y col., 1994). Sin embargo, en el carnero se ha informado que el desarrollo ocurre de cola a cabeza (Nilnophakoon, 1978). Recientemente (Bielli y col, 2007) se ha visto en nuestro laboratorio que la distribución de las regiones histológicas epididimarias varía a lo largo del desarrollo en corderos peripuberales (3-6 meses de edad), con aumento en el número de regiones a medida que aumenta el peso epididimario, con regiones histológicas transitorias (que aparecen al alcanzar el epidídimo cierto peso, y desaparecen

posteriormente), desplazamiento de regiones histológicas y desarrollo general de cabeza a cola. Además, se ha descrito la distribución de las regiones epididimarias en el cordero neonato sin encontrar influencias de la nutrición fetal sobre esta distribución en regiones (Genovese y col., 2006).

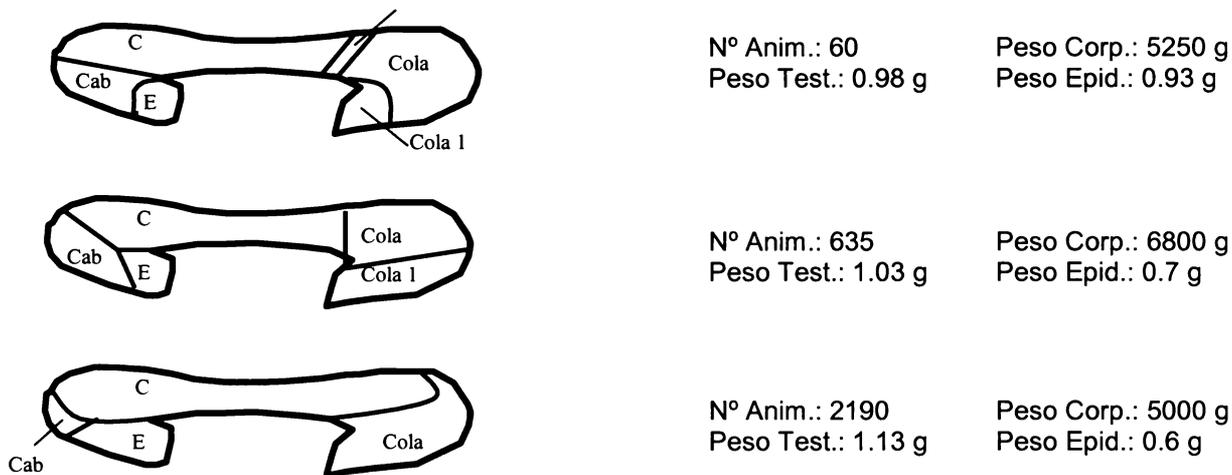


Fig. IV: Distribución de regiones histológicas en el epidídimo de corderos neonatos seleccionados de una majada más grande. Se reconoce 4 regiones histológicas constantes en todos los animales (E: región de los conductos eferentes; Cab: región histológica de la cabeza; C: región histológica del cuerpo; Cola: región histológica de la cola). Se identifica también 2 regiones inconstantes, que aparecen en los epidídimos más pesados (C1: región intermedia entre el cuerpo y la cola; Cola1: región intermedia entre la cola y el conducto deferente).

Esencialmente, en el cordero neonato existen 4 regiones histológicas constantes y bien definidas y otras dos regiones histológicas más pequeñas, que son identificables en algunos individuos cuyos epidídimos son algo más pesados (ver Fig. IV: Distribución de regiones histológicas en el epidídimo de corderos neonatos seleccionados de una majada más grande).

Parece ser que a medida que el cordero se acerca a la pubertad, aumenta el número de regiones histológicas en su epidídimo ya que se ha descrito mayor número de regiones en corderos prepuberales (Bielli y col, 2007).

4.9 LA INMUNOHISTOQUÍMICA DEL AR COMO ENCARRE ADECUADO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD EPIDIDIMARIA Y LA INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN.

El epidídimo es un órgano andrógeno-dependiente por excelencia. La expresión del AR epididimario es intensa y dicha expresión es diferencial en distintos segmentos epididimarios. La distribución del AR está descrita en el carnero adulto para las distintas regiones histológicas (Tekpetey y Amman, 1988) y existe una descripción general de lo que ocurre con la distribución del receptor de andrógeno en el epidídimo durante el desarrollo puberal ovino (Carreau y col, 1984). Sin embargo, no está descrita hasta el momento la distribución del AR en el cordero neonato.

Asimismo, diferentes influencias ambientales tienen efecto sobre la distribución del AR en el epidídimo (Lei y col., 2003; Hejmej y col., 2006). Últimamente se ha encontrado que la subnutrición en la rata adulta determina menores niveles de AR epididimario (Santos y col, 2003). Además, se ha informado que ciertos tratamientos hormonales en la rata adulta se acompañan por cambios en la distribución del AR pero no por cambios en la histología epididimaria detectables por evaluación subjetiva de un observador experimentado (Trybek y col., 2005). Por lo tanto, resulta interesante estudiar si ocurre lo mismo en las condiciones experimentales de la presente tesis.

4.10 INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN SOBRE LA REPRODUCCIÓN.

La nutrición es el factor limitante más importante en los sistemas de producción animal (Brown, 1994, Kolver, 2003). La nutrición tiene efectos importantes pero transitorios sobre la producción de espermatozoides de un carnero adulto: un aumento en la energía metabolizable ofrecida a un carnero determina un aumento rápido (durante unos 10 días) en los niveles de testosterona plasmática y un aumento más estable (durante 30-50 días) en sus niveles de FSH plasmática y de tamaño testicular (revisión: Martin y col., 1990). Esto determina un efecto "flushing" útil para mejorar el desempeño de los reproductores previo a la encarnerada, pero transitorio y por lo tanto, no siempre utilizado. Los efectos de la subnutrición en el ovino macho son tanto más prolongados cuanto más tempranamente en su vida hayan ocurrido (Bielli y col., 2000 y 2001).

El estatus nutricional de una hembra durante la preñez tiene gran importancia para el crecimiento postnatal y el desarrollo de sus crías y frecuentemente determina efectos permanentes en ellas ("*programación fetal*") (revisión: Desai y Hales, 1997). Este concepto, originalmente desarrollado para explicar variaciones en susceptibilidad de seres humanos a distintas enfermedades, ha sido ahora ampliado y abarca los efectos de la subnutrición fetal o neonatal sobre el desarrollo pre y postnatal y hasta la vida adulta (Engelbregt y col., 2000; Rhind y col., 2001). Una de las adaptaciones del feto del mamífero a la falta de nutrientes u oxígeno es la disminución de la tasa mitótica, especialmente en aquellos tejidos que están en rápida división celular en el momento de la carencia del nutriente. El efecto estaría mediado o por efecto

directo de la subnutrición o por alteración en las concentraciones de factores de crecimiento u hormonas. Aún periodos cortos de subnutrición pueden así reducir permanentemente el número de células de un órgano en particular. Este es uno de los mecanismos por los cuales la subnutrición energética puede “programar” el organismo a largo plazo. También puede actuar a través de cambios en la distribución de tipos celulares, la retroalimentación hormonal, la actividad metabólica o, directamente, la estructura macroscópica de un órgano (Cooper y col., 2002).

Nuestro equipo ha hallado en los ovinos un efecto de la subnutrición *in utero* sobre el desarrollo testicular temprano, que sugiere fuertemente una limitación en la capacidad de producción de espermatozoides durante la vida adulta (Bielli y col., 2002).

Luego de la demostración de la existencia de tales efectos sobre el desarrollo testicular, nos planteamos ahora estudiar la distribución del AR en los epidídimos de corderos neonatos y determinar si existe influencia de la subnutrición fetal sobre la misma.



5. OBJETIVOS:

5.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar en qué medida la distribución y expresión del AR en el epidídimo de los corderos neonatos está vinculada al nivel de nutrición fetal de dichos individuos.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

Describir la distribución y expresión del AR en las distintas regiones histológicas del epidídimo ovino neonatal:

- 1) región E,
- 2) cabeza,
- 3) cuerpo,
- 4) cola

y en los siguientes compartimientos histológicos:

- 1) células principales del epitelio epididimario,
- 2) células musculares lisas que rodean el conducto epididimario e
- 3) intersticio conjuntivo epididimario.

6. HIPÓTESIS:

La subnutrición durante la vida fetal altera la distribución y expresión del AR en el epidídimo de los corderos neonatos.

7. MATERIALES Y METODOS.

El presente diseño experimental es la continuación de un experimento ya realizado (Genovese y col., 2006) para el estudio de los testículos de animales que sufrieron programación fetal por subnutrición, en el que ya se procesó histológicamente los epidídimos de los animales con el objetivo de estudiar la distribución de las regiones histológicas y su histología cuantitativa, y en el cual, en el marco de la presente tesis, hemos estudiado la distribución del receptor de andrógeno en los epidídimos.

7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL, ANIMALES Y TRATAMIENTO.

El experimento fue realizado en la Universidad de Australia Occidental. El tesista no participó en la toma de muestras ni en la elaboración de los preparados, sino que realizó la evaluación de los mismos. A partir de un lote de 130 ovejas Merino adultas, 25 de ellas, con gestación a feto macho único, fueron seleccionadas (peso corporal = 49 ± 7 Kg). La preñez fue confirmada a la novena semana de gestación por ultrasonografía en tiempo real y amniocentesis. Se utilizó un transductor de 3,5 MHz (Echo Camera SSD-500; Aloka, Tokio, Japón) con etanol como medio de contacto para confirmar la presencia de un único feto *in utero*. Se extrajo líquido del saco amniótico con una aguja calibre 21 (Terumo, Cheltenham, Victoria, Australia). Se tomó inicialmente muestras de 1 y 2 ml que fueron descartadas para minimizar los riesgos de contaminación maternal, y luego se aspiró muestras de 10 ml para el análisis. Se analizó la composición electrolítica de las muestras (Rapidlab 860; Bayer Diagnostics, Mulgrave, Victoria, Australia) con el fin de confirmar su origen amniótico y no alantoideo. Las muestras se centrifugaron a 1500g por 10 minutos. El sobrenadante se descartó. Se agregó una suspensión al 5% de Chelex 100 (BioRad, Hercules, CA, EEUU) con el fin de lisar las células y producir la liberación de su material genético. Una alícuota del ADN obtenido fue usada para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los primers SCUcdO43.fwd/SCUcdO.43.rev y P1-5EZ/P2-3EZ para amplificar el cromosoma Y ovino y el locus ZFY/ZFX. La mezcla para la reacción consistió en 1 U de Taq polimerasa (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), 100 μ M de cada desoxinucleótido trifosfato (Boehringer, Mannheim, Alemania), 0,1 μ M de cada primer y 2 mM de MgCl₂. El PCR se corrió usando un termociclador PTC-100 (MJ Research, Waltham, MA, EEUU) y los resultados se analizaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% para revelar las bandas correspondientes al locus ZFY/ZFX y al cromosoma Y. De esta forma la presencia de dos bandas distintas indicó la gestación de feto macho, mientras que una única banda indicó feto hembra. De un total de 38 ovejas gestantes con feto macho único, 28 se seleccionaron para el estudio, 25 para la experimentación y 3 reemplazos por si la determinación genética hubiere resultado incorrecta.

A partir de la semana 10 de preñez, las ovejas fueron alojadas en un bioterio para rumiantes, en jaulas metabólicas individuales, con un régimen de luz artificial que reproducía el fotoperiodo normal para la región. Cada día a las 10:00 hs, se controló el estado sanitario de las ovejas y se les proporcionó su

dieta experimental. Desde la semana 10 de preñez hasta la semana 17 las ovejas fueron alimentadas con 110% de sus requerimientos nutricionales gestacionales de energía metabólica (Grupo Alto, n=12) o con 70% de dichos requerimientos (Grupo Bajo, n=13). Durante el tratamiento, siempre el mismo día de cada semana, las ovejas se pesaron y se tomaron muestras de sangre yugular por venopunción.

Los corderos fueron pesados al nacer y 48 horas después del nacimiento, y luego sacrificados mediante una sobredosis de anestesia endovenosa (tiopental). Sus testículos y epidídimos izquierdos fueron pesados. Los epidídimos fueron muestreados y fijados por inmersión en formol bufferado al 4%. Los testículos ya han sido objeto de un estudio histológico cuantitativo: Bielli y col., 2002.

Las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol (50°, 70°, 95° y 100°), sumergidas en cloroformo e incluidas en bloques de parafina. Secciones histológicas (5µm de espesor) de cada muestra fueron procesadas para inmunohistoquímica del AR.

7.2 INMUNOHISTOQUÍMICA DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS.

Para determinar la presencia y distribución del AR se utilizó la siguiente técnica:

A partir de los bloques producidos se cortó (micrótopo modelo 2030, Reichert-Jung, Bonn, Alemania) tres secciones histológicas (5µm) por cada muestra, montadas en un mismo portaobjetos standard silanizado. La técnica descrita es muy agresiva con los cortes histológicos, que se desprenden o pliegan muy fácilmente. Entre las distintas técnicas existentes para aumentar la adherencia de los cortes a ser procesados para inmunohistoquímica, hemos concluido que la más segura resulta ser, en nuestras condiciones, la de recubrir los portaobjetos standard con una capa de silano (La Gotita, Aketol S.A., Buenos Aires, Argentina) antes de levantar el corte del baño en que se encuentra.

Los cortes fueron tratados con un anticuerpo primario de ratón anti AR humano diluido 1:25 en suero fisiológico (AR 441, Dako Cytomation, Carpintería, CA, USA) y con un kit revelador LSAB+ (código K0679, Dako Cytomation, Carpintería, CA, USA). Se utilizó un preparado de la misma tanda como control negativo, aplicando el kit revelador pero no el anticuerpo primario.

Se describió la presencia y distribución del AR en los siguientes tejidos y tipos celulares para cada región y animal (Fig. V: Ejemplos de compartimientos histológicos a evaluar en el estudio inmunohistoquímico.): 1) epitelio del conducto epididimario (células principales); 2) capa muscular lisa; 3) estroma interconducto. La distribución del AR fue evaluada subjetivamente por dos observadores independientes, en regiones histológicas definidas (Regiones E, Cabeza, Cuerpo y Cola), para 600 células en cada uno de los compartimientos

histológicos antedichos. El inmunomarcado del AR fue clasificado (evaluación semicuantitativa) según la intensidad de la tinción en una escala de: (-) ausente, (+) leve, (++) moderado, (+++) intenso para cada una de las 600 células de cada compartimento histológico. La evaluación fue realizada a ciegas por dos observadores experimentados.

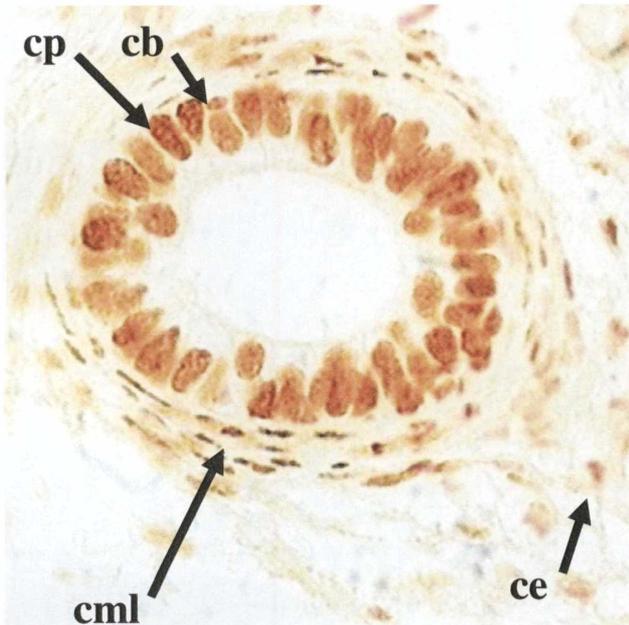


Fig. V: Ejemplos de compartimentos histológicos a evaluar en el estudio inmunohistoquímico. Se estudió la distribución del AR en los núcleos de las siguientes células: cp (célula principal), cml (célula muscular lisa), ce (célula estromal). Corte transversal de conducto epididimario, epidídimo ovino adulto, región 1 (cabeza); cb: célula basal. Imagen utilizada sólo para ejemplificar los procedimientos realizados.

7.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La cantidad de células identificadas como negativas, leves, moderadas e intensas, en su positividad al AR en cada compartimento histológico, fue expresada como porcentaje. Se calculó un índice de inmunopositividad (SI) para cada compartimento histológico, en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de inmunopositividad del AR} = 1 \times n(\text{SI1}) + 2 \times n(\text{SI2}) + 3 \times n(\text{SI3})$$

Donde n representa el número de células identificadas como negativas (no se les asigna valor en la fórmula), leves (SI1), moderadas (SI2) o intensas (SI3), expresadas en porcentajes (Boos y col, 1996).

El cálculo del índice de inmunopositividad para cada compartimento histológico y en las distintas regiones histológicas epididimarias, nos permitió generar una variable que cumple con los requisitos para ser tratada por análisis de varianza (ANOVA). Se transformó una variable semicuantitativa en una variable cuantitativa, numérica continua.

8. RESULTADOS.

Cuatro ovejas del Grupo Bajo, y cinco ovejas del Grupo Alto (control), parieron durante la semana 20 del tratamiento. Otras 15 ovejas parieron durante la semana 21 (8 del Grupo Bajo y 7 del Grupo Alto), y las restantes tres ovejas parieron en la semana 22 (una del Grupo Bajo y dos del Grupo Alto).

8.1 PESO CORPORAL.

Las ovejas pertenecientes al Grupo Bajo no experimentaron ganancias significativas de peso durante el experimento, mientras que las ovejas del Grupo Alto terminaron el tratamiento con un 17% más de peso corporal ($P < 0,05$), respecto al peso inicial pretratamiento.

En lo que respecta a los corderos, los pesos corporales al nacimiento fueron más elevados ($P < 0,05$) en aquellos pertenecientes al Grupo Alto ($5,45 \pm 0,08$ Kg) que en los animales del Grupo Bajo ($4,78 \pm 0,05$ Kg). Los corderos del Grupo Alto fueron 14% y 16% más pesados que los del Grupo Bajo ($P < 0,05$), al nacer y 48 horas después, respectivamente.

8.2 PESO TESTICULAR Y PESO EPIDIDIMARIO.

En ambos grupos los testículos derechos fueron aproximadamente un 5% más pesados que los izquierdos. No hubo diferencias ($P < 0,5$) en peso testicular entre grupos. Sin embargo, el peso del testículo derecho ($P = 0,09$), y el peso de ambos testículos ($P = 0,08$), tendieron a ser más elevados en el Grupo Alto.

Tabla 1: Pesos testiculares y epididimarios (medias \pm errores std de la media).

	GRUPO BAJO	GRUPO ALTO
Peso epidídimo izquierdo (g).	$0,59 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,04$
Peso epidídimo derecho (g).	$0,57 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,04$
Peso testículo izquierdo (g).	$0,76 \pm 0,07$	$0,88 \pm 0,04$
Peso testículo derecho (g).	$0,80 \pm 0,04$	$0,92 \pm 0,05$
Peso de ambos testículos (g).	$1,55 \pm 0,11$	$1,81 \pm 0,09$

Por valores de P de la comparación entre grupos, referirse al texto.

Para el caso de los epidídimos tanto derechos ($P=0,73$) como izquierdos ($P=0,95$), no existieron diferencias en el peso del órgano, entre los Grupos Alto y Bajo (ver tabla 1: Pesos testiculares y epididimarios (medias \pm errores std de la media)).

8.3 INMUNOPOSITIVIDAD AL AR.

La distribución y abundancia relativa del AR varió dentro de las diferentes regiones epididimarias del cordero neonato en los distintos compartimientos histológicos, aunque estas variables no fueron afectadas por el tratamiento. La inmunopositividad de las células principales del epitelio epididimario ($P=0,7479$), la de las células musculares lisas que rodean el conducto ($P=0,4263$) y la del tejido intersticial epididimario ($P=0,4238$), no fue afectada por el tratamiento. Los dos observadores produjeron mediciones que en su conjunto tuvieron las mismas diferencias entre grupos.

Se detectaron diferencias en la inmunopositividad al AR en determinados compartimientos histológicos, entre las distintas regiones epididimarias (ver tabla 2, gráficos 1, 2 y 3; y ejemplo en Figura VI).

Los resultados son por lo tanto presentados tanto por tratamiento como agrupados ambos tratamientos, por región y compartimiento histológico. Se encontraron diferencias en la positividad al AR entre regiones histológicas epididimarias en las células principales ($P=0,0099$) y en el músculo liso ($P=0,0041$). En el caso del intersticio, encontrándose diferencias exclusivamente entre las regiones de la cabeza y la cola epididimarias ($P=0,0382$). Para el caso de las células musculares lisas, la positividad al AR resultó diferente entre la región E y la región de la cola epididimaria ($P=0,0028$), y entre las regiones de la cabeza y la cola epididimarias ($P=0,0231$). En el caso de las células principales del epitelio epididimario, se encontraron diferencias significativas entre las regiones E (conductillos eferentes), y la región de la cabeza epididimaria ($P=0,0394$), entre la región E y la región del cuerpo ($P=0,0010$), y entre la región E y la región de la cola epididimaria ($P=0,0186$).

Por otra parte, se encontraron diferencias en la inmunopositividad al AR entre los distintos compartimientos histológicos en cada una de las regiones histológicas del epidídimo del cordero neonato (ver gráficos 4a, 4b, 4c y 4d). En la región E la inmunopositividad al AR fue diferente entre las células principales y el intersticio, y entre el músculo liso y el intersticio ($P=0,000$), no resultando diferentes las células principales del músculo liso. En las regiones histológicas de la cabeza, el cuerpo y la cola epididimarias, la inmunopositividad al AR fue mayor en el intersticio, intermedia en las células principales y menor en el músculo liso ($P=0,000$).

Tabla 2: Índices de inmunopositividad al AR para los distintos compartimientos histológicos y regiones epididimarias (medias \pm errores std de la media).

Región epididimaria	Compart. histológico	Tratamiento		Valores pooleados/reg
		Alto	Bajo	
Región E	ICP	54,53 \pm 17,11	78,29 \pm 7,48	71,51 \pm 7,56b
	IML	61,27 \pm 14,87	51,03 \pm 7,02	54,64 \pm 6,51a
	IIT	131,2 \pm 24,06	135,6 \pm 10,96	134,24 \pm 9,49ab
Cabeza	ICP	95,0 \pm 7,43	92,77 \pm 12,1	93,69 \pm 7,36a
	IML	59,4 \pm 15,38	46,25 \pm 8,14	48,94 \pm 7,27a
	IIT	162,8 \pm 13,83	150,6 \pm 11,53	155,63 \pm 8,45a
Cuerpo	ICP	100,92 \pm 3,95	94,13 \pm 3,66	97,15 \pm 2,67a
	IML	52,69 \pm 14,08	35,18 \pm 6,25	41,99 \pm 6,54ab
	IIT	152,3 \pm 13,19	146 \pm 11,38	148,81 \pm 8,15ab
Cola	ICP	91,33 \pm 2,44	91,14 \pm 6,23	91,23 \pm 3,86a
	IML	28,72 \pm 10,54	26,54 \pm 6,98	27,52 \pm 5,77b
	IIT	136,7 \pm 11,49	127,8 \pm 10,79	131,99 \pm 7,47b

ICP (índice de inmunopositividad para las células principales); IML (índice de inmunopositividad para las células musculares lisas); IIT (índice de inmunopositividad para el intersticio). Los valores del índice de inmunopositividad al AR en un mismo compartimiento histológico (valores pooleados de ambos grupo experimentales por región) que están acompañados por un mismo literal no son diferentes ($P < 0,05$) entre distintas regiones epididimarias.

IIP Células Principales

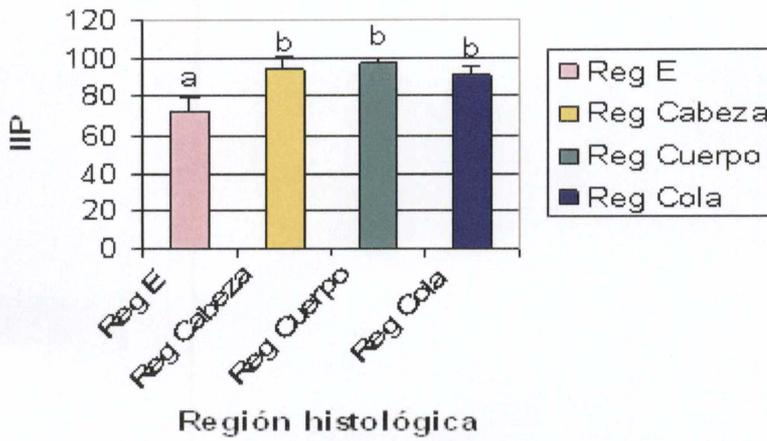


Grafico 1: índices de inmunopositividad (IIP) para las células principales del epitelio epididimario según regiones histológicas (valores pooleados por región) (medias ± errores stnd de la media).

IIP Músculo liso

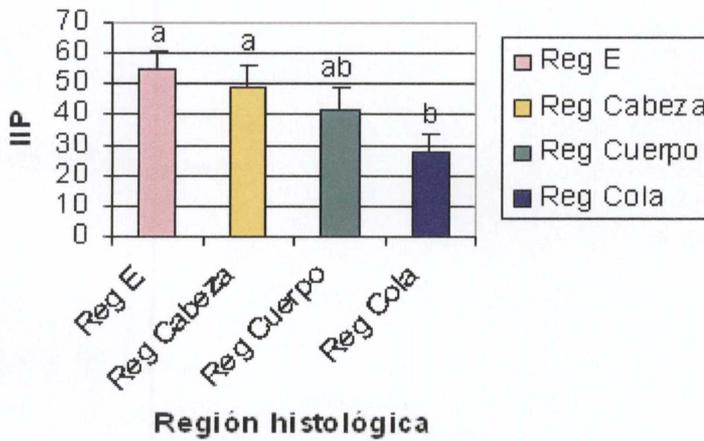


Gráfico 2: índices de inmunopositividad (IIP) para las células musculares lisas según regiones histológicas (valores pooleados por región) (medias ± errores stnd de la media).

IIP Intersticio

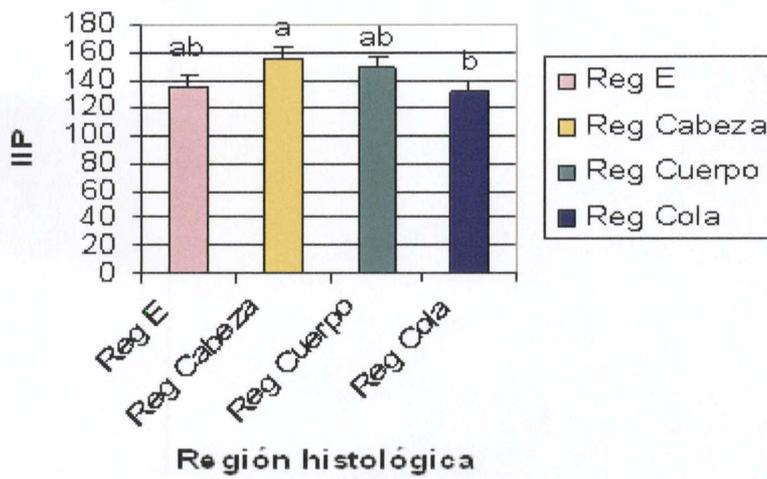
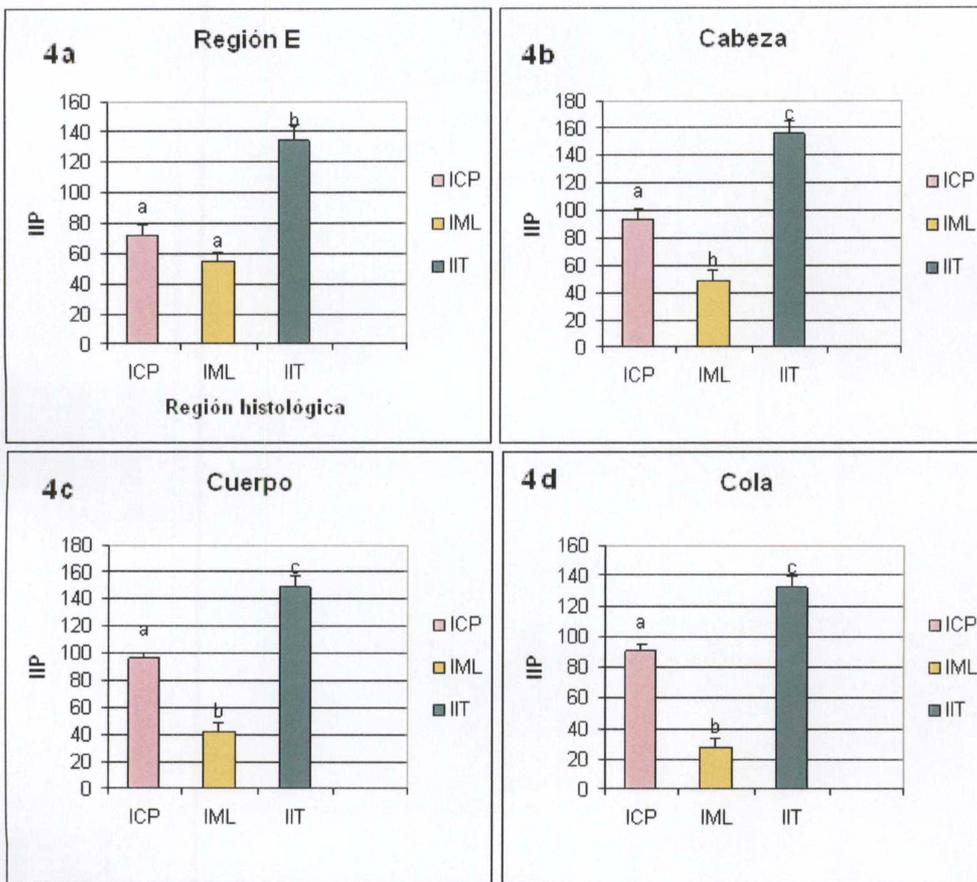


Gráfico 3: índices de inmunopositividad (IIP) para las células intersticiales según regiones histológicas (valores pooledos por región) (medias \pm errores stnd de la media).



Gráficos 4a; 4b; 4c y 4d: índices de inmunopositividad al AR para los distintos compartimientos histológicos (ICP,IML e IIT) dentro de cada una de las regiones histológicas: 4a (E), 4b (Cabeza), 4c (Cuerpo) y 4d (Cola) (medias \pm errores stdn de la media).

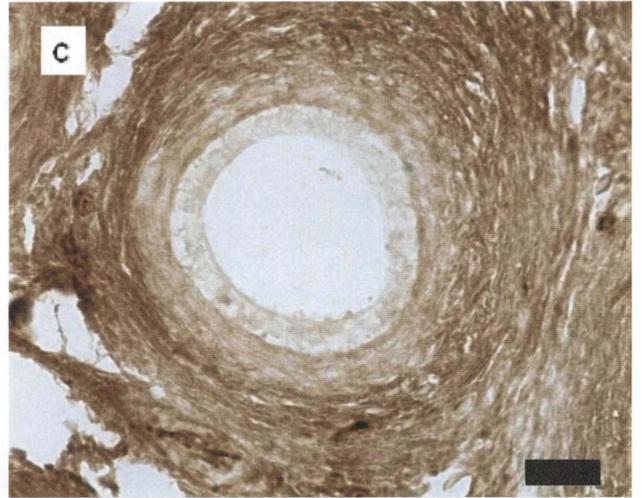
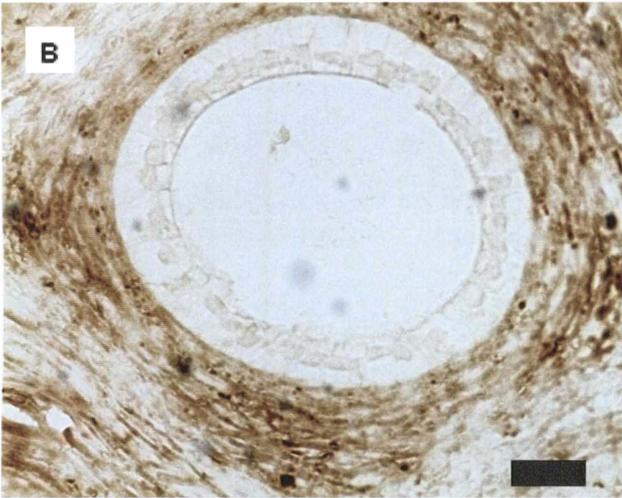


Fig. VI: Ejemplo de diferencias en la inmunoposividad al AR entre regiones histológicas. A: Control negativo. La imagen de la izquierda (B) se corresponde con un corte del conducto epididimario y el músculo liso e intersticio que los rodean, en la región de la cola. Allí la positividad al AR en todos los compartimientos histológicos resulta menor comparada con la imagen de la derecha (C), que se corresponde con un corte similar en la región de la cabeza. Barra= 40 μ m.

9.DISCUSIÓN.

9.1 LA DISTRIBUCIÓN DEL AR EN EL EPIDÍDIMO DEL CORDERO NEONATO.

De acuerdo a nuestro conocimiento esta es la primera descripción de la distribución del AR en el epidídimo del cordero neonato. Como ya se ha mencionado, para el caso de los ovinos, la distribución del AR está descrita en el epidídimo puberal (Carreau y col, 1984) y en el epidídimo del carnero adulto (Tekpetey y Amann, 1988; Tekpetey y Amann, 1989).

Nuestro trabajo demuestra la presencia del AR en todas las regiones epididimarias del cordero neonato, mostrando positividad variable tanto en las células epiteliales, como en las células musculares lisas y elementos celulares que integran el intersticio del epidídimo. Estos datos son similares a los hallazgos realizados en carneros adultos (Tekpetey y Amann, 1989), los cuales describen la presencia del AR en todas las regiones epididimarias, tanto en células epiteliales como en células musculares lisas y células pertenecientes al tejido intersticial del órgano.

En lo que respecta a otros rumiantes, nuestra descripción también es coherente con una serie de estudios realizados en cabras, ya sea en desarrollo, abarcando desde una a 23 semanas de edad (Goyal y col, 1997) o en animales adultos (Goyal y col, 1997; Goyal y col, 1998).

En el mismo sentido, nuestras observaciones son comparables con una serie de descripciones realizadas en neonatos y fetos de diferentes especies. En el ratón en desarrollo, el AR se expresó tanto en las células epiteliales como en las células mesenquimales del epidídimo (Cooke y col, 1991). También se ha descrito la presencia del AR en el epidídimo de ratas en etapas fetales (Bentvelsen y col, 1995). En la rata en edades neonatales, el AR está presente tanto en la cabeza como en la cola del epidídimo (McKinnell y col, 2001; Rivas y col, 2003). El AR también se expresó positivamente en células epiteliales y mesenquimales del epidídimo neonatal en el marsupial *Monodelphis domestica* (Sonea y col, 1997).

De la misma forma en que lo describen estos trabajos, nuestros hallazgos indican que, en el cordero neonato la distribución del AR alcanza todas las regiones del epidídimo, expresándose tanto en las células epiteliales, como en las células musculares lisas y en el tejido intersticial del órgano.

9.2 ABUNDANCIA RELATIVA DEL AR EN LAS DISTINTAS REGIONES Y TIPOS CELULARES.

En cuanto a la abundancia relativa del receptor, a la hora de comparar nuestros resultados con algunas descripciones realizadas anteriormente por otros autores, es necesario hacer algunas salvedades. En el caso de la distribución del AR descrita para el epidídimo del carnero puberal (Carreau y col, 1984), resulta fundamental mencionar que dicho análisis fue realizado considerando

las regiones epididimarias como un todo, sin discriminar dentro de cada región según compartimientos histológicos. Los resultados de Carreau y col. mostraron que la concentración del AR resultaba mayor en las regiones de la cabeza y de la cola epididimarias, con respecto a la región del cuerpo, donde la abundancia del receptor era menor. Estos resultados pueden compararse con los obtenidos en la presente tesis, considerando que nuestro análisis no midió la abundancia del AR en las regiones epididimarias como un todo, sino que determinó su abundancia relativa en cada región y en cada compartimiento histológico, a través de un sistema semicuantitativo que permite comparar regiones entre sí, pero no cuantificar en forma absoluta la concentración de AR en una región. Hechas estas salvedades, en el caso de la inmunopositividad de las células principales, nuestros resultados no coinciden con la descripción realizada para el epidídimo del cordero puberal (Carreau y col, 1984). Nuestro trabajo indica que en las células principales del epidídimo neonatal ovino, no existen diferencias en la inmunopositividad al AR entre las regiones de la cabeza, cuerpo y cola. En el caso del músculo liso y del intersticio, las diferencias encontradas en la positividad al AR entre las regiones de la cabeza y la cola del epidídimo neonatal ovino, tampoco coincidieron con los hallazgos de Carreau y col, 1984. Nuestras observaciones en las células musculares lisas y el tejido intersticial, muestran un patrón decreciente de las concentraciones de AR desde la cabeza hacia la cola epididimaria, datos que sí coinciden con la distribución descrita para el carnero adulto por Tekpetey y Amann, 1988.

Es importante remarcar que en el caso de la descripción de la distribución del AR en el epidídimo del carnero adulto realizada por Tekpetey y Amann, 1988, tampoco se procedió a realizar una discriminación según compartimientos histológicos, sino que se otorgó un valor de concentración del AR para cada región epididimaria como un todo.

A pesar de que ambas descripciones, tanto la realizada en carneros puberales (Carreau y col, 1984), como la realizada en el carnero adulto (Tekpetey y Amann, 1988), fueron realizadas sin discriminar según los compartimientos histológicos, nuestros resultados, para el caso de las células musculares lisas y del intersticio, son coincidentes con los datos correspondientes a carneros adultos y no con los valores descritos para carneros puberales.

La explicación para este hecho no resulta sencilla. Una posibilidad es que las diferencias surjan de estar comparando tres etapas diferentes del desarrollo epididimario. Por un lado, nuestros hallazgos en corderos neonatos, en el extremo opuesto, la descripción en carneros adultos, y entre medio de estas dos situaciones, la descripción de la distribución del AR realizada en el carnero puberal. En el ovino, el desarrollo epididimario se caracteriza por una variación en la distribución de las regiones histológicas a lo largo de la etapa peripuberal (3 a 6 meses de edad), con la presencia de regiones transitorias que van apareciendo y desapareciendo a medida que el epidídimo varía en su peso. Estas regiones se desplazan, y el epidídimo en general se desarrolla en sentido cráneo-caudal (Bielli y col, 2007). Si consideramos estos aspectos sobre el desarrollo epididimario ovino, podríamos decir que las descripciones de la distribución del AR en el epidídimo del carnero adulto (Tekpetey y Amann, 1988; Tekpetey y col, 1989), fueron realizadas en etapas más estables, en lo

que a desarrollo se refiere, comparadas con la descripción realizada en etapas puberales. Si además consideramos que para describir la distribución del AR en epidídimo del carnero puberal (Carreau y col, 1984), se delimitaron las regiones epididimarias desde el punto de vista anatómico, podríamos tener posibles explicaciones de nuestra no coincidencia con dichos resultados. Por el contrario, cuando en la vida adulta el desarrollo epididimario se encontró en etapas más estables, las distribuciones epididimarias del AR en el carnero adulto y el cordero neonato, resultaron más compatibles.

Por otra parte, existe una descripción de la distribución y abundancia relativa del AR en el epidídimo del carnero adulto realizada en dos fracciones tisulares disociadas enzimáticamente y conteniendo diferentes porcentajes (8 y 71%) de células principales (Tekpetey y col, 1989). Esta descripción indica que en el carnero adulto las células principales del epitelio epididimario son marcadamente más positivas al AR en las regiones de la cabeza y del cuerpo respecto a la cola (Tekpetey y col, 1989). Estas diferencias no se correspondieron con nuestros hallazgos en el epidídimo del cordero neonato, en el cual la expresión epitelial del AR fue igualmente intensa en las regiones de la cabeza, el cuerpo y la cola.

Esta es la primera descripción de la distribución y abundancia relativa del AR en la región E (conductillos eferentes), realizada en el epidídimo ovino. En los órganos del aparato reproductor del ratón, abarcando desde etapas fetales hasta los diez días de vida postnatal, los conductillos eferentes fueron indicados como el primer sitio en el cual se hacía evidente la expresión del AR a nivel epitelial (Cooke y col, 1991). En ratones, el receptor de andrógeno no sólo se hizo presente en las células epiteliales de los conductillos eferentes, sino también en elementos celulares pertenecientes al estroma de dichos conductillos (Cooke y col, 1991).

Tanto en cabras adultas como en cabras en desarrollo (1 a 23 semanas de edad), se observó de moderada a intensa inmunopositividad al AR en células epiteliales, musculares lisas y fibroblastos pertenecientes al estroma, de los conductillos eferentes (Goyal y col, 1997; Goyal y col, 1998).

En ratas, durante su desarrollo fetal y neonatal, los conductillos eferentes fueron el primer sitio del tracto genital donde se detectó expresión de AR (Bentvelsen y col, 1995).

Esta serie de descripciones realizadas en diferentes especies y etapas del desarrollo resultan coherentes con nuestros hallazgos realizados en el cordero neonato. Nuestros resultados además de indicar la expresión del AR en todos los compartimientos histológicos en la región E del epidídimo ovino neonatal, indican diferencias regionales en dicha expresión.

De esta manera, nuestro trabajo demuestra la existencia de un tipo de distribución regional del AR en el epidídimo ovino neonatal, de manera similar a lo que ocurre con el epidídimo puberal y adulto.

9.3 DIFERENCIAS EN LA INMUNOPositIVIDAD AL AR SEGÚN COMPARTIMIENTOS HISTOLÓGICOS.

Nuestros resultados difieren de los hallazgos realizados en el carnero adulto (Tekpetey y Amann, 1989). Parece ser que, contrariamente a lo observado en ovinos adultos, las células principales de corderos neonatos, no son el compartimiento histológico donde la expresión del AR es máxima, por más que muestran positividad considerable. Por el contrario, resulta ser el intersticio el compartimiento histológico que muestra la inmunopositividad más alta, en todas las regiones epididimarias.

El hallazgo de índices de inmunopositividad elevados en las células intersticiales en el epidídimo neonatal ovino, acompaña las descripciones realizadas en ratones adultos (Zhu y col, 2002), donde se encontraron positivities altas al AR tanto en células epiteliales como en células del estroma.

Si bien varios estudios han descrito la presencia del AR en células del estroma epididimario en diversas especies (Pelletier, 2000; Zhu y col, 2002; Cooke y col, 1991; Kopera y col, 2009; Goyal y col, 1997; Goyal y col, 1998), nuestro reporte parece ser el primero en el cual se indican a las células del intersticio como las más positivas al AR en todas las regiones epididimarias. Este hecho podría estar relacionado con las influencias que ejercen los tejidos conjuntivos sobre el desarrollo de los tejidos epiteliales adyacentes, la cual ha sido demostrada en órganos tan diferentes entre sí como la glándula mamaria y la próstata (Cunha, 1994). En el caso de la próstata, a pesar de que el desarrollo de esta glándula está fuertemente ligado a los andrógenos, los efectos androgénicos sobre el desarrollo epitelial se suscitan por medio de los receptores a andrógenos presentes en el mesénquima urogenital (Cunha, 1994). En este mismo sentido, estudios realizados anteriormente (Cooke y col, 1991), analizaron la expresión del AR en una serie de órganos reproductivos del ratón en desarrollo. En dicho trabajo se demostró la presencia del AR en los componentes del estroma o mesenquimales de todos los órganos en desarrollo estudiados. A la vez, se comprobó que la expresión del AR en las células epiteliales ocurre a diferentes alturas en el desarrollo del animal dependiendo del órgano reproductivo en cuestión. Estos hallazgos podrían explicar las diferencias encontradas en la expresión del AR entre nuestra descripción en el epidídimo del cordero neonato, y las descripciones realizadas en el carnero adulto (Tekpetey y Amann, 1989). El hecho de que en el epidídimo del neonato el compartimiento histológico con mayor inmunopositividad al AR sea el intersticio y no las células epiteliales, sugiere que en el desarrollo del epidídimo ovino, la intensa expresión epitelial del AR que se observa en el epidídimo del carnero, estaría precedida por una etapa de elevada expresión del AR en las células del intersticio, durante etapas neonatales. Esta explicación resulta coherente con los hallazgos referidos al desarrollo prostático en los cuales se afirma que muchos efectos androgénicos sobre los epitelios, no son debidos directamente a la interacción de estas hormonas con su receptor específico en las propias células epiteliales, sino a un tipo de regulación paracrina proveniente de los tejidos conjuntivos adyacentes AR positivos (Cunha, 2008).

Es así que tal vez, en etapas tempranas del desarrollo epididimario ovino, los efectos androgénicos sobre las células epiteliales del conducto epididimario, no se generen por la acción directa de los andrógenos sobre receptores específicos ubicados en el propio epitelio, sino que se transmitan desde los tejidos conjuntivos adyacentes. De hecho, tanto en el epidídimo del cordero neonato como en el del carnero adulto, es posible observar patrones de distribución del AR muy similares, caracterizados por concentraciones más elevadas de receptor en las regiones más proximales del órgano. Dicho patrón en el caso del epidídimo del carnero adulto, se observa en las células principales (Tekpetey y col, 1989), mientras que en el epidídimo del cordero neonato se observa en el intersticio.

9.4 EFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN FETAL SOBRE LA INMUNOPOSITIVIDAD AL AR EN EL EPIDÍDIMO DEL CORDERO NEONATO.

Como ya se mencionó anteriormente, los mismos animales y el mismo diseño experimental utilizado en la presente tesis, fueron motivo de estudios anteriores en los cuales se midió el efecto del tratamiento nutricional sobre variables morfométricas en el testículo (Bielli y col, 2002) y también en el epidídimo (Genovese y col, 2006).

En el caso del testículo, una restricción nutricional en etapas fetales del nivel de la que se implementó con este tratamiento experimental, es capaz de generar efectos determinantes sobre el órgano, tales como una reducción en el número total de células de Sertoli, capaz de disminuir el techo máximo de producción de espermatozoides de los machos afectados (Bielli y col, 2002).

Por otra parte, no hemos detectado alteraciones morfométricas de ningún tipo sobre el epidídimo con este mismo tratamiento nutricional (Genovese y col, 2006). Ni el diámetro del conducto epididimario, ni el de la luz, ni la altura epitelial o el espesor de la capa muscular resultaron modificados por el tratamiento de subnutrición fetal. Aquel tratamiento que provocara diferencias en el peso corporal y en el potencial futuro de producción de espermatozoides por efecto sobre el testículo, no se acompañó de alteraciones morfométricas detectables por nosotros en los epidídimos de los mismos animales ni sobre la distribución y la abundancia relativa del AR en dichos epidídimos. Por otra parte, este mismo tratamiento nutricional tampoco fue capaz de alterar la expresión epitelial del AR en las glándulas vesiculares de los mismos corderos neonatos (comunicación personal) ni en el peso o altura del epitelio de dichas glándulas vesiculares (Genovese y col., 2008).

Podemos decir entonces que el epidídimo ovino parece comportarse como un órgano más resistente a la subnutrición fetal, si se lo compara con el testículo.

10. CONCLUSIONES.

El AR está presente en todos los compartimientos histológicos y en todas las regiones histológicas del epidídimo del cordero neonato. Su distribución sigue un patrón de tipo regional semejante a anteriores descripciones realizadas en ovinos adultos. Sin embargo, una importante diferencia con lo que ocurre en el epidídimo del carnero adulto, es que las mayores intensidades de inmunopositividad al AR en el epidídimo del cordero neonato se observan en los elementos celulares pertenecientes al intersticio y no en las células epiteliales del conducto epididimario. Estos datos sugieren la existencia de un tipo de mediación local entre los tejidos conjuntivos y las células epiteliales del conducto epididimario durante el desarrollo neonatal.

Por otra parte, y a diferencia de lo que ocurre en el testículo, en el cual hay diferencias importantes en poblaciones celulares, un tratamiento de subnutrición fetal que afecta el peso corporal al nacimiento, pero no afecta el peso testicular ni epididimario, tampoco afecta la abundancia relativa ni la distribución del AR en el epidídimo del cordero neonato.

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abe K, Takano H, Ito T. (1984). Interruption of the luminal flow in the epididymal duct of the corpus epididymidis in the mouse, with special reference to differentiation of the epididymal epithelium. *Arch. Histol. Jpn.* 47(2):137-147.
2. Acott TS, Carr DW. (1984). Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biol. Reprod.* 30(4):926-935.
3. Adamali HI, Hermo L. (1996). Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J. Androl.* 17(3):208-222.
4. Agarwal A, Hoffer AP. (1989). Ultrastructural studies on the development of the blood-epididymis barrier in immature rats. *J. Androl.* 10:425-431.
5. Alaird ET, Cunha GR., Young P, Nicoll CS. (1991). Evidence for an organ and sex- specific role of basic fibroblast growth factor in the development of the fetal mammalian reproductive tract. *Endocrinology* 129, 2148-2154.
6. Alvarez JG, Storey BT. (1983). Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation. *Biol. Reprod.* 28(5):1129-1136.
7. Amann RP, Hay SR, Hammerstedt RH. (1982). Yield, characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. *Biol. Reprod.* 27(3):723-733.
8. Amann RP, Howards SS. (1980). Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. *J. Urol.* 124(2):211-215.
9. Bardin CW, Musto N, Gunsalus G, Kotite N, Cheng SL, Larrea F, Becker R. (1981). Extracellular androgen binding proteins. *Annu. Rev. Physiol.* 43:189-198.
10. Bardin CW, Cheng CY, Musto NA. (1988). The Sertoli cell. In the *Physiology of Reproduction*. En Knobil, E, Neill, J, (Eds.), pp. 933-974. Raven Press, New York.
11. Baumgarten H.G, Holstein A.F, Rosengren E. (1971). Arrangement, ultrastructure, and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens of man. *Z. Zeilforsch, mikrosk. Anat.* 120, 37-39.

12. Bedford JM. (2004). Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 79(2):429-460.
13. Benoit J. (1926). Recherches anatomiques, citologiques et histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule chez les mammifères. *Arch. Anat. Histol. Embryol.* 5, 173-412.
14. Bentvelsen FM, Brinkmann AO, Van der Schoot P, Van der Linden JETM, Van der Kwast TH, Boersma WJA, Schröder FH, Nijman JM. (1995). Developmental pattern and regulation by androgens of androgen receptor expression in the urogenital tract of the rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* 113:245-253.
15. Bielli A, Gastel MT, Pedrana G, Moraña A, Castrillejo A, Lundeheim N, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H. (2000). Influence of pre- and post-pubertal grazing regimes on adult testicular morphology in extensively reared Corriedale rams. *Anim. Reprod. Sci.* 58:73-86.
16. Bielli A, Katz H, Pedrana G, Gastel MT, Moraña A, Castrillejo A, Lundeheim N, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H. (2001). Nutritional management during fetal and postnatal life, and the influence on testicular stereology and Sertoli cell numbers in Corriedale ram lambs. *Small. Rum. Res.* 40: 63-71.
17. Bielli A, Pérez R, Pedrana G, Milton JTB, López Á, Blackberry MA, Duncombe G, Rodriguez-Martinez H, Martin GB. (2002). Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod. Fertil. Dev.* 14: 333-337.
18. Bielli A, Genovese P, Ungerfeld R, Katz H. (2007). Histology of lamb epididymal development. *Anat. Histol. Embryol.* 36(6):437-441.
19. Boos A, Meyer W, Schwarz R, Grunert E. (1996). Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 44 1 1-21.
20. Bouchard M, Souabni A, Mandler M, Neubüser A, Busslinger M. (2002). Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes. Dev.* 16:2958-2970.
21. Brown, DV, Amman, RP, Wagley LM. (1983). Influence of rete testis fluid on metabolism of testosterone by cultured principal cells isolated from the proximal or distal caput of the rat epididymis. *Biol. Reprod.* 28, 1257-1268.
22. Brown BW. (1994). A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams. *Reprod Nutr Dév* 34: 89-114.

23. Butenandt A. (1931). Über die chemisch Untersuchung der sexual hormone. *Z. Angew. Chem*, 44, 905-908. (Abstract).
24. Carreau S, Drosowsky MA, Courot M. (1984). Androgen-binding proteins in sheep epididymis: age-related effects on androgen-binding protein, cytosolic androgen receptor and testosterone concentrations. Correlations with histological studies. *J Endocrinol*. 103:281-286.
25. Cooke PS, Young P, Cunha GR. (1991). Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology*. 128(6):2867-2873.
26. Cooper TG. (1999). Epididymis. *Encyclopedia of Reproduction*. Volumen 2. Academic Press. 8 . 1-17.
27. Cooper C, Javaid MK, Tylor P, Walker-Bone K, Dennison E, Arden N. (2002). The fetal origins of osteoporotic fracture. *Calcif. Tissue. Int*. 70:391-394.
28. Cotton LM, O'Bryan MK, Hinton BT. (2008). Cellular Signaling by Fibroblast Growth Factors (FGFs) and Their Receptors (FGFRs) in Male Reproduction. *Endocrine Reviews* 29: 193–216.
29. Cunha GR, Reese BA, Sekkingstad M. (1980). Induction of nuclear androgen-binding sites in epithelium of the embryonic urinary bladder by mesenchyme of the urogenital sinus of embryonic mice. *Endocrinology* 107: 1767-1770.
30. Cunha GR. (1994). Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate. *Cancer*. 74 (3 Suppl):1030-1044.
31. Cunha GR. (2008). Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. *Differentiation*. 76(6):578-586.
32. Da Silva, N, Shum, WW, Breton S. (2007). Regulation of vacuolar proton pumping ATPase-dependent luminal acidification in the epididymis. *Asian. J. Androl*. 9: 476-482.
33. DeBellefeuille S, Hermo L, Gregory M, Dufresne J, G. Cyr D. (2003). Catenins in the rat epididymis: Their expression and regulation in adulthood and during postnatal development. *Endocrinology*. 144:5040-5049.
34. Delongas JL, Gelly JL, Leheup B, Grignon G. (1987). Influence of testicular secretions on differentiation in the rat epididymis: ultrastructural studies after castration, efferent duct ligation and cryptorchidism. *Exp. Cell. Biol*. 55(2):74-82.

35. Desai M, Hales CN. (1997). Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol. Rev.* 72:329-348.
36. Dornas RA, Oliveira AG, Dias MO, Mahecha GA, Oliveira CA. (2008). Comparative expression of androgen receptor in the testis and epididymal region of roosters (*Gallus domesticus*) and drakes (*Anas platyrhynchos*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 1;155(3):773-779.
37. Dressler GR, Deutsch U, Chowdhury K, Nornes HO, Gruss P. (1990). Pax2: a new murine paired-box containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development.* 109, 787-795.
38. Dziuk PJ, Mann T. (1963). Effect of atropine on the composition of semen and secretory function of male accessory organs in the boar. *J. Reprod. Fert.* 5, 101-108.
39. Engelbregt MJ, Houdijk ME, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA. (2000). The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatr. Res.* 48: 803-807.
40. Fan X, Robaire B. (1998). Orchidectomy Induces a Wave of Apoptotic Cell Death in the Epididymis. *Endocrinology.* 139(4):2128-2136.
41. Filippi S, Vannelli GB, Granchi S, Luconi M, Crescioli C, Mancina R, Natali A, Brocchi S, Vignozzi L, Bencini E, Noci I, Ledda F, Forti G, Maggi M. (2002). Identification, localization and functional activity of oxytocin receptors in epididymis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 31;193(1-2):89-100.
42. Friend DS, Gilula NB. (1972). Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J. Cell. Biol.* 53:758-776.
43. Gebauer MR, Pickett BW, Swierstra EE. (1974). Reproductive physiology of the stallion. 3. Extra-gonadal transit time and sperm reserves. *J. Anim. Sci.* ;39(4):737-742.
44. Genovese P, Picabea P, Alzugaray S, Riaño V, Pérez-Clariget R, López A, Martin GB & Bielli, A. (2008). Fetal undernutrition, epididymal histological regions and morphometrical variables in epididymides and vesicular glands of newborn lambs. 6ta. Reunión de la Asociación para la Andrología Animal Aplicada. Budapest, Hungría. Poster session 2-poster b1.
45. Genovese P, Picabea N, Cidade M, Pérez R, López R, Martin G, Bielli A. (2006). Estudio sobre la distribución de las regiones histológicas en el epidídimo del cordero neonato y la influencia de la nutrición fetal en las mismas. XXXIV Jornadas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. 223-224.

46. Goyal HO. (1985). Morphology of the bovine epididymis. *Am. J. Anat.* 172(2):155-172.
47. Goyal HO, Bartol FF, Wiley AA, Khalil MK, Chiu J, Vig MM. (1997). Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptor in the developing testis and excurrent ducts of goats. *Anat. Rec.* 249(1):54-62.
48. Goyal HO, Bartol FF, Wiley AA, Neff CW. (1997). Immunolocalization of receptors for androgen and estrogen in male caprine reproductive tissues: unique distribution of estrogen receptors in efferent ductule epithelium. *Biol. Reprod.* 56(1):90-101
49. Goyal HO, Bartol FF, Wiley AA, Khalil MK, Williams CS, Vig MM. (1998). Regulation of androgen and estrogen receptors in male excurrent ducts of the goat: an immunohistochemical study. *Anat. Rec.* 250(2):164-171.
50. Griffin JK, Blecher SR. (1994). Extracellular matrix abnormalities in testis and epididymis of XXSxr ("sex-reversed") mice. *Mol. Reprod. Dev.* 38(1):1-8.
51. Hannema SE, Hughes IA. (2007). Regulation of Wolffian Duct development. *Horm. Res.* 67 (3):142-151.
52. Hejmej A, Wiszniewska B, Kosiniak-Kamysz K, Sadowska J, Bilinska B. (2006). The presence of androgen receptors in the epididymis and prostate of the stallion and cryptorchid horse – a preliminary study. *Vet. J.* 17:373-379.
53. Hermo L, Dworkin J, Oko R. (1988). Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *Am. J. Anat.* 183(2):107-124.
54. Hermo L, Papp S, Robaire B. (1994). Developmental expression of the Yf subunit of glutathione S-transferase P in epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the rat. *Anat. Rec.* 239(4):421-440.
55. Hermo L, Adamali HI, Andonian S. (2000). Immunolocalization of CA II and H₂V-ATPase in Epithelial Cells of the Mouse and Rat Epididymis. *J. Androl.* 21:376–391.
56. Hess RA. (2003). Estrogen in the adult male tract: A review. *Reprod. Biol and Endocr.* 1: 52-66.
57. Hinton BT, Palladino MA. (1995). Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc. Res. Tech.* 30:67-81.
58. Hoffer AP, Hinton BT. (1984). Morphological evidence for a blood epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity. *Biol. Reprod.* 30:991-1004.

59. Jiang FX, Temple-Smith P, Wreford NG. (1994). Postnatal differentiation and development of the rat epididymis: a stereological study. *Anat. Rec.* 238:191-198.
60. Jones RC. (1998). Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53:197-210.
61. Jones RC. (1999). To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Int. J. Androl.* 22:57-67.
62. Kirby JL, Yang L, Labus JC, Hinton BT. (2003). Characterization of fibroblast growth factor receptors expressed in principal cells in the initial segment of the rat epididymis. *Biol. Reprod.* 68:2314–2321.
63. Kolver ES. (2003). Nutritional limitations to increased production on pasture-based systems. *Proc. Nutr. Soc.* 62:291-300.
64. Kopera I, Tuz R, Hejmej A, Schwarz T, Koczanowski J, Bilinska B. (2009). Immunolocalization of Androgen Receptor in the Boar Epididymis: the Effect of GnRH Agonist Deslorelin. *Reprod. Domest. Anim.* 44(2):266-272.
65. Lan ZJ, Labus JC, Hinton BT. (1998). Regulation of γ -glutamyl transpeptidase catalytic activity and protein level in the initial segment of the rat epididymis by testicular factors: role of basic fibroblast growth factor. *Biol. Reprod.* 58:197–206.
66. Laitinen L, Talo A. (1981). Effects of adrenergic and cholinergic drugs on electrical and mechanical activities of the rat cauda epididymidis in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 63(1):205-209.
67. Lei ZM, Zou W, Mishra S, Li X, Rao ChV. (2003). Epididymal phenotype in luteinizing hormone receptor knockout animals and its response to testosterone replacement therapy. *Biol. Reprod.* 68:888-895.
68. Le Barr DK, Blecher SR, Moger WH. (1986). Androgen levels and androgenization in sex-reversed (XXSxr pseudomale) mouse: absence of initial segment of epididymis is independent of androgens. *Arch. Androl.* 17(3):195-205.
69. Le Barr DK, Blecher SR. (1987). Decreased arterial vasculature of the epididymal head in XXSxr pseudomale ('sex-reversed') mice. *Acta. Anat. (Basel).* 129(2):123-126.
70. Le Barr DK, Blecher SR, Moger WH. (1991). Development of the normal XY male and sex-reversed XXSxr pseudomale mouse epididymis. *Mol. Reprod. Dev.* 28(1):9-17.

71. Leung GP, Cheung KH, Leung CT, Tsang MW, Wong PY. (2004). Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Mol. Cell. Endocrinol.* 15:5-13.
72. Mann, T. (1964). *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract.* Methuen, London.
73. Martin GB, Ford JR, Purvis IW. (1990). Environmental and Genetic factors affecting reproductive activity in the Merino ram. En: *Reproductive Physiology of Merino Sheep: Concepts and Consequences.* Oldham CM, Martin GB, Purvis IW (eds.). School of Agriculture (Animal Science), The University of Western Australia.
74. McKinnell C, Atanassova N, Williams K, Fisher JS, Walker M, Turner KJ, Saunders TK, Sharpe RM. (2001). Suppression of androgen action and the induction of gross abnormalities of the reproductive tract in male rats treated neonatally with diethylstilbestrol. *J Androl.* 22(2):323-338.
75. Meistrich ML, Hughes TH, Bruce WR. (1975). Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone. *Nature.* 13;258(5531):145-157.
76. Mewe M, Bauer CK, Schwarz JR, Middendorff R. (2006). Mechanisms regulating spontaneous contractions in the bovine epididymal duct. *Biol. Reprod.* 75(4):651-659.
77. Moore HDM, Bedford, JM. (1979). The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymis before and after castration. *Anat. Rec.* 193,313-328.
78. Nicander L. (1958). Studies on the regional histology and cytochemistry of the ducts epididymis in stallions, rams and bulls. *Acta Morphol. Neerl. Scand.* 1:233-240.
79. Nilnophakoon N. (1978). Histological studies on the regional postnatal differentiation of the epididymis in the ram. *Anat. Histol. Embryol.* 7:253-272.
80. Orgebin-Crist MC. (1967). Sperm maturation in rabbit epididymis. *Nature;* 216:816-818.
81. Palacios J, Regadera J, Nistal M, Paniagua R. (1991). Apical mitochondria-rich cells in the human epididymis: an ultrastructural, enzymohistochemical, and immunohistochemical study. *Anat. Rec.* 231(1):82-88.
82. Parlevliet JM, Pearl CA, Hess MF, Famula TR, Roser JF. (2006). Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid

- concentrations in the stallion epididymis. *Theriogenology*. 1;66(4):755-765.
83. Pearl CA, Berger T, Roser JF. (2007). Estrogen and androgen receptor expression in relation to steroid concentrations in the adult boar epididymis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33(4):451-459.
84. Pelletier G. (2000). Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol. Histopathol.* 15:1261-1270.
85. Pholpramool C, Triphrom N, Din-Udom A. (1984). Intraluminal pressures in the seminiferous tubules and in different regions of the epididymis in the rat. *J. Reprod. Fertil.* 71(1):173-179.
86. Reid BL, Cleland, KW. (1957). The structure and function of the epididymis: histology of the rat epididymis. *Aust. J. Zool.* 5, 233-246.
87. Rhind SM, Rae MT, Brooks AN. (2001). Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 122:205-214.
88. Rivas A, McKinnell C, Fisher JS, Atanassova N, Williams K, Sharpe RM. (2003). Neonatal coadministration of testosterone with diethylstilbestrol prevents diethylstilbestrol induction of most reproductive tract abnormalities in male rats. *J. Androl.* 24(4):557-567.
89. Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist MC. (2006). The epididymis. In: Neill JD, ed. *Physiology of reproduction*. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier.
90. Saling PM. (1982). Development of the ability to bind to zonae pellucidae during epididymal maturation: reversible immobilization of mouse-spermatozoa by lanthanum. *Biol. Reprod.* 26(3):429-436.
91. Sainio K, Hellstedt P, Kreidberg JA, Saxén L, Sariola H. (1997). Differential regulation of two sets of mesonephric tubules by WT-1. *Development* 124:1293-1299.
92. Santos AM, Ferraz MR, Teixeira CV, Sampaio FJ, da Fonte Ramos C. (2003). Altered gene expression during rat Wolffian duct development in response to in utero exposure to the antiandrogen linuron. *Toxicol. Sci.* 74:114-128.
93. Seiler P, Cooper TG, Nieschlag E. (2000). Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. *Int. J. Androl.* 23(2):65-76.
94. Serre V, Robaire B. (1999). Distribution of Immune Cells in the Epididymis of the Aging Brown Norway Rat Is Segment-Specific and Related to the Luminal Content. *Biol. of Reprod.* 61, 705–714.

95. Simeone F.A. (1933). A neuromuscular mechanism in the ductus epididymis and its impairment by sympathetic denervation. *Am. J. Physiol.* 103, 582-591.
96. Soler C, Yeung CH, Cooper TG. (1994). Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *Int. J. Androl.* 17(5):271-278.
97. Sonea IM, Iqbal J, Prins GS, Jacobson CD. (1997). Ontogeny of androgen receptor-like immunoreactivity in the reproductive tract of male *Monodelphis domestica*. *Biol. Reprod.* 56(4):852-860.
98. Studdard PW, Stein JL, Cosentino MJ. (2002). The effects of oxytocin and arginine vasopressin in vitro on epididymal contractility in the rat. *Int. J. Androl.* 25(2):65-71.
99. Tekpetey FR, Amann RP. (1988). Regional and seasonal differences in concentrations of androgen and estrogen receptors in ram epididymal tissue. *Biol. Reprod.* 38:1051-1060.
100. Tekpetey Fr, Veeramachaneni DN, Amann RP. (1989). Localization of androgen receptors in ram epididymal principal cells. *J. Reprod. Fertil.* 87(1):311-319.
101. Torres M, Gómez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P. (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development* 121:4057-4065.
102. Tournade A. (1913). Différence de motilité des spermatozoïdes prélevés dans les divers segments de l'épididyme. *C. R. Soc. Biol.* 74, 738-739.
103. Trybek G, Kolasa A, Marchlewicz M, Wenda-Rosewicka L, Wiszniweska B. (2005). Immunolocalization of androgen receptor in the epididymis of rats with dihydrotestosterone deficiency. *Reprod. Biol.* 5:291-301.
104. Turner TT. (1991). Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 637:364-383.
105. Ungefroren H, Ivell R, Ergün S. (1997). Region-specific expression of the androgen receptor in the human Epididymis. *Mol. Human. Reprod.* vol.3 no.11 pp. 933–940.
106. Usselman MC, Cone RA. (1983). Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by "immobilin," a high molecular weight glycoprotein. *Biol. Reprod.* 29(5):1241-1253.

107. Wilkinson L, Sweeny PR, Blecher SR. (1988). Ultrastructural abnormalities of epididymal tissues in XXSxr pseudomale (sex-reversed) mice. *Arch. Androl.* 20(1):11-20.
108. Whittington K, Assinder SJ, Parkinson T, Lapwood KR, Nicholson HD. (2001). Function and localization of oxytocin receptors in the reproductive tissue of rams. *Reproduction.* 122(2):317-325.
109. Yeh S, Tsai M, Xu Q, Mu X, Lardy H, Huang K, Lin H, Yeh S, Altuwaijri S, Zhou X, Xing L, Boyce BF, Hung M, Zhang S, Gan L, Chang C. (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivomodel for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:13498-13503.
110. Yeung CH, Oberländer G, Cooper TG. (1994). Maturation of hamster epididymal sperm motility and influence of the thiol status of hamster and rat spermatozoa on their motility patterns. *Mol. Reprod. Dev.* 38(3):347-355.
111. Zankl H, Leidl W. (1969). Effect of vasoligation and a sympatholytic agent on the number of sperm cells in the epididymis in rabbit. *J. Reprod. Fertil.* 18(1):181-192.
112. Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenellenbogen BS, Hess RA. (2002). Localization of Androgen and Estrogen Receptors in Adult Male Mouse Reproductive Tract. *J. Androl.* 23:870–881.