



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**EFECTO DIFERENCIAL DE LA ADMINISTRACION
CRONICA DE 17 β ESTRADIOL SOBRE LA
FISIOLOGIA Y ESTRUCTURA DE LAS DISTINTAS
REGIONES ANATOMICAS DEL EPIDIDIMO**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

PRESENTA:

YVONNE MICHELLE HEUZE DE ICAZA

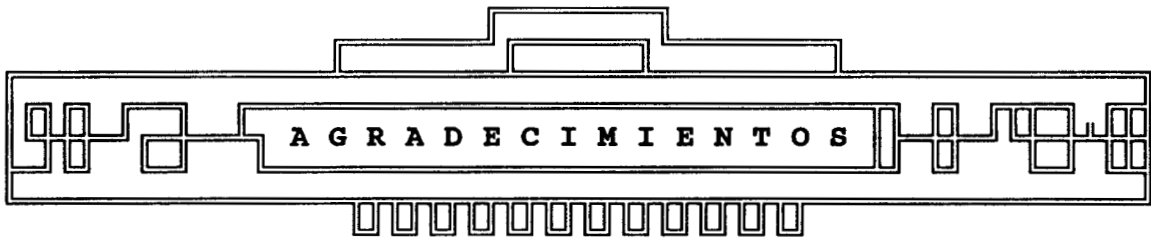
ASESOR DE TESIS:

DR. ADOLFO ROSADO GARCIA

1 9 9 2

5-XII-95

153877



Al Dr. Adolfo Rosado por permitirme tener el honor de trabajar en sus proyectos y haber compartido conmigo de sus conocimientos.

Dr. Horacio Merchant:

Mil gracias por su sabiduría y amor a la investigación, por hacerme sentir parte de su equipo de trabajo y estar siempre dispuesto a enseñarnos y proporcionarnos sus acertados consejos. Gracias por ayudarme y permitir realizar esta meta en mi vida.

A José, Diana, Alejandro, Norma, Enrique, Salvador, etc., integrantes del laboratorio del Dr. Merchant en el Instituto de Biomédicas, por ser tan agradables compañeros y siempre estar dispuestos a ayudarme, esto hizo posible que la realización de mis experimentos se diera bajo un ambiente de respeto, cordialidad y alegría.

A mis padres por su sabiduría al educarnos y por todo lo que me han permitido realizar en mi vida con su apoyo incondicional.

Tu Yves aunque estás tan lejos de nosotros siento siempre tú apoyo y amor desde allá arriba.

Susana te quiero por todo el valor que nos has dado a tus hijas con tu ejemplo.

A mis hermanos y amigos por ser las gentes con las que siempre se puede contar en las buenas y en las malas y que generan energía positiva para mi.

A los ANIMALES DE LABORATORIO que con sus vidas permiten
el avance de la ciencia

A Dios por darme tantas oportunidades en esta vida

CONTENIDO:

1.- RESUMEN.	9
2.- INTRODUCCION	11
2.1. HISTOLOGIA DEL EPIDIDIMO.	
2.2. SINTESIS DE ANDROGENOS.	
2.3. FUNCIONES DEL EPIDIDIMO.	
3.- HIPOTESIS	45
4.- OBJETIVOS	45
5.- MATERIAL Y METODOS	46
5.1. MATERIAL BIOLÓGICO.	
5.2. IMPLANTES.	
5.3. OBTENCION DE GONADAS Y MUESTRAS BIOLÓGICAS.	
5.4. MICROSCOPIA.	
6.- ANALISIS ESTADISTICO.....	49
7.- APENDICE.....	50
8.- RESULTADOS.....	52
9.- DISCUSION.....	74
10.- BIBLIOGRAFIA.....	78

R E S U M E N

Recientemente se ha indicado la utilización de dosis pequeñas de estradiol (240 ng/día/animal) (Ericsson y Baker, 1966; Singh et al., 1970; Rao y Chinoy, 1983; Robaire et al, 1987), como un recurso para lograr el control de la fertilidad en el hombre.

En vista de que los resultados de Robaire y col (1987) muestran alguna evidencia de la respuesta diferencial del epidídimo a la presencia de estrógenos, que concuerda con algunos otros datos reportados sobre la presencia de receptores a estrógenos en el tejido epididimario, nosotros decidimos estudiar el efecto de la presencia continua de estrógenos sobre la morfología y la histología del epidídimo en sus tres regiones anatómicas, cabeza, cuerpo y cola, en un intento por demostrar que la regulación endócrina del epidídimo se realiza de manera diferencial en estos tres sectores anatómicos, lo cual abriría nuevas perspectivas para la utilización de técnicas anticonceptivas hormonales utilizables en el hombre.

Se utilizaron ratas Wistar machos de 300-350g como rango de peso; divididas al azar en 8 lotes de seis animales cada uno, que se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas, agua y alimento ad libitum. Los implantes se realizaron con tubo de polidimetil siloxano en tres diferentes longitudes, 1mm, 3mm, 7mm, rellenos de 17 β estradiol para una liberación continua de (0.24 μ g/mm/día) (Robaire et al., 1979) y sellados con pegamento silástico médico. El mismo procedimiento se realizó con los implantes control pero estos se encontraban vacíos.

Dichos implantes fueron depositados por medio de un trocar en la región dorsolateral del torax del animal bajo anestesia general.

Los animales fueron pesados semanalmente durante dos períodos de 6 y 12 semanas y al término de las mismas fueron sacrificados por decapitación. Se les extrajo el aparato reproductor por vía abdominal, aislando los diferentes órganos (testículo, próstata, vesícula seminal, epidídimo); se peso cada órgano y el epidídimo se dividió en tres regiones anatómicas (cabeza, cuerpo y cola) para ser fijados por el método de Karnovsky para los estudios de microscopía de luz y electrónica.

Los resultados obtenidos indican que la presencia continua de estradiol indujo una disminución, dependiente de la dosis en el peso de la cabeza y cola del epidídimo, sin modificar significativamente el peso del cuerpo de éste órgano.

El peso de la cola del epidídimo fué significativamente ($p \leq 0.05$) más afectado que el peso de la cabeza de este órgano.

En los estudios histológicos lo más sobresaliente son los cambios que sufre el epitelio epididimal por la cantidad considerable de colágena que se encuentra depositada entre las asas del tubo epididimal y la hiperplasia e hipertrofia de las fibras musculares lisas. Asimismo, se provoca un colapso del tubo del epidídimo que prácticamente hace desaparecer la cavidad luminal de éste. Todos estos cambios se ven más acentuados con la dosis alta (7mm) siendo mayor el efecto en la parte de la cola y en menor grado en la cabeza. En las otras dos longitudes de dosis (1mm, 3mm) no hay ningún cambio aparente.

I N T R O D U C C I O N .

El testículo tiene una doble tarea: la producción de hormonas y la producción de espermatozoides. Los espermatozoides se encuentran inmóviles e infértiles, mientras permanecen en el testículo y sólo después de entrar en el ducto epididimario, experimentan una serie de cambios que les permite adquirir la capacidad de movilidad progresiva y de fertilidad.

Los espermatozoides terminada su estructuración abandonan el testículo y pasan al epidídimo por los llamados túbulos seminíferos. Estos túbulos ocupan los lobulillos o compartimentos dentro del testículo que están limitados por los tabiques de tejido conjuntivo que se extiende hacia dentro desde la túnica albugínea. Los diferentes túbulos de cada lobulillo forman asas retorcidas, cuyos extremos convergen hacia la región posterior, constituida por tejido conjuntivo muy vascularizado, que recibe el nombre de mediastino testicular. Dentro de esta estructura, existe un plexo laberíntico de canales revestidos de epitelio que se denomina **RETE TESTIS**. (Fawcett 1991)

CONDUCTOS EFERENTES:

Por la cara posterior del testículo salen a la superficie del órgano doce o más **CONDUCTOS EFERENTES** que son una serie de túbulos que se originan en la rete testis. Dependiendo de la especie, el número varía de 4 a 20 (Robaire, Hermo 1988). Presentan numerosas tortuosidades espirales y constituyen de cinco a diez cuerpos cónicos que se llaman conos vasculosos. Estos tienen sus bases hacia la cabeza del epidídimo y sus vértices hacia el mediastino testicular. Están unidos por tejido conjuntivo y constituyen parte de la cabeza del epidídimo.

Estos túbulos vienen juntos para formar un simple conducto altamente convolucionado que es el **EPIDIDIMO**.
(VER FIGURA # 1)

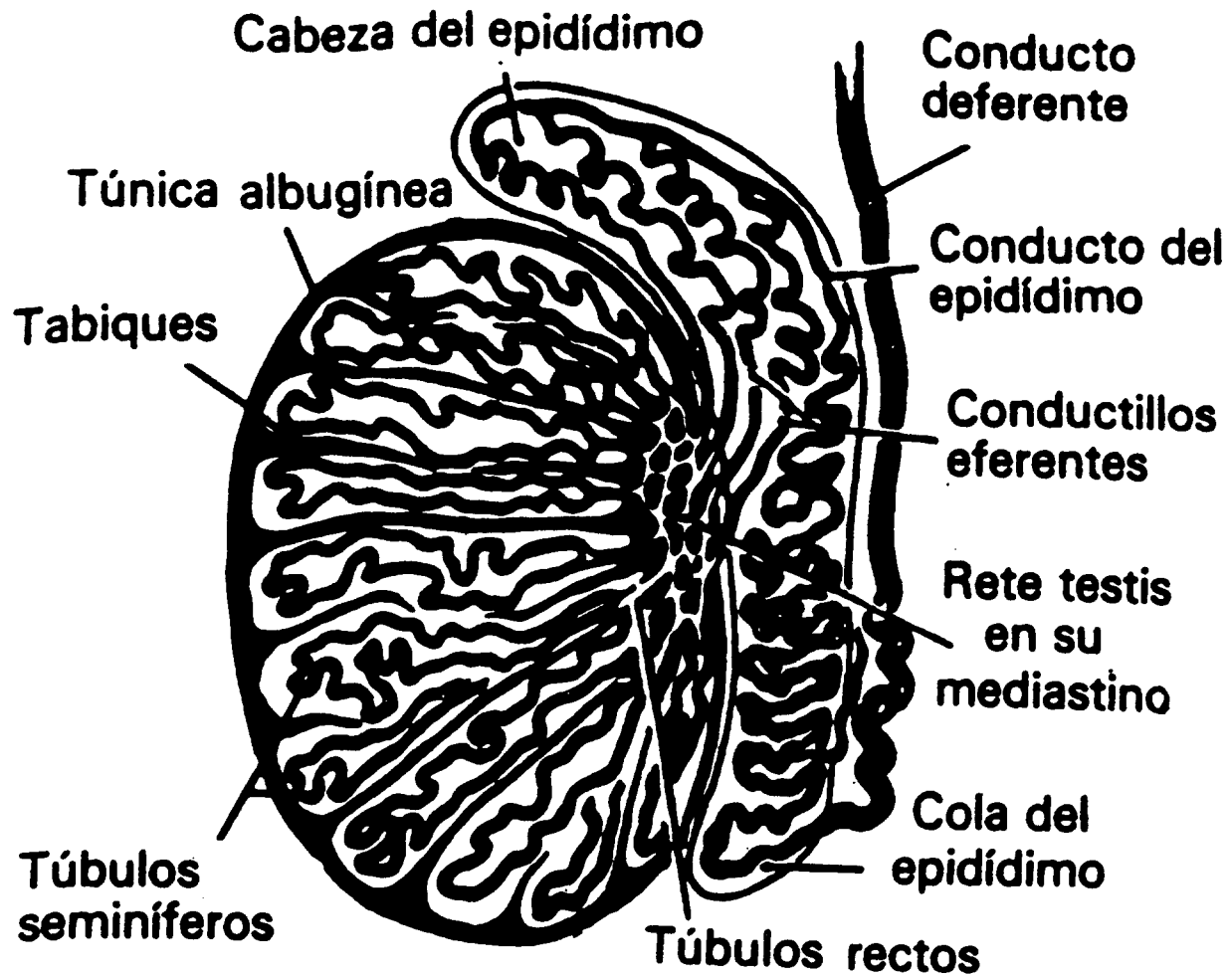


FIGURA # 1

ORGANIZACION DEL TESTICULO Y EL EPIDIDIMO

2.1. HISTOLOGIA .- En microscopio de Luz en la rata adulta:

Los conductos eferentes tienen una delineación muy marcada con la rete testis. La altura de las células se incrementan dramáticamente de células bajas cuboidales de la rete testis a células columnares altas de los conductos eferentes. Dentro de los conductos eferentes, hay una diferencia mayor en la apariencia entre la zona inicial y terminal (Reid y Cleland 1957)

Las dos regiones contienen células epiteliales columnares ciliadas y no ciliadas, las células no ciliadas de la zona inicial tienen una región supranuclear con gránulos moderadamente teñidos en la zona final; la región supranuclear de éstas células, contienen numerosos gránulos oscuros. Las células ciliadas son reconocidas por su apariencia teñida densa, la posición apical del núcleo y los largos cilios. Las células Halo son ocasionalmente encontradas en el epitelio de los conductos eferentes (Robaire 1988).

EPIDIDIMO:

Viene del griego que significa adyacente al testículo, esta constituido por un túbulo extremadamente largo y contorneado, cuya longitud varía según la especie. En el hombre 3-4 mts., caballo 80 mts., roedores 1 mt. (Robaire, Hermo, 1988). Este túbulo es llamado conducto epididimario; es un tubo angosto rodeado por una gruesa membrana muscular.

Por su diferenciación anatómica, fundamentalmente, y en la actualidad también fisiológica los componentes estructurales principales del epidídimo son: **CABEZA (caput)**, **CUERPO (corpus)** Y **COLA (cauda)**, aunque de hecho cada uno de estos segmentos tiene a su vez sus propias divisiones o subsegmentos, teniendo así diferentes tipos de células y peculiaridades funcionales.

La cabeza se haya en íntima conexión con el testículo por los conductos eferentes antes mencionados. Las asas y vueltas del tubo están cubiertas por una capa fibrosa fina, que representa el equivalente de la túnica albugínea, y una capa visceral superficial de la túnica vaginal (Cormack 1987); se mantienen unidos por tejido conectivo y fibras musculares lisas. El conducto epididimario esta recubierto por túnica muscular que consta de fibras longitudinales, circulares y oblicuas. En su interior se encuentra una lámina epitelial que consiste en un epitelio columnar estereociliado, de tipo pseudoestratificado. Las células basales contienen gotas delgadas de lípidos y modificaciones apicales en forma de estereocilios.

Los estereocilios son microvellosidades extralargas que carecen de movilidad ya que no tienen disposición microtubular interna pero sirven para incrementar la superficie de absorción o secreción de revestimiento. La lámina propia consiste de un tejido conjuntivo areolar vascularizado. La lámina muscular está dispuesta en forma circular y se engrosa hacia la cola del epidídimo. La túnica submucosa es de tejido conjuntivo areolar en la parte central y en la periferia, la cual es continuación de la túnica albugínea. Muchos espermatozoides se almacenan dentro del lumen del conducto epididimal durante su maduración. (Setchel y Brooks 1988).

En la parte de la cabeza las células estereociliadas son rectas y largas y casi cubren el lumen que contiene el líquido epididimario esparcido por espermatozoides. La parte media tiene un lumen ancho y los estereocilios usualmente están curvos o algunas veces ramificados, por lo que las vacuolas supranucleares son prominentes en el epitelio. El segmento terminal tiene menos epitelio; los estereocilios son bajos y menos densos y el lumen del túbulo es densamente compactado con esperma.

El túbulo epididimal está rodeado por tejido conectivo que contiene fibroblastos, colágena, fibras elásticas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, fibras nerviosas, macrófagos, y membranas concéntricas de músculo liso. El grosor de la membrana de músculo liso que rodea el túbulo se incrementa de la parte inicial al segmento terminal (Setchel y Brooks 1988).

En la rata hay una gran acumulación de tejido graso alrededor de la región proximal del epidídimo y constituye el llamado "Paquete graso epididimario".

El epidídimo al estar junto con el testículo dentro del escroto, tendrá una temperatura mas baja que las demás partes del cuerpo (Setchell y Brooks 1988)

IRRIGACION:

El epidídimo recibe sangre por dos grandes rutas arteriales. La cabeza, el cuerpo y la región proximal de la cola, son irrigados por ramas de la arteria espermática un poco antes o casi después de llegar al plexo pampiniforme. La cola es irrigada por la arteria deferencial; rama de la arteria iliaca interna (hipogástrica). Hay usualmente dos ramas de la arteria epididimaria: la arteria superior epididimal que irriga los ductos eferentes, la cabeza y el cuerpo proximal, mientras que la arteria epididimal inferior irriga cuerpo y cola. Cada arteria provee ramas en las zonas formado redes capilares alrededor del túbulo. (Fawcett 1991, Setchell 1970)

El epidídimo es un órgano muy vascularizado. El volumen mayor de irrigación se localiza en la porción inicial de la cabeza que es el lugar metabólicamente más activo. (Fawcett 1991).

LINFATICOS:

Rama testicular linfática que acompaña la arteria espermática para alcanzar los nódulos del grupo para-aórtico o lumbar.

INERVACION:

El epidídimo esta inervado por los nervios espermáticos medio e inferior. El nervio espermático inferior sale del plexo pélvico y contiene tanto fibras simpáticas como parasimpáticas. Este órgano es rico en plexos perivasculares adrenérgicos y colinérgicos, su distribución depende de cada especie. La cabeza y la cola están inervadas, en forma más distribuida en la rata, el conejo, el cayo y el hombre, pero la inervación se vuelve más compleja en el perro y en el gato. La inervación de la cola es progresivamente más prominente conforme la membrana del músculo liso se incrementa hacia los túbulos deferentes.

En todas las especies, excepto en la rata se han reportado fibras colinérgicas y adrenérgicas en la lámina propia y epitelio; en la cabeza y en la cola, pero no en el cuerpo. Sin embargo la localización intraepitelial de las neuronas nunca ha sido observada en estudios ultraestructurales (Setchel y Brooks 1988).

PATRON DE DESARROLLO EN EL SISTEMA DE DUCTOS:

Los ductos eferentes, epidídimo, vas deferens y vesícula seminal son generalmente considerados de origen **MESONEFRICO** (Wolfianos). Se forman del segmento anterior (Robaire, Hermo. 1988)

El vas deferens del segmento medio y vesículas seminales del segmento posterior, son tejidos que se desarrollan durante la gestación, bajo la influencia de la testosterona y no de la dihidrotestosterona (DHT) (Wilson y col. 1981).

El origen mesonéfrico común del epidídimo y riñón ha podido en gran manera, proveer las pruebas necesarias para entender el proceso regulatorio que crea un difícil complejo y cambios de constituyentes luminales del sistema de ductos. Recientes estudios no solamente han mostrado que hay gradientes iónicos en el epidídimo, análogos a aquellos que hay en riñón, sino también que las hormonas no parecen afectar al epidídimo pero si al riñón.

La vitamina D y prolactina tienen receptores epididimarios específicos y probablemente juegan un papel importante en este tejido (Jenkins y col. 1980).

Estudios realizados con una cepa de ratas deficientes en estos tejidos que vienen de túbulos mesonéfricos, mostraban que estos animales no tenían riñón, vesículas seminales, conducto deferentes y parte del epidídimo, pero si tenían ductos eferentes y la porción proximal del epidídimo, lo que hizo que los investigadores propusieran que estas regiones del sistema se originan de los túbulos mesonéfricos en vez de conducto mesonéfrico (Robaire, Hermo. 1988).

NATURALEZA BICOMPARTAMENTAL DEL SISTEMA DE CONDUCTOS.

Los conductos del sistema se dividen en dos compartimentos: El epitelio y el lumen.

Sus funciones son:

COMPARTIMENTO EPITELIAL

- a) absorción
- b) secreción
- c) metabolismo
- d) espermiófagia.

COMPARTIMENTO LUMINAL

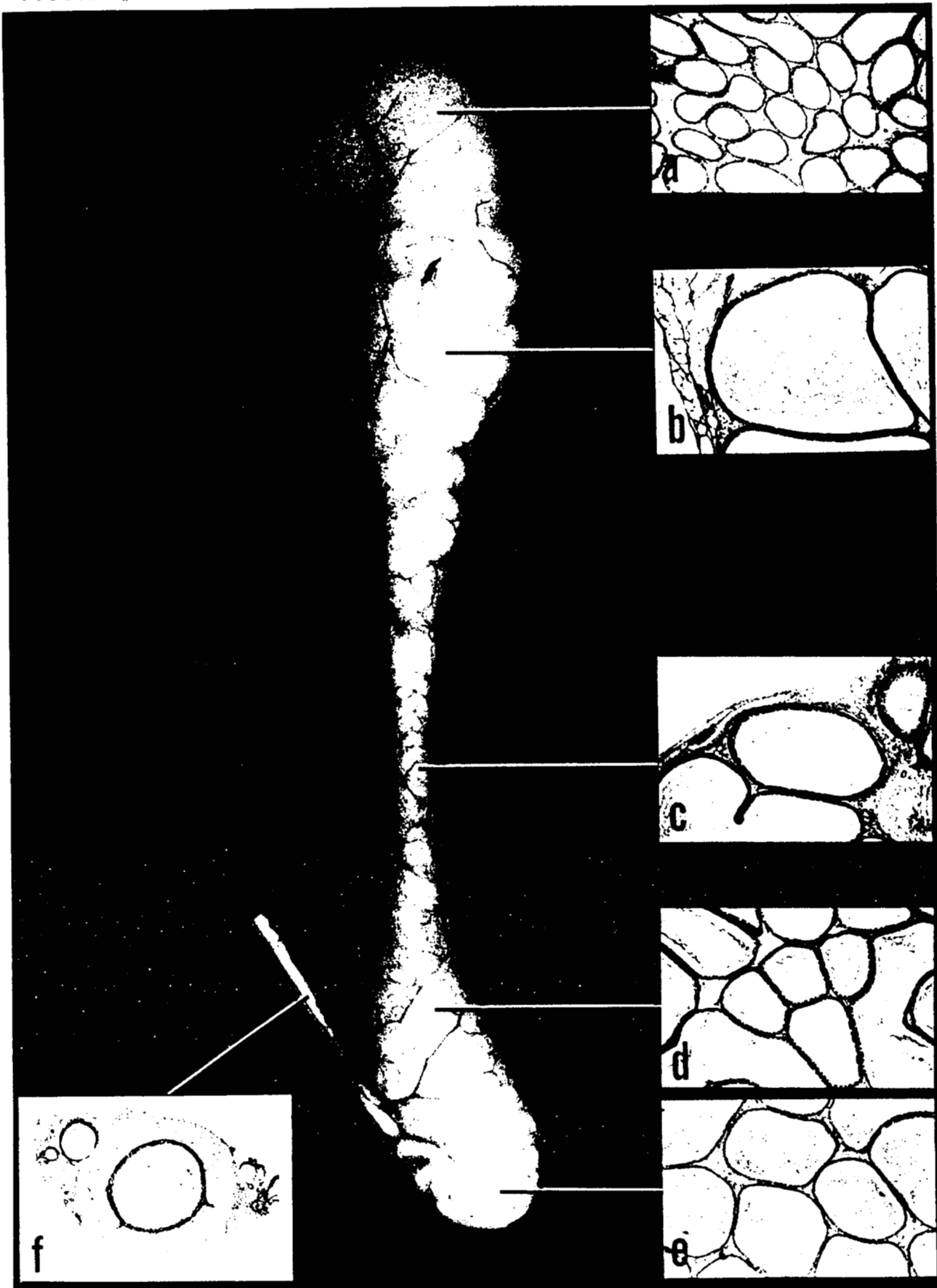
- 1.- Transporte de esperma.
- 2.- Adquisición de habilidad para fertilizar, incluyendo la capacidad de movilidad progresiva.
- 3.- Maduración.
- 4.- Almacenaje.

COMPARTIMENTO EPITELIAL.

ANATOMIA Y HISTOLOGIA:

Histológicamente se subdividen en 6 u 8 diferentes zonas y la rata es una de las especies más estudiadas (Ver figura # 2). El epitelio epididimal es muy complejo debido a que contiene gran variedad de tipos de células; cada célula o tipo de célula, varía al depender la proporción del total de la población en los diferentes puntos a lo largo del ducto (Faucett 1991). En contraste con el conducto eferente; el epidídimo carece de células ciliadas, la célula predominante es principalmente esteriociliada.

FIGURA # 2



VISTA DEL EPIDIDIMO Y DE SU HISTOLOGIA (3.5X). A) Segmento inicial de la cabeza; B) Segmento final cabeza; C) Cuerpo; D) Cauda Proximal; E) Cauda distal F) Vas Deferens. TOMADO: Yanagimachi y col (1985).

Los cambios regionales en la histología del epidídimo fueron descritas ya con precisión desde 1957 por Reid y Cleland. Incluyendo las proporciones de células principales, estrechas, claras, basales y con halo.

En el segmento inicial, las células principales muestran núcleos en diferentes niveles. Aquellas con núcleo en la parte alta de la mitad de la célula se han referido como células apicales (Sun y Flickinger 1980). Las células principales son moderadamente teñidas y muestran algunas microvellosidades altas que forman una barrera como cepillo. Estas células tienen un núcleo redondo y pálido, con un nucléolo pronunciado y algunos gránulos supranucleares densos. Columnas densas longitudinales habitan en la frontera entre las células principales adyacentes.

En la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, las células principales muestran una tinción moderada, núcleo de forma irregular, con un nucléolo prominente; estas células son cortas a comparación de aquellas que están en el segmento inicial. La región supranuclear contiene muchos gránulos densos, en donde la barrera típica de cepillo delinea su aspecto luminal. Se encuentran en las células epididimarias principales, gránulos densos esparcidos en la región basal. En el cuerpo del epidídimo cuerpos moderadamente densos llenan la región basal de estas células.

Las células estrechas, se encuentran exclusivamente en el segmento inicial del epidídimo, se identifican por su profunda tinción del citoplasma, núcleo denso elongado que está localizado en la parte alta de la mitad de la célula, y una base estrecha mal definida, que contacta la membrana basal.

Las células claras que se encuentran en la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo se identifican por una región apical altamente vacuolada y por la presencia de numerosos gránulos densos, por abajo y al lado del núcleo. La región basal es usualmente ocupada por cuerpos pálidos o moderadamente densos. El núcleo, variable en su posición, es redondo, de tinción pálida y muestra un núcleo prominente.

Las células basales, que se encuentran por todo el epidídimo, son células planas elongadas que están cerca de la base del epitelio en donde contactan la membrana basal. Tienen un núcleo elongado o esférico moderadamente denso, mostrando parches periféricos de cromatina condensada que están envueltas en un borde de citoplasma y se observa pálido porque se tiñe con dificultad (Sun y col 1980).

Las células con halo del epidídimo son similares a las del conducto eferente. Estas células están distribuidas a todos los niveles del epitelio epididimal y pueden ser

identificadas por un núcleo denso que muestra parches de cromatina condensada periférica englobada por citoplasma de pálido a teñido.

En la rata la célula principal estructuralmente vista como célula apical deriva de la célula definida por Sun y Flickinger (1979), como célula columnar. Esta célula columnar también da origen a las células basales. La conversión de las células columnares a principales y basales tiene lugar aproximadamente en el día 28 de vida. El otro tipo de célula importante en la rata inmadura (16-28 días) es la célula estrecha. Esta célula se mantiene en el segmento inicial de la rata adulta, pero para el resto del epidídimo ella da origen a las células claras.

Tanto las células columnares como las estrechas se derivan de las células de soporte indiferenciada, en el día 16 aproximadamente de vida.

La actividad proliferativa de las células principales y basales ha sido examinada por Clearmont y Flannery (1970). Ellos observaron que hay una declinación progresiva en los índices de mitosis y clasificación de células principales y basales en ratas de edad de 2.5, 4 y 12 meses. Estas observaciones permitieron a los autores sugerir que la población de células epididimarias (principales y basales), se expandían en animales adultos y que no se renovaban.

No hay un dato real de la distribución cuantitativa relativa de las diferentes células más importantes (principal, estrecha, clara, basal y halo); ya que se mueven de un segmento al siguiente en el epidídimo. Se realizaron estudios del epidídimo con glutaraldehído para determinar la distribución de las células. En el segmento inicial las células "principales" eran de un 80% del total de las células, mientras que las células basales contribuían a un 12% y células halo 5%, el resto 3% esta hecho por un tipo de célula encontrado solamente en esta región del epidídimo, que son las células "ESTRECHAS". Las células principales son muy altas en este segmento, ya que los diámetros tubulares y luminal son relativamente cortos (Reid y col 1957).

La distribución relativa de las células principales y basales se mantiene más o menos fija en la cabeza del epidídimo, sin embargo en esta región, en donde las células estrechas no se ven, las células claras (5%) son las primeras que se encuentran. El porcentaje aproximado de células halo se incrementa un 30%. Al comparar un corte longitudinal de la cabeza del epidídimo y del segmento inicial (VER FIGURA # 3), se ve aparentemente que el diámetro luminal de la cabeza se ha incrementado notablemente y la altura de las células principales se disminuye.

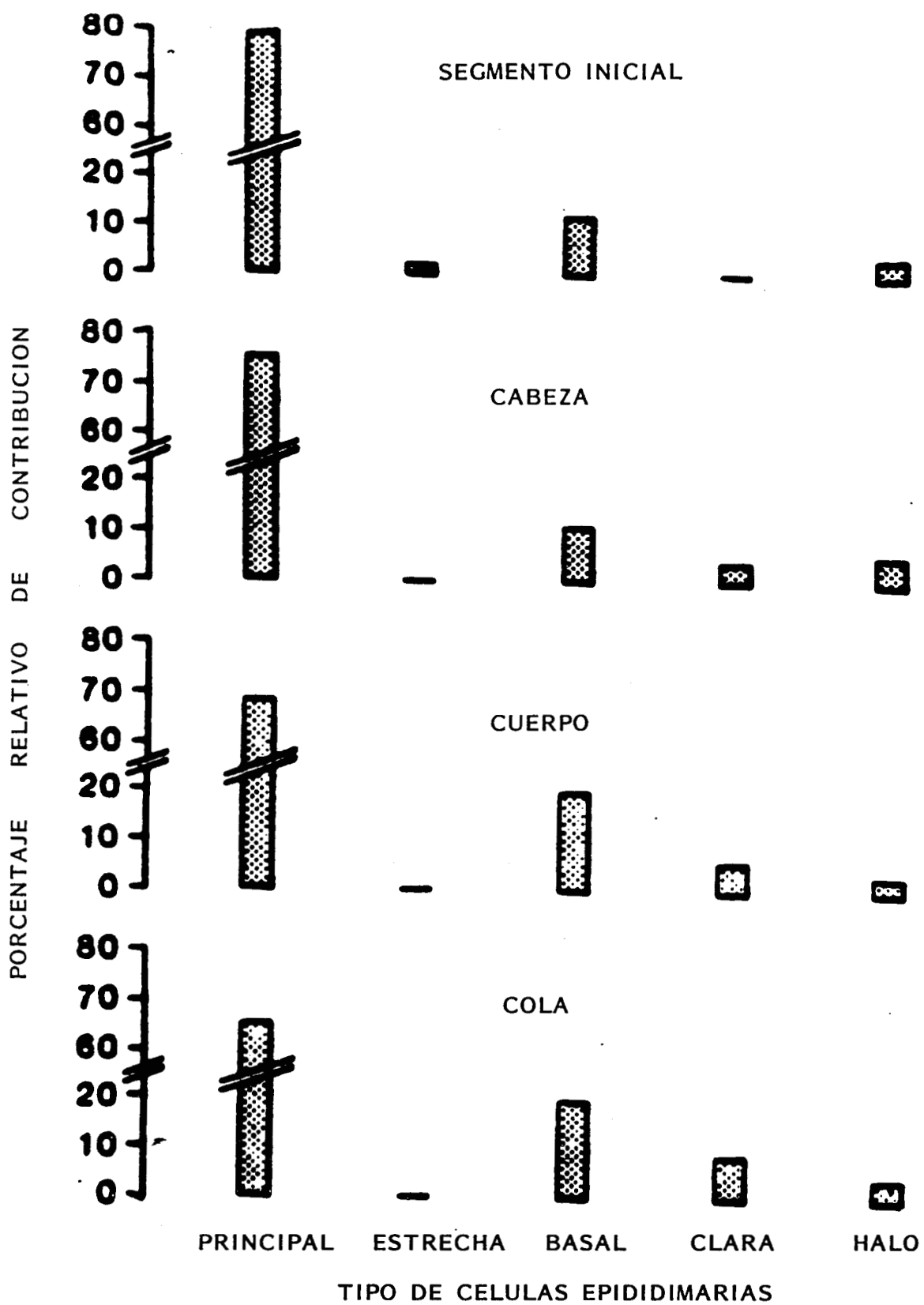


FIGURA # 3

En esta figura se muestra la concentración de las diferentes células que se encuentran en la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo. Se hizo un conteo de aproximadamente 1000 células en cada segmento y se determino el número relativo de células principales, estrechas, basales, claras y halo.

Como lo ha descrito Reid y Cleland el aumento en la densidad del contenido de espermatozoides en el lumen de la cabeza del epidídimo coincide con el incremento del diámetro luminal.

La contribución relativa de las células principales de el cuerpo del epidídimo declina al 69% mientras que la contribución de células basales incrementa un 21%. La contribución relativa de las células claras se incrementa en un 30% en el cuerpo, mientras que las células halo decrecen un 6.5% (cabeza) a 3.8 (en cuerpo). (Ver figura # 3)

Ninguna, ni la altura de la célula o el diámetro luminal cambia marcadamente conforme uno se mueve a través del cuerpo (Reid y col).

El número relativo de células basales o halo se ven más o menos idénticas conforme uno pasa de la cabeza a la cola. El nuevo decremento en la distribución de células principales en la cabeza se explica enteramente por un incremento de células claras, ya que éste número se aproxima al 10% (VER FIGURA # 3).

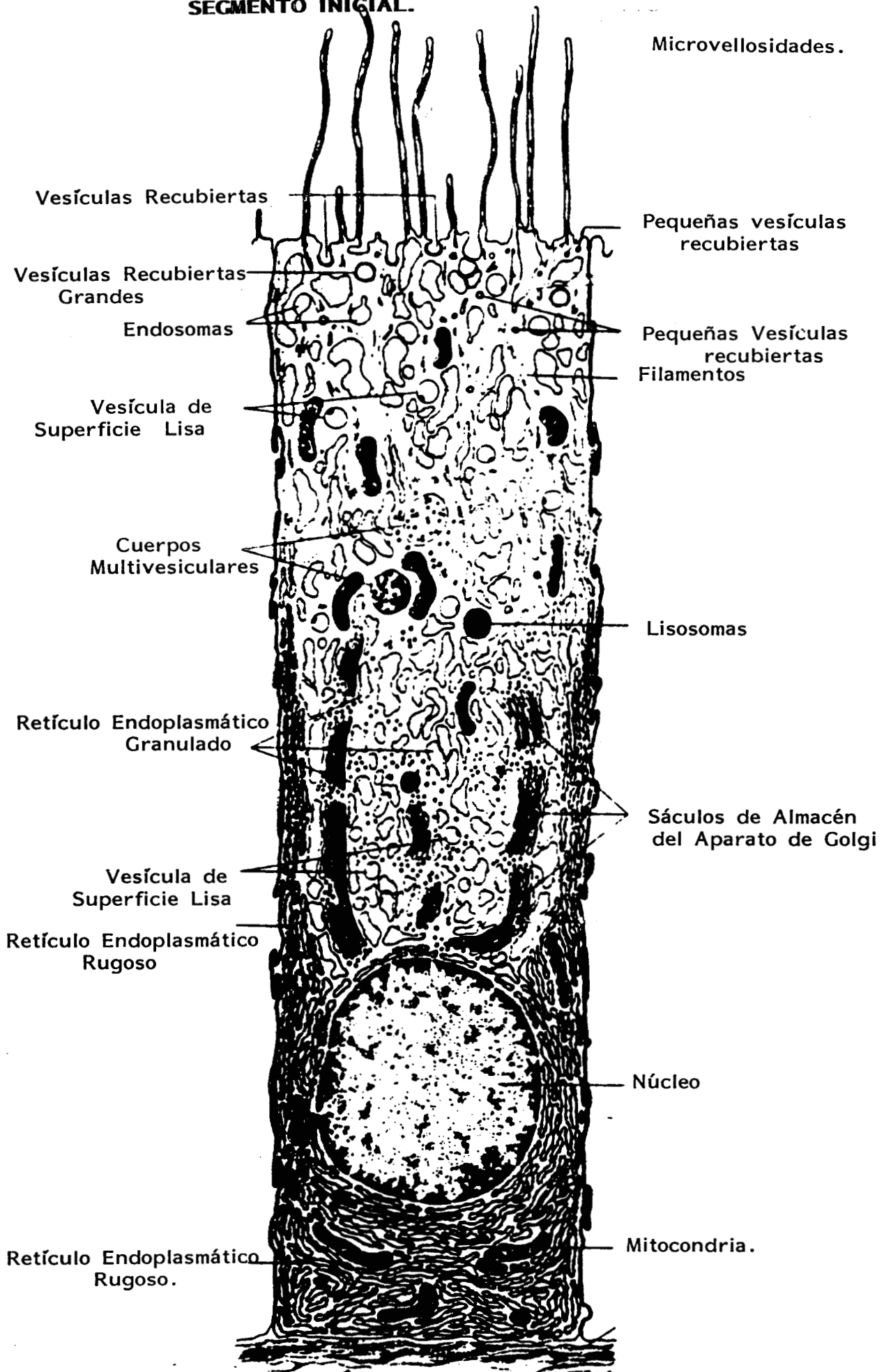
El diámetro tubular se incrementa sustancialmente entre la cabeza y la cola del epidídimo conforme a la densidad espermática (Reid y col. 1957). Utilizando técnicas de micropunción se ha demostrado que la densidad espermática incrementa cerca de 80 millones por ml a 1,950 millón por ml del rete testis a la cauda del epidídimo (Turner y col. 1984).

CELULAS PRINCIPALES:

Las células principales forman la columna alta del Segmento inicial del epidídimo. El aspecto de estas células ha sido descrito en varias especies. Una representación esquemática de las células principales del segmento inicial se muestra en la figura # 4.

En la región apical del epidídimo de la rata las células principales avanzan, dentro del lumen, cerca de las áreas de unión especializadas que contienen numerosos filamentos, microtúbulos, glicógeno y mitocondrias. Pozos profundos recubiertos o sin recubrir de membrana plasmática apical se pueden ver como base de microvellosidades, y subyacentemente a la superficie de la célula se pueden observar también elementos vesiculares recubiertos, grandes, esféricos o elongadas. También están presentes vesículas no recubiertas, largas y esféricas con cola (endosomas) (VER FIGURA # 5). Los túbulos apicales membranosos, no son abundantes, pero se ven también en la región apical. Varias vesículas recubiertas y no recubiertas son evidentes ya que tienen un diámetro aproximado de 50 - 60 nm.

FIGURA # 4: REPRESENTACION DIAGRAMATICA DE LA CELULA PRINCIPAL DEL SEGMENTO INICIAL.



Vesículas grandes que no están recubiertas (150 - 300 nm de diámetro), forman la llamada superficie vesicular lisa. Estas vesículas son visibles en número variable en la región apical y usualmente presentan una matriz electrónica lucente o una matriz que contiene un material fino fluculento, o parches de material electro denso usualmente adherido en el interior de la membrana.

El aspecto más eminente de la región apical es la presencia de numerosos elementos membranosos, largos, dilatados de forma irregular, conocidos como el retículo endoplasmático granulado diseminado (Hoffer 1973). Estos elementos presentan un lumen que contiene un material filamentosos fino; su superficie externa muestra ribosomas ocasionales.

Como lo ha mostrado Hoffer y col (1973), esta cisterna del retículo endoplasmático se puede ver frecuentemente en las cercanías proximales de la membrana plasmática apical en varios sitios (VER FIGURA # 4), sin embargo, puntos de continuidad entre estas dos estructuras no son observadas.

En la región supranuclear profunda, hace su aparición una cisterna aplanada larga del retículo endoplasmático rugoso, y que usualmente se ordena en línea paralela a lo largo de la membrana plasmática lateral. Cuerpos multivesiculares que muestran en su matriz una tinción pálida, moderada, o densa, también se ven en esta región; como a su vez un cuerpo de unión membranal grande, con un material homogéneo electro denso, identificados como lisosomas.

La utilización de marcadores, introducidos al lumen, han demostrado que estas células están relacionadas en la endocitosis. La ruta endocítica comprende pozos recubiertos, vesículas, cuerpos multivesiculares y lisosomas (Hoffer y col 1973).

El abundante aparato de Golgi, ocupa la parte baja de la región supranuclear. Se forma por varias cisternas apiladas que van paralelas a lo largo del eje de la célula y asociado con vesículas más pequeñas. Los sáculos o vesículas se apilan aproximadamente de 10 en 10 y se forman así las cisternas características que son similares a las que se presentan en las espermatídes.

La región basal de éstas células es ocupada por el núcleo e infranuclearmente se encuentran numerosas cisternas aplanadas de retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias, poliribosomas y algunos cuerpos densos identificados citoquímicamente como lisosomas. Las gotas lipídicas no son muy características en estas células (Herms y col 1986).

La habilidad de las células principales de tomar sustancias de la base no ha sido estudiada. Las vesículas y los pozos cubiertos o descubiertos, los endosomas o los cuerpos multivesiculares no se encuentran usualmente en ésta región.

En el segmento inicial del epidídimo se han identificado células con el núcleo en la parte apical y se conocen como células apicales. Observaciones morfológicas de estas células indican que éstas son idénticas en apariencia a sus vecinas las células principales. La descripción de las poblaciones separadas de las células apicales son simplemente acomodados topográficos de las células principales alrededor del ducto, (Reid y col 1957).

De varios tipos de células que se encuentran en el sistema de ductos del macho, el aspecto ultra estructural de las células principales de la cabeza, cuerpo, y cola del epidídimo han sido las más activamente investigadas por lo menos en los 10 últimos años desde Hamilton (1975).

Las células epiteliales principales de la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo son más cortas que aquellas que se encuentran en el segmento inicial; ya que tiene una amplia área de comunicación con el lumen.

La región apical de las células principales de estos tres segmentos muestran esencialmente la misma estructura en su forma. En esta región también se observan mitocondrias, filamentos, polisomas, microtúbulos, endosomas, cisternas de retículo endoplasmático, cuerpos multivesiculares pálidos.

Una de las mayores diferencias entre las células principales de la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo son los lisosomas. En la cabeza, estos cuerpos se reconocen por la presencia de un lumen pálido que contiene material fluculento. En el cuerpo contienen un material electro denso de forma homogénea. En la cola contienen material homogéneo denso-oscuro. Otra diferencia importante que se puede encontrar en estos tres segmentos es: En el cuerpo pero, no en los otros dos segmentos del epidídimo, se pueden ver gotas de lípidos en la región supranuclear (Robaire, Hermo 1988).

En la siguiente figura se muestra esquemáticamente una representación de la célula principal de la rata. (VER FIGURA # 5).

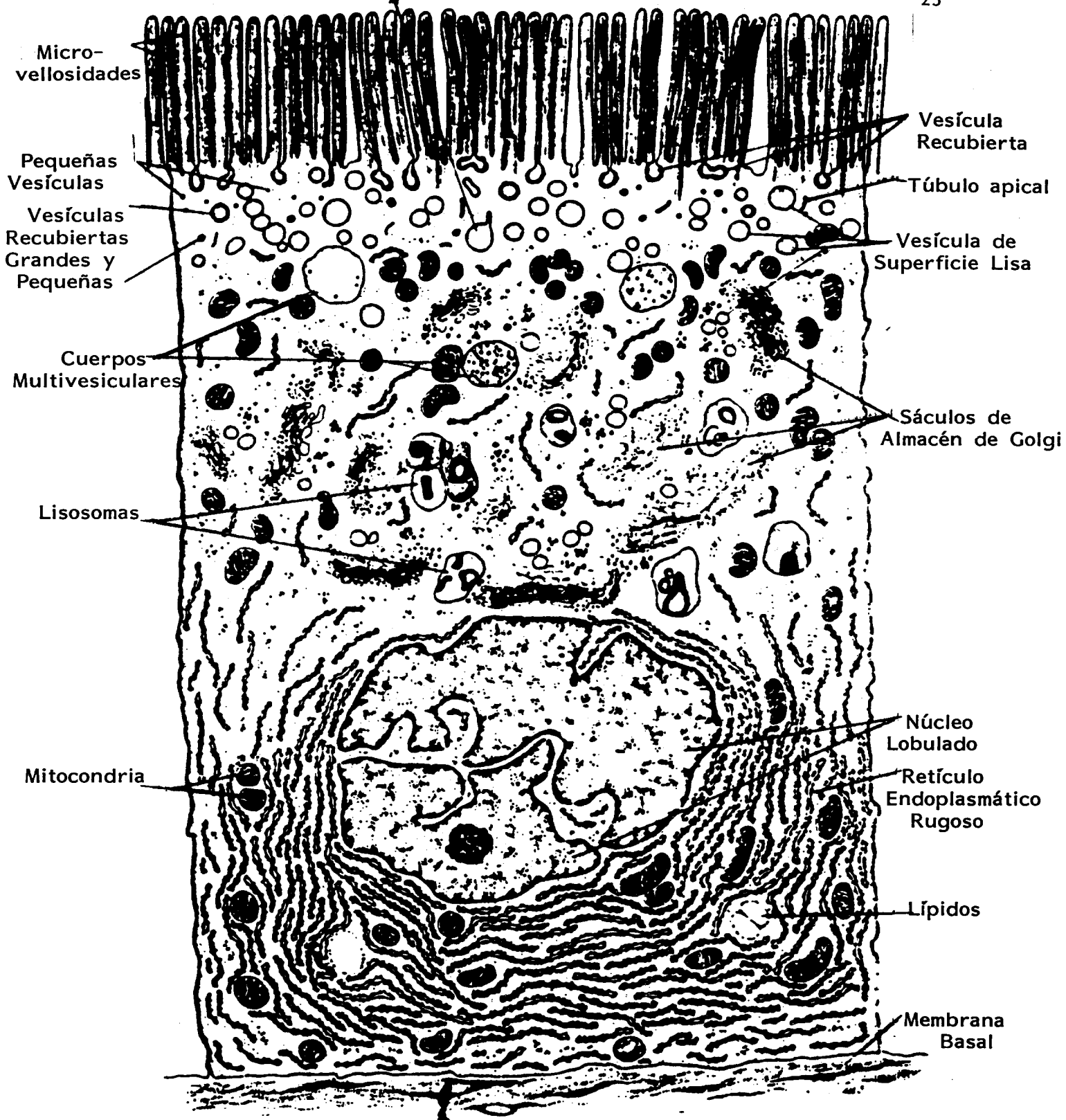


FIGURA # 5: REPRESENTACION DIAGRAMATICA DE LA CELULA PRINCIPAL DE LA CABEZA DEL EPIDIDIMO

Tomado de: "The Physiology of Reproduction"
Vol I. 1989.

CELULAS ESTRECHAS:

Las células estrechas del epidídimo son células columnares altas, siendo más estrechas aún que las células principales. Estas células se encuentran en el segmento inicial del epidídimo en especies como la rata, el ratón, y el hámster. Las células estrechas tienen un aspecto parecido con las llamadas células ricas en mitocondrias, descritas para otras especies y que se encuentran en diferentes segmentos del epidídimo (Robaire y col. 1988).

Sun y Flickinger (1980) han descrito estas células en la rata y se identifican por la presencia de una considerable cantidad de pequeñas vesículas no recubiertas en la región apical; contienen numerosas mitocondrias distribuidas por todo el citoplasma y unas cuantas cisternas del retículo endoplasmático rugoso. La función de las vesículas no ha sido bien esclarecida, sin embargo, se cree que están relacionadas con la endocitosis. Se ha reportado la presencia de vesículas de apariencia similar en las células de Leydig en donde a su vez se ha mostrado que están relacionadas con la función de endocitosis adsortiva.

Cuerpos multivesiculares que muestran una matriz de un pálido moderado o denso al teñirse, son también evidentes en la región supranuclear en compañía de algunos cuerpos densos de unión membranal que posiblemente son lisosomas. La función de endocitosis en estos cuerpos multivesiculares y cuerpos parecidos a lisosomas en las células estrechas no se ha podido comprobar.

El aparato de Golgi está formado por varias líneas de sáculos y vesículas asociados, dichas líneas se encuentran situadas en la región supranuclear y cerca del núcleo. En la región media citoplasmática se encuentran algunas cisternas de retículo endoplasmático rugoso, polisomas, y mitocondrias. Se pueden encontrar varios gránulos de glucógeno esparcidos en el citoplasma y que están casi siempre reunidos en grupos, lo cual sugiere que éstas células requieren una gran cantidad de energía. La diferencia entre las células precursoras y las células estrechas parece ser que son andrógeno-independientes, como se ha demostrado en cultivos de epidídimo de rata inmadura (Robaire, Hermo 1988).

Las células estrechas son las precursoras de las células claras. Los estudios morfológicos que se han realizado en éstas células no han permitido conocer su función.

CELULAS CLARAS:

También conocidas como células de luz o prominentes, se han identificado solo en la rata, el hámster y el ratón. En la rata, éstas células no se encuentran en el segmento inicial del epidídimo pero están presentes en la cabeza, el cuerpo y la cola, como también en el segmento proximal del conducto deferente.

Las células claras del epidídimo se caracterizan por tener una región apical que contiene numerosas vesículas pálidas de diferentes medidas; una región supranuclear grande empacada por una abundante cantidad de cuerpos densos, largos y teñidos, de varias formas ó tamaños. En la región basal se encuentra el núcleo y una cantidad variable de gotas lipídicas (Hamilton 1977).

Se encuentran microvellosidades que se extienden de la membrana plasmática apical, hacia el lumen (Hamilton 1977). Se ven en continuidad con la membrana plasmática pozos ó invaginaciones largas y que están recubiertas.

Después de aplicar una inyección con marcadores dentro del lumen de la cola del epidídimo, las vesículas apicales, y vacuolas de las células claras se encontraron marcadas; lo que indica una función endocítica para éstas células. Esta actividad endocítica es mucho mayor en las células claras que en las células principales adyacentes, particularmente en la cola del epidídimo (Robaire, Hermo. 1988).

CELULAS BASALES:

Estas se encuentran en todas las especies. Aparecen a lo largo de todo el sistema de conductos en el macho con la excepción de los conductos eferentes. En la rata las células basales son pequeñas, redondas o elongadas, muestran un núcleo largo y una cantidad pequeña de citoplasma.

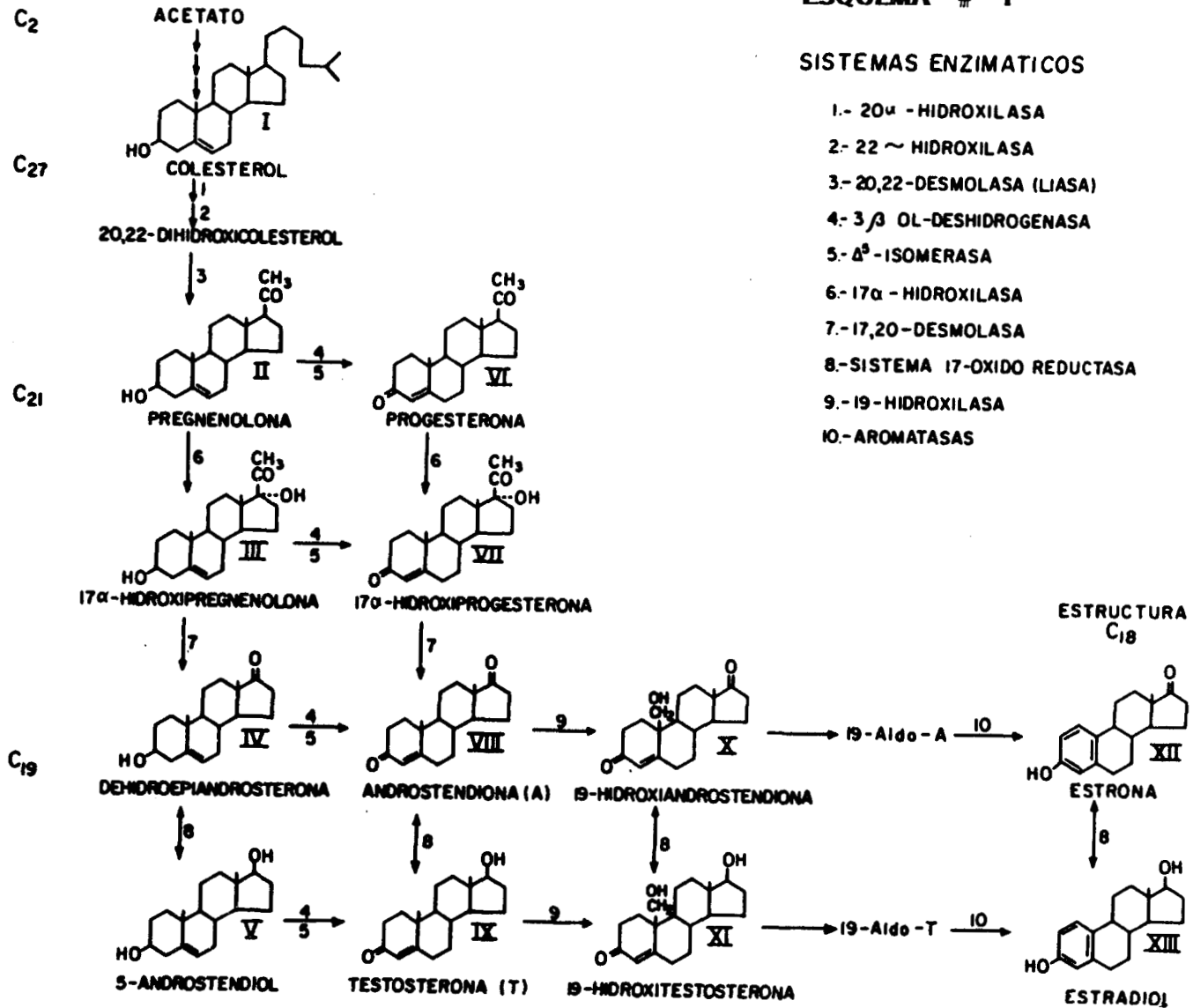
Estas células que no llegan a alcanzar el lumen, usualmente se ven entre las células principales adyacentes y la base del epitelio en donde tienen una extensa área de contacto con la membrana basal. Pueden encontrarse desmosomas entre las células principales y basales. El citoplasma que se encuentra alrededor del núcleo, contiene además del aparato de Golgi, mitocondrias, algunas cisternas del retículo endoplasmático rugoso, y unos cuantos lisosomas (Robaire, Hermo, 1988)(Hamilton y col. 1977).

2.2. SINTESIS DE ANDROGENOS:

La síntesis de andrógenos en las células de Leydig empieza con la movilización de colesterol que entra en forma de gotas lipídicas dentro del citoplasma. El colesterol es elevado dentro de la membrana mitocondrial en donde se convierte a pregnenolona (Hall P. 1989). La pregnenolona se mueve al compartimento microsomal y es atacado por enzimas para convertirse en un producto de 21 carbonos a 19 carbonos dando androstendiona o dehidroepiandrosterona (dependiendo la vía si es por delta 5 ó delta 4).

Finalmente androstendiona se convierte a testosterona por la 17 hidroxisteroide deshidrogenasa. Para la formación de estrógenos la testosterona se aromatiza por la influencia de aromatasas (Yen y Jaffe 1986 y Hall 1989). (Ver esquema # 1).

ESTRUCTURA



ESQUEMA # 1

SISTEMAS ENZIMATICOS

- 1.- 20 α - HIDROXILASA
- 2.- 22 ~ HIDROXILASA
- 3.- 20,22-DESMOLASA (LIASA)
- 4.- 3 β OL-DESHIDROGENASA
- 5.- Δ^5 -ISOMERASA
- 6.- 17 α - HIDROXILASA
- 7.- 17,20-DESMOLASA
- 8.- SISTEMA 17-OXIDO REDUCTASA
- 9.- 19-HIDROXILASA
- 10.- AROMATASAS

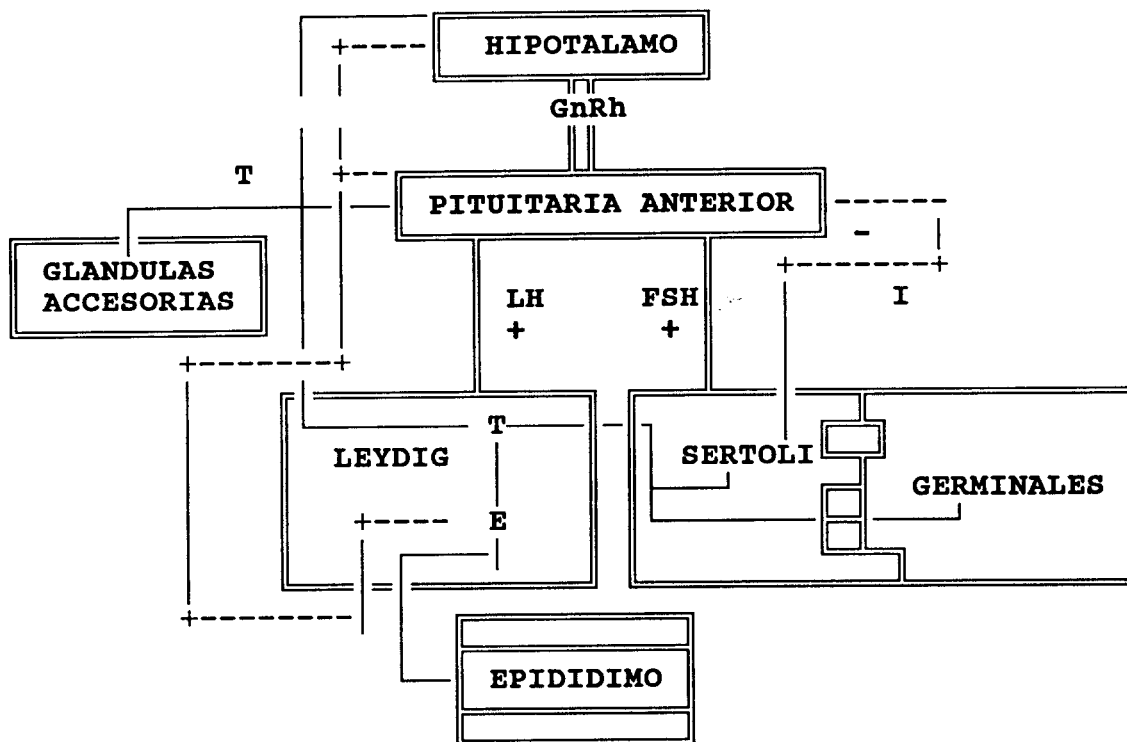
Principales vías de síntesis de las hormonas testiculares. Los números arábigos indican los sistemas enzimáticos involucrados en el proceso biosintético, y se enlistan en la parte derecha de la figura. Los nombres sistemáticos de las diferentes estructuras esteroideas (en números romanos) son: I.- 5-Colesten-3 β -ol; II.- 3 β -Hidroxi-5-pregnen-20-ona; III.- 17 α -Hidroxi-5-pregnen-20-ona; IV.- 3 β -Hidroxi-5-androsten-17-ona; V.- 5-Androsten-3 β , 17 β -diol; VI.- 4-Pregnen-3, 20-diona; VII.- 17 α -Hidroxi-4-pregnen-3, 20-diona; VIII.- 4-Androsten-3, 17-diona; IX.- 17 β -Hidroxi-4-androsten-3-ona; X.- 19-Hidroxi-4-androsten-3, 17-diona; XI.- 17 β , 19-Dihidroxi-4-androsten-3-ona; XII.- 3-Hidroxi-1, 3, 5 (10)-estratrien-17-ona; XIII.- 1, 3, 5 (10)-Estratrien-3,17 β -diol.

ORIGEN DE LOS ESTROGENOS EN LA SANGRE DEL MACHO.

Estrona y estradiol son los estrógenos importantes que circulan en la sangre del macho. Después de una orquiectomía, los niveles de ambos esteroides decrecen. Estas observaciones sugieren que el testículo secreta hormonas estrogénicas. Sin embargo, intentos de identificar estrona y estradiol en la sangre venosa espermiática indican que solo del 10 al 20% de estos esteroides son de origen gonadal. Similares cuantificaciones de estrógeno en sangre venosa adrenal sugieren que esta glándula endócrina puede aportar solo una pequeña porción de la cantidad total que se encuentra en la sangre. El origen de la mayor porción de estrógenos en sangre en el macho fue primeramente los estudios que se hicieron con hombres que padecían hipogonadismo y se les administró grandes dosis de testosterona desarrollando ginecomastia (Yen y Jaffe 1986).

Subsecuentemente se demostró que administración intravenosa de testosterona se convertía en estradiol, que entra de nuevo a la sangre. Muchos tejidos no-endócrinos se sabe que tienen el citocromo P-450 dependiente de aromatasas para la conversión de andrógenos a estrógenos, y todos los estudios al respecto en el cuerpo han demostrado que la mayor porción de estradiol y estrona en sangre en los machos normales y en el humano son derivados de la testosterona y androstendiona respectivamente, circulante (Yen y Jaffe 1986).

En la mayoría de los sistemas endócrinos del cuerpo, se cuenta con un dispositivo de seguridad interno, el sistema de **RETROALIMENTACION NEGATIVA**, que permite al producto regular la cantidad de hormona estimulante. Esto se puede explicar por medio del siguiente esquema que hace mas objetiva su visualización:



En éste esquema podemos apreciar los mecanismos de regulación endócrina del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. La estimulación positiva (+) de la GnRh secretada por el hipotálamo, causa la síntesis y secreción de LH y FSH por el lóbulo anterior de la hipófisis y estas dos estimularán respectivamente a la función de células de Leydig y Sertoli. La testosterona (T), producida por células de Sertoli y posiblemente tiene una acción directa sobre células germinales. Testosterona también estimula la función del epidídimo y glándulas accesorias sexuales. Una cantidad de Testosterona es convertida a estradiol (E^2) por aromatización, probablemente por células de Leydig y Sertoli, y ambas actuarán (T y E^2) en una forma negativa (-) hacia los principales centros nerviosos del hipotálamo y lóbulo anterior de hipófisis, para suprimir la secreción de GnRh, LH y FSH. Sertoli también produce inhibina (I), que actúa en lóbulo anterior de la glándula pituitaria para suprimir la secreción de FSH y la activina (Amann R. 1989).

Hay también otro sistema de regulación endócrina en el organismo y este consiste en la llamada "REGULACION DE RECEPTORES A LA BAJA". Este término se refiere a un decremento en el número de receptores en la superficie de las células de Leydig o de Sertoli y se cree que los receptores se internalizan pero no son degradados. Por lo que se ha encontrado que altas concentraciones de hormonas causan este fenómeno de regulación de su propia producción de receptores disminuyéndolos en las células blanco (Kevin y col. 1980).

El epidídimo es estrictamente andrógeno dependiente para el mantenimiento de su estructura como también para su actividad metabólica, secretora, reabsortiva y biosintética. Estos andrógenos son aportados por el testículo.

El resultado de la falta de influencia de andrógenos es la siguiente:

- a) Regresión general del epitelio epididimal.
- b) Reducción del diámetro del túbulo.
- c) Declinación rápida en el número de espermatozoos dentro de la cola.
- d) Cambios de composición del plasma epididimal.
- e) Degradación de los espermatozoos incapaces de madurar y muerte rápida.

La testosterona llega por tres vías al órgano:

- 1.- Sangre.
- 2.- Linfáticos.
- 3.- Semen testicular. ABP. (Hansson y col. 1975).

Al igual que en el testículo la testosterona se reduce para convertirse en un producto más activo que es la Dihidrotestosterona (DHT). Los receptores androgénicos se encuentran en mayor cantidad en cabeza y menos en cuerpo y cola. En adición también se tienen receptores a 17β estradiol (Younes 81).

Se ha demostrado que la proteína transportadora de andrógenos (ABP) y los andrógenos existen en altas concentraciones en el tejido y lumen de la cabeza del epidídimo. Estudios realizados por Turner y Roddy (1990); demuestran que aproximadamente un 71% de los andrógenos son capturados en la parte intraluminal por ABP en la cabeza del epidídimo. El ABP se produce en el testículo, es secretada al torrente sanguíneo y transportada al epidídimo. Danzo y col (1990); demuestran que la testosterona es el mayor regulador in vivo de la síntesis de ABP testicular.

153877

2.3. FUNCIONES DEL EPIDIDIMO

- 1.- Actúa como reservorio de espermatozoides
- 2.- Produce el plasma epididimal (medio de composición para espermatozoides)
- 3.- Promueve la maduración del espermatozoo.
- 4.- Mecanismo de eliminación de Espermatozoides adultos o células muertas (macrófagos) (Court 1983).

La parte inicial y media es donde se maduran los espermatozoides y la parte final o terminal es la región de almacén de los espermatozoides maduros para ser eyaculados o desechados en la orina (Court 1983).

PROPIEDADES DE REABSORCION:

El epitelio del epidídimo tiene una gran capacidad reabsortiva, el semen testicular es bastante diluido al llegar a la cabeza y ya desde esa zona se convierte en semen epididimal mas concentrado, reabsorbiendose hasta un 95% del líquido. Como parte de este proceso de condensación hay otros cambios fisicoquímicos que van a ocurrir como es la baja en su pH. En la rata el pH tiene una baja de 7.4 a 6.5 o 6.6, cambios que posiblemente son dados por la acción de la anhidrasa carbónica y el transporte de iones de hidrógeno y HCO_3 (Yamagimachi, 1988)

La habilidad de reabsorción del ducto epididimario es altamente selectiva y varía de un segmento a otro. Esto se puede ver claramente en el movimiento de iones como Na y K en particular, en donde el plasma testicular es caracterizado por concentraciones altas de Na y K lo contrario del plasma epididimal. Su osmolaridad se ve que es de 300 en suero de testículo pero en cabeza y cuerpo de 400 y cola de 300 aproximadamente. El cloro es otro ejemplo claro ya que se encuentra en líquido seminal en la misma concentración de suero sanguíneo sin embargo en cabeza, cuerpo y cola del epidídimo esta totalmente diferente en las distintas regiones anatómicas del epidídimo. Siendo lo mismo con el fósforo.

Turner y col (1990) determinaron el movimiento de fluido en el lumen del epidídimo de la rata midiéndolo en cuatro diferentes regiones. El flujo más rápido ocurre en la parte proximal de la cabeza del epidídimo que es de 18.5 ± 3.7 mm/hr. y el flujo más lento es en la parte distal de la cola que es de 2.5 ± 0.5 mm/hr.

MADURACION EPIDIDIMAL DEL ESPERMATOZOO.

La maduración se considera como la última etapa de la espermiogénesis y se define según Rosado y Hernández (1988), como: "Proceso complejo que se inicia durante el tránsito del espermatozoo por el epidídimo, continúa después de la eyaculación y finalmente confiere al espermatozoo su capacidad funcional, movilidad y capacidad fertilizante, sin la cual no es capaz de fecundar al ovocito".

El espermatozoo que se encuentra en el testículo de los mamíferos no es capaz de fertilizar al óvulo. Esta habilidad le es conferida al pasar lentamente a través de todo el epidídimo; proceso conocido como "**MADURACION EPIDIDIMAL**" (Orgebin-Crist 1981).

El sitio en donde el espermatozoo empieza a adquirir su capacidad fertilizante varía de una especie a otra. En algunas especies (verraco), es en el segmento distal de la cabeza, mientras que en otros (rata), es en la parte distal del cuerpo del epidídimo (M. Court 1983). En general Court considera que en la cabeza y cuerpo se lleva a cabo la maduración y la cola funciona como depósito. (VER FIGURA #6)

Tampoco todos los espermatozoo adquieren su capacidad fertilizadora simultáneamente. Algunos aparentemente están fértiles mucho más rápido o en la región más proximal del epidídimo que otros. Sin embargo como regla general, no es sino hasta que entra a la cola del mismo, en donde la gran mayoría de los espermatozoo tienen su potencial fertilizante completo (Yanagimachi 1988).

AMP cíclico y AMP dependiente de proteína Kinasa se cree que están involucradas en la regulación esencial de las funciones del espermatozoo como son: movilidad, maduración epididimal, capacitación y reacción acrosomal (Oyen y col 1990).

MADURACION DE LOS ESPERMATOZOIDES EN EL EPIDIDIMO

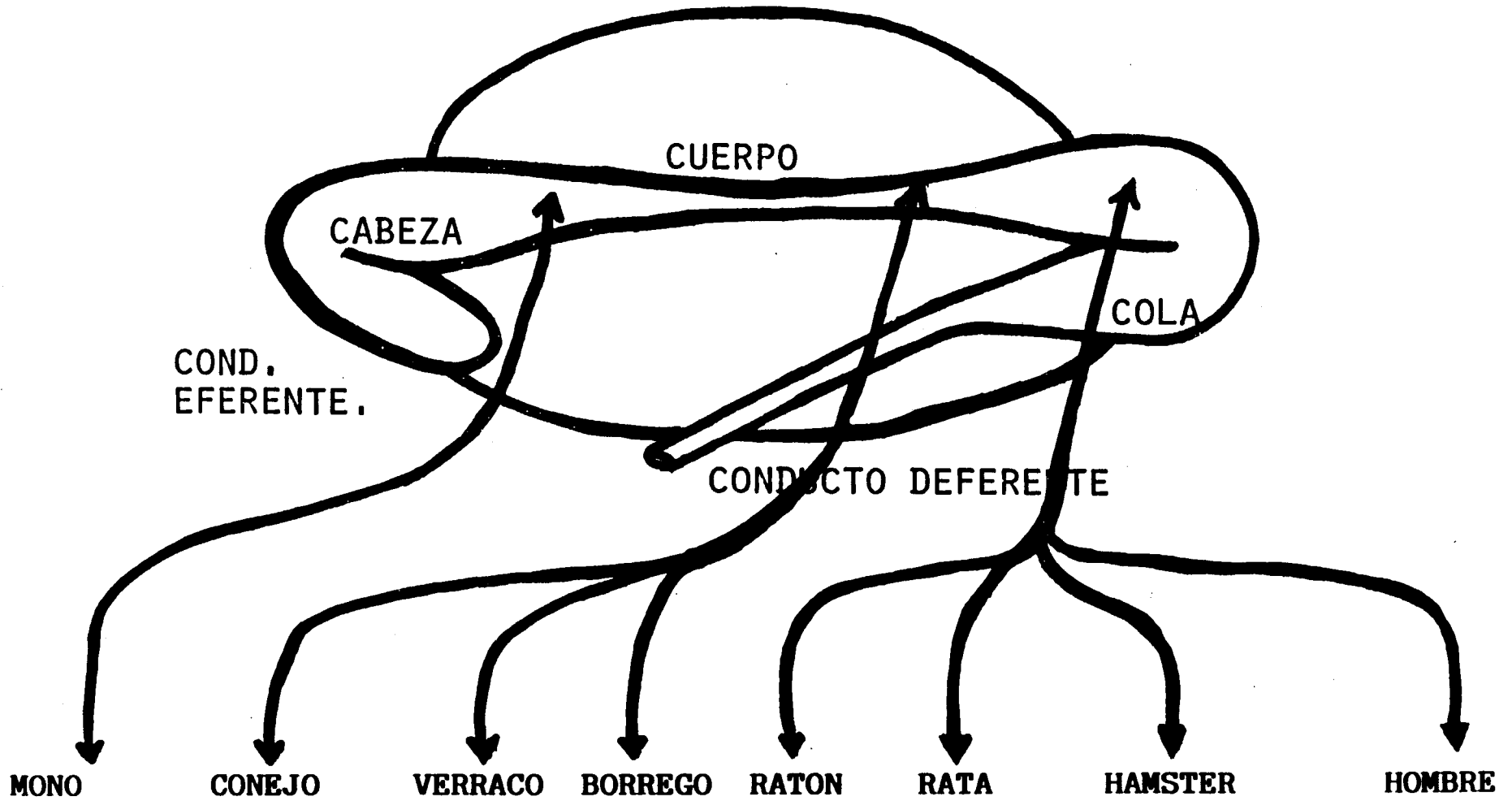


FIGURA # 6

M. COUROT "THE MALE IN FARM ANIMAL REPRODUC'
1983.

CAMBIOS DEL ESPERMATOZOO EN EL EPIDIDIMO:

- a) Se agrega glicoproteínas específicas, sustancias orgánicas. glicerilfosforilcolina y carnitina. (Eddy y col 1985; Yanagimachi 1988).
- b) Formación de una capa membranal formada por la adsorción de proteínas de plasma seminal (Yanagimachi 1988).
- c) Migración de la gota citoplasmática. (enzimas lisosómicas) (Rosado, Hernández 1988).
- d) Maduración de algunos componentes intracelulares (acrosoma, núcleo y flagelo) (Rosado, Hernández 1988).
- e) Aumento de puentes de disulfuro. SH a S-S. Dando una estructura más rígida. Rigidez al flagelo para sus microfibrillas y mayor movilidad (Bedford, Calvin 1974).

Uno de los cambios más prominentes en el espermatozoo durante su paso por el epidídimo, es la habilidad a adquirir su movimiento progresivo, sirviéndole la cola del mismo como locomoción. El espermatozoo testicular no tiene movilidad o su movilidad es muy débil. Esto es cierto no solo dentro del testículo sino cuando estos son suspendidos en solución salina fisiológica. Espermatozoo maduros obtenidos de la cola, inician su actividad con movimientos progresivos al ponerlos en la solución salina fisiológica, mientras que los de cabeza tendrán movimientos lentos y solamente de la parte distal de la cola del espermatozoo dando movimientos sin sentido o circulares (Mohri, Yanagimachi 1980).

La inhabilidad de movimiento del espermatozoo testicular es probablemente o en parte por la inmadurez de su membrana plasmática.

Durante su paso por el epidídimo el espermatozoide estará en contacto con varias sustancias, como proteínas, carnitina y glicerofosfocolina que vienen del fluido epididimario (Yanagimachi 1988). Se cree que esto es muy importante para el desarrollo del espermatozoide y su habilidad de movimiento (Yanagimachi 1988).

En algunas especies la morfología y la estructura del acrosoma cambia durante la maduración epididimal (cobayo). La morfología del núcleo no cambia dramáticamente durante la maduración, pero su cromatina se estabiliza por uniones disulfúricas. Los componentes de la cola (ej. fibras y vaina), también se estabilizan con uniones S-S durante la maduración. (Bedford, Calvin, 1973).

Los cambios estructurales de la membrana plasmática del espermatozoide se puede explicar, en parte, por el cambio de estructura terciaria de las proteínas membranales de alfa hélice a beta hoja de lámina.

Como se mencionó el epidídimo tiene una alta actividad de absorber y secretar fluidos. La osmolaridad y la composición química del fluido secretado por epidídimo varia de un segmento a otro (D'Addario, Turner, Howards. 1980); por lo tanto se esperaría que la membrana plasmática del espermatozoide expuesta al fluido epididimal se altere paso a paso según en el segmento que se encuentre. No hay duda que la membrana plasmática sea uno de los lugares de mayor modificación durante la maduración. Este cambio va a incrementar la habilidad de la cabeza del espermatozoide para poderse adherir a la zona pelúcida después de pasar por la cola del epidídimo.

La membrana plasmática del espermatozoo ha sido recubierta con varias macromoléculas (antígenos), cuando deja el testículo; éstas al pasar por el epidídimo pueden absorberse, alterarse o perderse y nuevas macromoléculas se integran a la membrana plasmática (Eddy y col 1985). Las principales son las **GLICOPROTEINAS**. La alteración en las características de las enzimas preexistentes y la ganancia de nuevas proteínas de la membrana plasmática del esperma, son mediadas por lo menos en parte, por enzimas como la galactosiltransferasa y la sialitransferasa presentes en el fluido epididimario, como también la alpha-lactoalbúmina que regula la glicosilación de glicoproteínas en la superficie del esperma (Hamilton y col 1980). La síntesis y secreción de varias glicoproteínas por el testículo y las diferentes regiones del epidídimo, así como la integración de éstas glicoproteínas sobre o dentro de las diferentes regiones de la membrana plasmática del espermatozoide esta bien documentada (Yanagimachi 1988; Hammerstedt 1982).

El cambio de la habilidad de unión-lectina de la membrana plasmática del espermatozoo durante la maduración epididimal indica que ciertos residuos sacáridos terminales de las glicoproteínas de la membrana del espermatozoide están alterados, cubiertos o adicionados durante la maduración (Hammerstedt 1982).

Estos cambios le confieren a la membrana citoplasmática las siguientes características:

- 1.- Maduración de la membrana.
- 2.- Mas estabilidad.
- 3.- Cambio de permeabilidad.
- 4.- Aparecen microtúbulos.
- 5.- Cambia el espermatozoide de carga neta superficial.

Las glicoproteínas no son las únicas moléculas membranales que cambian durante la maduración, los lípidos membranales también tienen cambios en sus características físicas y químicas. El hecho de que el epidídimo tenga una alta actividad de síntesis de colesterol, especialmente en su parte del cuerpo, sugiere que el colesterol es una de la moléculas lipídicas que se integran a la membrana plasmática durante la maduración (Schlegel 1984).

El cambio en la distribución del patrón de partículas protéicas (glicoproteínas) en la membrana plasmática durante la maduración parece ser el reflejo de las alteraciones químicas en ambas moléculas (proteínas y lípidos) de la membrana plasmática del esperma.

Las ratas se consideran en pubertad a los 50 días de edad cuando los espermatozoides son encontrados por primera vez en la cola del epidídimo (Robb 1978).

La producción espermática/g. de testículo incrementa hasta 75 días de edad y el peso del testículo se incrementa hasta los 100 a 125 días, por lo tanto las ratas Wistar no están sexualmente maduras sino hasta los 100 días de edad. Se han probado ratas sexualmente maduras con un peso testicular de 3.7g las cuales producen 86×10^6 espermatozoides o 24×10^6 espermatozoides diarios, por gramos de parénquima testicular. Sus par de epidídimos contienen 295×10^6 espermatozoides en cabeza-cuerpo y 440×10^6 en cola.

Producción diaria de espermatozoides por testículo es de 23.7×10^6 (+ - 2).

Por rata es de 85.5×10^6

Reserva de Cabeza y cuerpo de epidídimo. 295×10^6

Cola 440×10^6 (Robb, Amman y Killian 1978).

TRANSPORTE DEL ESPERMATOZOIDE POR EL CONDUCTO EPIDIDIMARIO:

Se requiere de determinado tiempo para que el espermatozoo pase a través del epidídimo y madure; éste tiempo se puede medir marcando el DNA de las células germinales con timidina ^{32}P o H^3 para seguir así la progresión del espermatozoo marcado a través del epidídimo por autoradiografía o bien midiendo la radioactividad.

La duración del tránsito de cada segmento esta dada por la diferencia entre la llegada del primer espermatozoo marcado en la cabeza y su presencia en cada segmento (cabeza, cuerpo y cola), mientras la duración del transito es proporcional a el tamaño de la reserva en cada segmento (Orgebin-Crist, 1962). Finalmente se puede también calcular dividiendo el número de espermatozoos dentro de cada segmento por producción espermática diaria del testículo que provee estos espermatozoides (Swierstra, 1971). Sin embargo lo largo del ducto epididimario es variable dependiendo de cada especie pero, el tiempo de tránsito es muy parecido, aproximadamente de 10 a 12 días (Ver tabla # 1). El proceso de maduración tiene lugar de tres a cinco días (cabeza y cuerpo) en casi todas las especies, con la excepción del hombre.

T A B L A # 1

**DURACION DEL PASO DE LOS ESPERMATOZOIDES
EN EL DUCTO EPIDIDIMARIO EN MAMIFEROS.**

ESPECIES	TIEMPO DE TRANSITO EN DIAS			REFERENCIAS
	EPIDIDIMO COMPLETO	CABEZA CUERPO	COLA	
VERRACO	14.0 10.2	5.0	9.0	SINGH 1962* Swierstra 68*
TORO	8.0-11.0 9.0-12.0	4.0	5.0-7.0	Orgebin 1961* Koefoed 61*
COYOTE	14.0			Kennelly 72*
HAMSTER	15.6	2.0	13.6	Amann 76*
CONEJO	9.0-10.0 7.0-11.0 8.0-10.0 12.7	4.0 3.0	5.0-6.0 9.7	Orgebin65* Amann 65* Swierstra 65* Amann 76**
BORREGO	11.0-13.0	4.0	7.0-9.0	Ortavant 59* Amir 68*
RATA	8.4	3.4 6.0	5.0	Robb 78** Dyson 72*
RATON	9.7 8.7	3.9 3.1	5.8 5.6	Meistrich 75* Meistrich 75**
MONO	10.5	4.9	5.6	Amann 76**
HUMANO	5.5	1.8	3.7	Amann 81**

* Calculado por transporte de espermatozoo marcado.

** Calculado por reservas espermáticas.

Tomado: Courot M. 1984

La fuerza principal para el paso de los espermatozoides a lo largo del ducto epididimario es de origen neuromuscular y depende de contracciones rítmicas espontáneas del ducto, que a su vez son dependientes de la presencia de andrógenos; en ratas orquidectomizadas las contracciones espontáneas del ducto cesan a menos que los animales sean tratados con testosterona. La cola es particularmente bien dotada de nervios adrenérgicos, la denervación del órgano inhibe las contracciones espontáneas, mientras que catecolaminas y oxitocinas ejercen efecto estimulador (Fawcett 1991). En ratas y conejos la reducción en la liberación de oxitocina por la neurohipófisis da como resultado una disminución en la salida de espermatozoides en el semen eyaculado.

CAMBIOS MORFOLOGICOS DEL ESPERMATOZOO EN EL PASO POR EL EPIDIDIMO

Observaciones directas en microscopio electrónico muestran que durante la maduración ocurren cambios en la cara citoplasmática de la membrana, dentro del plano de la membrana y en la cara externa de la misma. En la parte proximal de la cabeza en epidídimo de rata un material fluculento llena el espacio entre la membrana plasmática y la parte externa de la membrana acrosomal (Suzuki y Nagano 1980). Esto desaparece en la parte más distal del segmento del epidídimo.

La criofractura muestra una extensiva distribución de partículas intramembranas en la membrana plasmática cubriendo el acrosoma (Suzuki y Nagano 1980). Las partículas están casualmente distribuidas en la membrana plasmática del espermatozoo de la parte proximal de la cabeza. En espermatozoos de la parte distal de la cabeza y parte proximal del cuerpo, las partículas se segregan en placas de varios tamaños. El cúmulo de placas de la partículas desaparecen en el espermatozoo de la parte proximal de la cola del epidídimo, en donde las partículas son distribuidas en forma casual. Estos cambios se ven solo en la membrana acrosomal y no en otras regiones de la superficie del esperma de rata.

Un material parecido a glicocalis se acumula en la parte más externa de la membrana distal de espermatozoo de la parte distal de la cabeza (Suzuki y Nagano 1980). Están distribuido en forma de parches, remanencias del arreglo en forma de placa de las partículas intramembranas que se vieron en las preparaciones de criofractura. En la región proximal de la cola éste material glicocálico, empieza a desprenderse de la superficie del esperma y no ésta ya presente en la superficie del espermatozoo de la parte distal de la cauda.

Los cambios coincidentes en la distribución del glicocalis y las partículas intramembranas exalta la posibilidad que la unión de componentes de la membrana externa puede cambiar la organización estructural dentro de la membrana. La finalización de estos cambios en la membrana coinciden cerca con la adquisición de la habilidad fertilizadora en la rata. (Courot 1983).

Los cambios ocurridos en el exterior de la superficie de la membrana plasmática del esperma han recibido gran atención porque ellos parecen reflejar las contribuciones del medio epididimal en el cual el desarrollo de la movilidad y habilidad de fertilizar son dependientes (Courot 1983).

Orgebin-Crist (1981), muestran la posibilidad de que el zinc es necesario para la formación normal del flagelo durante la fase tardía de la espermiogénesis. Ellos mostraron que la falta de zinc producía anomalías ultraestructurales en el flagelo de la rata, y también tiene un efecto en la coordinación de la movilidad progresiva durante la maduración epididimal.

Actualmente está bien establecido que el espermatozoo de mamífero gradualmente adquiere su movilidad y capacidad fertilizante mientras va pasando a través del epidídimo y que algunos cambios necesarios para que se expresen su habilidad de movimiento y capacidad fertilizante son dependientes del medio epididimal. Sin embargo, todavía no se conoce bien el mecanismo que requiere para el desarrollo de la movilidad y habilidad fertilizante, en la interacción del espermatozoo y los componentes de el medio epididimal, o su significado funcional de muchos de los cambios de maduración que ocurren durante del tránsito epididimario. La maduración en el tracto genital masculino y la capacitación en el tracto genital femenino puede verse como una sucesión de cambios que le permiten la interacción exitosa del espermatozoide con el óvulo en el sitio de la fertilización. Recientes estudios pueden enseñarnos que el proceso de fertilización en invertebrados y vertebrados marca una interacción del gameto involucrando a complejos sistemas de comunicación bioquímica que alteran la movilidad, metabolismo y estructura membranal del espermatozoo y los hace capaces para responder a las señales bioquímicas emanadas por el medio del tracto femenino y el huevo (Court 1983).

Durante varios años se ha trabajado duramente en la investigación de posibles anticonceptivos para el hombre. En un principio en la década de los 60's empezaron a elucidar cual era la función de las hormonas esteroides sobre las gónadas, espermatogénesis, y glándulas accesorias (Clermont y Harvey 1967; Lacy y Lofts 1965)

153877

Para la década de los 70's ya se tenía claro cual era su síntesis función y retroalimentación de los esteroides en el aparato reproductor del macho y empieza haber un interés por los anticonceptivos autores como Lacy 1973, Ewing y col 1977; Robaire, Ewing, Irby, Desjardins 1979; por citar algunos.

En éstos días se sabe que la administración de dosis bajas de testosterona a ratas machos intactos da como consecuencia la baja en la espermatogénesis y también la disminución de los títulos de LH en sangre sin influenciar los niveles o pesos de las glándulas accesorias (vesícula seminal, próstata). En contraste la administración de dosis altas de testosterona regresa la espermatogénesis, incrementa la testosterona en el suero y proporcionalmente incrementa las glándulas accesorias sin incrementar LH en suero (Robaire y col. 1979).

Un gran número de estudios se han efectuado sobre el efecto de 17 β estradiol en la rata macho adulta; y es claro que el 17 β estradiol es un potente inhibidor de la liberación de gonadotropinas. Swerdloff y Walsh (1973), Van Beurden y col (1977) y otros han concluido que la regresión que se observa en el tracto reproductor masculino de la rata después del tratamiento con el estradiol es únicamente por su potencial de inhibición de liberación de gonadotropinas.

Otros autores como Sivella y col (1978), Steinberg y col. (1978), han presentado evidencias de que hay un efecto directo del 17 β estradiol sobre el testículo. Esto también depende de la dosis, régimen y ruta de administración del estradiol difiriendo marcadamente en la mayoría de éstos estudios.

El uso de combinaciones de testosterona y estradiol se ha propuesto como método de anticoncepción para el macho ya que Ewin y Robaire (1979), demostraron que actúan sinérgicamente para inhibir la espermatogénesis y decrementar la fertilidad en la rata macho adulta.

Robaire y col (1984); han propuesto la relación entre el incremento de dosis de testosterona, decremento de espermatogénesis, decremento de la fertilidad y el efecto de la progeñe. Una reducción en reservas de esperma epididimal de la cola a menos de 5 millones no era determinante para producir fertilidad.

Las dosis bajas de estradiol que se han propuesto como formulación anticonceptiva, 240 ng/día/animal aproximadamente por Robaire y col (1987), resultan los niveles de estradiol en suero, no significativos o que difiera de aquellos encontrados en machos no tratados; a estas dosis pocos efectos significativos en el sistema reproductor del macho han sido reportados.

Sin embargo en dosis altas de estrógenos se ha visto que afectan la fertilidad del macho (Rao y Chinoy 1983) e inhibe la espermatogénesis (Robaire y col 1979; Oko y col 1984); reduce los pesos y funciones de las glándulas accesorias (Oko y col. 1984); reduce el comportamiento sexual del macho y causa ginecomastia (Brigs y Brigs 1974).

Robaire y col.(1987), han reportado que dosis de estradiol usando en formulación de anticonceptivo (1mm en cápsulas de implantes de polidimetil siloxana de 240 ng/día/rata), aún en tratamientos largos, no afecta significativamente ningún parámetro del sistema reproductor del macho, fertilidad o progenie. A dosis altas de estradiol (arriba de los 1680 ng/día/rata), las reservas espermáticas del epidídimo en su cauda y su comportamiento sexual medido por el número de tapones seminales se ve disminuido.

Dichos investigadores reportan en éste mismo artículo que el peso de las ratas que fueron implantadas con cápsulas de silastic de 1mm de estradiol, casi no bajaron de peso en comparación a las testigos que en un período de 18 semanas aumentaron un 45%. Sin embargo con dosis de 3mm. y 7mm. de estradiol en cápsulas de silastic, el peso ganado fue notoriamente decrementado durante las 18 semanas a solo 12% - 13% de peso inicial.

En dosis bajas, el estradiol (1mm) no causó cambios significativos en los pesos de las glándulas accesorias o pituitaria que son andrógeno dependientes. Esta dosis de estradiol tampoco dio un incremento de concentraciones de estradiol en suero o un decremento de concentraciones de testosterona en suero.

Con dosis más altas de estradiol, hubo una reducción significativa así como también en el peso de los tejidos que reflejan una actividad biológica de éste esteroide. Las dos dosis más altas (3mm y 7mm) mostraron un incremento poco significativo en la concentración de estradiol en suero. Es interesante notar, que con estas dos dosis altas de estradiol, hay un incremento marcado en el peso de la pituitaria (doblando del 1 a 3mm de implante).

Así mismo se vio en este experimento (Robaire y col 1989) que ninguna de las dosis de estradiol usadas resultan tener un efecto significativo en el peso testicular o contenido testicular de espermátides o espermatozoos condensados (producción espermática). El peso de la cabeza y cuerpo del epidídimo y sus reservas espermáticas también se encontraron sin alteración por el tratamiento de estradiol. La dosis más baja (1mm) tampoco tuvo efecto en el peso y reservas espermáticas de la cauda o cola del epidídimo. En contraste las dos dosis altas (3mm y 7mm) de estradiol si causaron un decremento significativo en el peso y reservas espermáticas de la cola del epidídimo.

Tan es así que en dosis de implante de 7mm. hubo decremento de un 40% en el peso del epidídimo y mas de 50% el decremento de reservas espermáticas. Así mismo ellos concluyen diciendo que aún no se conoce el mecanismo exacto por el cual estradiol modula la ganancia de peso en la rata adulta macho. Pero se sabe que efectos de estradiol no son simplemente mediados por supresores de el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, sino más bien es directo o mediado por algún otro mecanismo.

Como se mencionó antes ellos vieron un incremento en el peso de la pituitaria en implantes de 3mm. y 7mm. y esto lo atribuyen a observaciones ya establecidas que estradiol causa un incremento significativo en lactotropos y debido a su predominancia da como resultado el incremento de peso en la hipófisis.

Otro dato interesante que reportan es la observación de una alta incidencia de espermatozoides epididimarios tratados con estradiol decapitados. El mecanismo de la decapitación no se la explican pero obviamente lo atribuyen a la acción de los estrógenos en ésta zona.

H I P O T E S I S

La regulación de la función del epidídimo se realiza por mecanismos diferentes en las distintas regiones del órgano. En particular se regulan independientemente las funciones de la cabeza y de la cola.

O B J E T I V O S

Investigar la acción diferencial de los estrógenos sobre los tres diferentes segmentos anatómicos del epidídimo.

Hacer estudios histológicos para observar los cambios que se den por la acción de los implantes de estrógenos en las diferentes partes del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola).

Evaluar el efecto dosis dependiente del 17 β estradiol sobre: peso vivo y peso de las distintas partes que integran el aparato reproductor del macho.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO:

Se utilizaron 50 ratas macho, raza Wistar de 300 a 350g. como rango de peso; aproximadamente 3 meses de edad, criadas en el Bioterio de la "Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco".

Se colocaron en grupos de 3 animales y se marcaron con el sistema de muesca en la oreja.

ALIMENTACION: Nutricubos de Purina ad. libitum.
 Agua ad. libitum desinfectada con
 Microdyn (Plata coloidal estable 0.32%);
 una gota.

FOTOPERIODO: 14 horas luz/ 10 oscuridad.
 Temperatura controlada a 21°C.

ALOJAMIENTO DE LOS ANIMALES: Jaula de acrílico transparente, tamaño jumbo (53 x 43 x 20) de 2279 cm², con tapa de alambre galvanizado; bebedero de vidrio de 500 ml.; tapón de hule de #7; tubo de acero inoxidable; cama de viruta de madera.

5.2. IMPLANTES:

Se utilizó tubo de polidimetil-siloxana con medidas de:
 Diámetro interno 1.98 mm.
 Diámetro externo 3.18 mm. (Dow Corning PDS 602-305; Midland)
 Pegamento silástico médico (Medical adhesive silicone type Dow Corning # 891)
 17β estradiol (steraloids, Wilton, NH).

METODO:

El tubo de polidimetil-siloxana se recortó en tres longitudes diferentes; 1mm, 3mm, 7mm, utilizando un vernier. Una vez cortado se llenaron con 17β estradiol en polvo hasta el tope y se sellaron con pegamento médico silástico para dar una liberación de 0.24 µg/mm/día (Robaire y col 1979). Se realizó el mismo sellado a los tubos vacíos de 1mm, 3mm y 7mm para implante de los grupos control, según técnica de Stratton (1973); Robaire y col (1979).

IMPLANTACION:

Las ratas se dividieron en 8 grupos de seis ratas cada uno; 4 grupos para el tratamiento durante seis semanas y los otros cuatro para el tratamiento de 12 semanas:

- 1º. grupo testigo
- 2º grupo 1mm.
- 3º. grupo 3mm.
- 4º. grupo 7mm.

Se pesaron las ratas (báscula de canasta OHAUS) y se anestesiaron con éter etílico (Baker) en una cámara de gas, se les recortó el pelo a ras en la zona de implante con una máquina rasuradora marca Oster y hoja del número 40, se le aplicó una solución antiséptica de benzal- alcohol al 70% en la zona de implante. Se les colocó la cápsula de silastic con el trocar de acero inoxidable perforando la piel de la región dorso-lateral del torax, cerca de la nuca, depositándolo subdérmicamente. Se suturó la pequeña herida (un punto de sutura); con hilo seda calibre 3/0 blanco (curex) y se desinfectó con Vetsarol (Ciba Geigy).

Al finalizar, las ratas se dejaron reposando hasta que se repusieran de la anestesia.

A partir de éste momento las ratas fueron pesadas semanalmente a la misma hora, durante todo el experimento y al llegar al término de cada período del tratamiento (6 y 12 semanas); fueron sacrificadas por decapitación.

5.3. OBTENCION DE GONADAS Y MUESTRAS BIOLÓGICAS:

1.- Los machos se sacrificaron por decapitación con una guillotina (Harvard) de acero inoxidable y se dejaron desangrar (Robaire y col 1987).

2.- Fijación del animal en posición decúbito dorsal en una tabla de disección.

3.- Aplicación de alcohol en el abdomen para evitar que los pelos de la zona se introdujeran.

4.- Aislamiento de testículo, epidídimo y parte inicial del conducto deferente de ambos lados con ayuda de pinzas de diente de ratón y tijeras de disección por vía abdominal.

5.- Se depositaron en solución de Krebs (Ver Apéndice #1) y se mantuvieron en Baño María (Grant) a 38°C para evitar que se resecaran.

6.- Aislamiento de vesícula seminal y próstata.

7.- Pesado de próstata y vesícula seminal.

TESTICULO Y EPIDIDIMO IZQUIERDO:

El testículo y epidídimo izquierdo de la rata se perfundió por la arteria espermática del testículo según la técnica de Baker y col (1980).

Una vez perfundidos los órganos se separaron y al epidídimo se le quitó el tejido adiposo que se encuentra alrededor del mismo; se pesaron los órganos (Balanza analítica digital Sartorius A 210P) y se midieron con un Vernier.

El epidídimo es dividido en tres secciones anatómicas: cabeza, cuerpo, cola y se depositaron cada uno en vasos de precipitado de 10 ml. (Pirex) que contenían 2.0 ml. de solución de Krebs a 38°C.

Se picaron finamente con tijeras para iris de acero inoxidable cada una de estas tres partes y después se coló el contenido con una malla de 98% nylon y 2% licra para eliminar el tejido y utilizar el sobrenadante únicamente.

Se tomó una gota del sobrenadante de las distintas regiones anatómicas del epidídimo y se observó al microscopio para análisis de características estructurales del espermatozoide, movilidad y viabilidad.

El resto se centrifugó (centrifuga Sol Bot) por espacio de 5 min. a 1,000 RPM. en tubos de 10mm. X 75mm. Este líquido epididimario se utilizó para medición de proteínas y esteroides.

La fase sólida se utiliza, después de su suspensión en un volumen conocido, para conteo de espermatozoides en la cámara de Neubauer utilizando un microscopio de luz (Carl Zeiz).

EPIDIDIMO DERECHO.- Una vez obtenido el testículo de la rata, se puso en solución de Krebs a 38°C en baño María y se separa el testículo del epidídimo; se elimina el tejido adiposo del segundo como en el de lado izquierdo y en ésta ocasión no se perfunde sino que solamente se pesan y se miden el testículo y el epidídimo; se divide el epidídimo en cabeza, cuerpo y cola; se pesa cada parte. Se comienza con el procedimiento de fijación del tejido que a continuación se describe detalladamente.

5.4. MICROSCOPIA:

A) FIJACION E INCLUSION:

Los epidídimos tratados y controles se cortan con una hoja de bisturí finamente para obtener varios pedazos pequeños como biopsias y se fijaron por inmersión en fijador de Karnovsky (1965), modificado (sin CaCl₂), durante una hora a 4°C y se lavaron en amortiguador de cacoditalo de Sodio 0.1M con un ph. de 7.4, dejándolos hasta el día siguiente a 4°C para ser llevados al laboratorio y continuar con el procedimiento de postfijación.

Se postfijaron en una solución 1% (v/v) de Tetróxido de Osmio (OsO₄) (Zetterquist; 1956), durante una hora. Las muestras se lavaron después de la postfijación con agua destilada tres veces.

B) DESHIDRATACION:

Se deshidrataron con alcoholes graduales:

70% tres cambios dejando el último 10 minutos.

80% y 90% durante 10 min. cada uno.

95% y dos cambios de alcohol absoluto (100%) por 20 min.

Posteriormente se pasaron a Oxido de propileno durante 20 minutos (dos cambios). Se impregnaron en una mezcla de Epon 812- óxido de propileno, en proporción de uno a uno, durante una hora. Finalmente en Epon 812 (consultar Apéndice # 4), durante dos horas. La deshidratación y la impregnación se realizaron a temperatura ambiente. Se incluyeron en moldes de hule numerados (spi supplies), con el Epon 812 (Luft, 1961), y se dejaron 12 horas a 60°C en la estufa (Fanem Ltda.) para la polimerización de la resina.

D) ANALISIS HISTOLOGICO:

Se obtuvieron cortes semifinos de 190nm a 1 μ m de espesor en el microtomo Ultratome III 8800 (LKB). Se tiñeron por flotación con azul de toluidina 0.4% (consultar Apéndice # 5) y se montaron en portaobjetos (Corning 25 x 75mm.) fijando el cubre objetos (Corning 24 x 40) con bálsamo de Canadá para su estudio en microscopia de luz.

Las observaciones y toma de fotografías se realizaron en el microscopio de luz LABAPHOT-2 (Nikkon), y cámara Nikkon FX-35WA, utilizando rollo de película Panatomic.

E) ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL:

Se obtuvieron cortes finos de 60 a 90 nm. de espesor en el Ultratome III 8800 (LKB) y se montaron sobre rejillas de cobre; éstas se contrastaron 5 minutos con acetato de uranilo al 2.5% en agua destilada y 1 min. con citrato de plomo alcalino (consultar Apéndice # 6). Las rejillas

se observaron en el microscopio electrónico EM-9 (Carl Zeiss). El análisis de los resultados se realizó sobre el material electromicrográfico tomado.

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos se analizaron comparando los promedios +/- error estandar de la media (e.e.m.) de los grupos control y experimental utilizando la prueba "t" de Student y solo se consideraron como estadísticamente significativas aquellas diferencias de $p \leq 0.05$.

APENDICE

APENDICE # 1

SOLUCION DE KREBS. Para un litro.

Glucosa.....	2g.
NaHCL ³	2.1g.
KCl.....	0.35g.
KH ² PO ⁴	0.16g.
Mg SO ⁴	0.29g.
Na Cl.....	6.0g.
Ca Cl ²	0.27g.
Agua destilada.....	1 lt.

APENDICE # 2

FIJADOR DE KARNOVKY MODIFICADO.

Paraformaldehido...	1%
Glutaraldehido.....	2.5%

a) Agregar poco a poco al paraformaldehído (Merk) 25 ml de agua bidestilada a 60-70°C.

b) Enfriar con agua corriente, si no se disuelve, agregar una o dos gotas de NaOH 1.N (0.1ml)

c) Agregar: 50.0 ml de cacodilato de Sodio. 0.2M
 10.0 ml de glutaraldehido 2.5%
 15.0 ml de Agua bidestilada.

d) Ajustar el PH a 7.3 con HCL o NaOH.

CaCl²..... 0.05g. para Karnovsky normal.

APENDICE # 3

BUFFER DE CACODILATO DE SODIO

21.402g. en un litro de agua destilada = 0.1M

42.804g. en un litro de agua destilada = 0.2M

Ajustar a PH de 7.3 - 7.4

APENDICE # 4**PREPARACION DE EPON SEGUN PELCO.**

Mezcla "A".....7ml Plasticidad
 Mezcla "B".....3ml Dureza
 DMP-30.....0.15ml. Catalizador

Para hacer 10ml: El epon se prepara y se usa a temperatura ambiente. Las mezclas deben de guardarse en refrigeración y sacarlas una hora antes cuando se vaya ha utilizar.

Se utiliza guantes y en un recipiente de plástico (vaso de precipitado) en la campana se pone la mezcla A y B y se mueve constantemente ha homogeneizar y se agrega el catalizador.

APENDICE # 5**AZUL DE TOLUIDINA.**

Azul de toluidina..... 5g.
 Tetraborato de Sodio.....40g.
 Agua bidestilada.....1lt.

Se disuelve el azul de toluidina en 300 ml. de agua bidestilada, se le agrega el tetraborato de Sodio y se afora a un litro. Se hierve por espacio de 15 min.; se filtra una vez que esta frío.

APENDICE # 6**CITRATO DE PLOMO ALCALINO.**

Citrato de Plomo..... 0.03g.
 Agua bidestilada.....10.0ml.
 NaOH. ION..... 0.1ml.

Se disuelve el citrato de plomo en los diez mililitros de agua (hervida previamente por espacio de 15 min. y se le agrega el hidróxido de sodio. Se protege de la luz durante y después de la preparación.

153877

R E S U L T A D O S

El experimento de seis semanas nos muestra que con este tiempo ya es suficiente para poder observar los cambios en el animal, debido a que los datos de las doce semanas no varían mucho al comparar ambos.

PESO CORPORAL:

Se observó en ambos experimentos, cómo en las primeras semanas en las dosis de 1mm, 3mm, 7mm, los animales se mantienen sin una ganancia de peso. Al final del tratamiento los animales del grupo control ganó peso llegando a 417 g (6 sem.) y 447 g (12 sem.), mientras que en los animales tratados el peso corporal disminuyó significativamente conforme mayor fue el tamaño del implante y mayor tiempo duró el tratamiento.

LONGITUD DEL IMPLANTE (mm)	DURACION DEL TRATAMIENTO EN SEMANAS	
	6	12
CONTROL	430 +/- 6 (10/n)	430 +/- 6 (10/n)
1mm	346 +/- 8 (6/n)	362 +/- 17 (5/n)
3mm	340 +/- 5 (6/n)	329 +/- 10 (4/n)
7mm	330 +/- 4 (6/n)	322 +/- 8 (6/n)

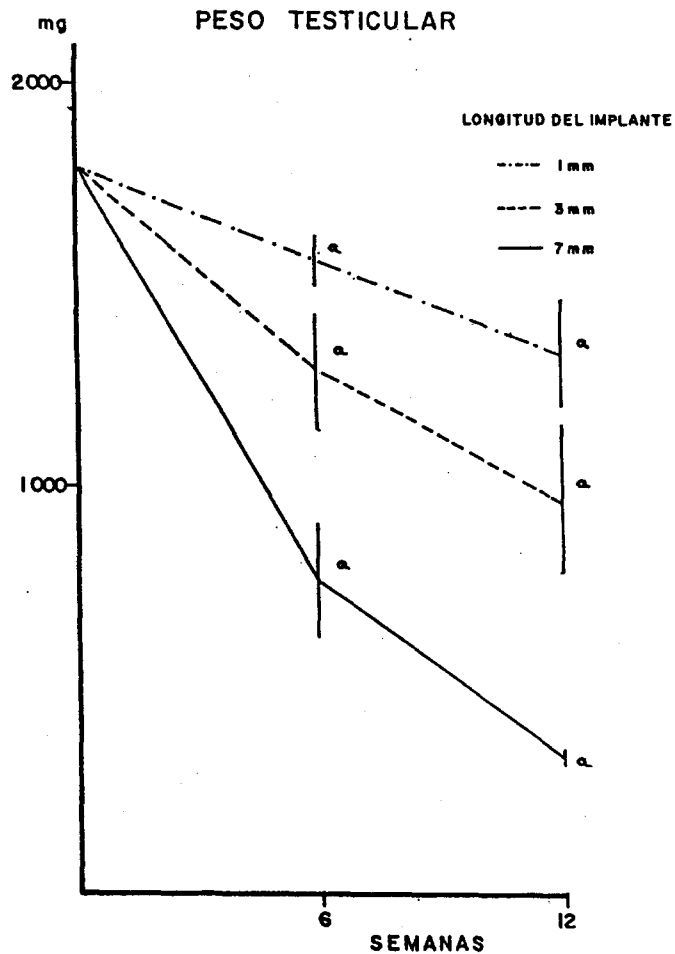
TABLA # 1.

Efecto del E₂ liberado de implantes de polidimetil siloxana sobre el peso corporal (g) (media +/- e.e.m.) durante 6 y 12 semanas de tratamiento.

p ≤ 0.05 comparado con el grupo control.

PESO TESTICULAR:

Se encontró que el peso testicular disminuyó significativamente en forma progresiva respecto al aumento en la longitud del implante y al tiempo de tratamiento, habiendo una diferencia de 1016 g. aproximadamente entre el testigo y el lote de 7mm. (gráfica # 1)



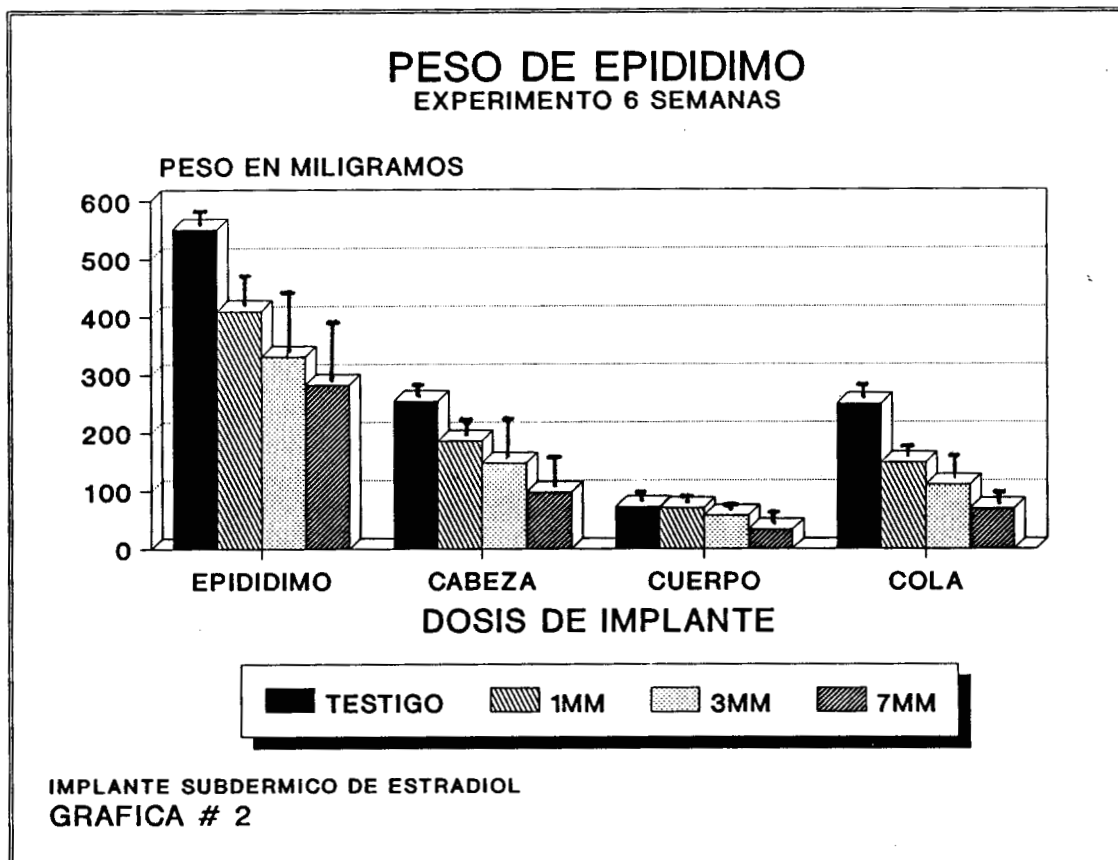
Efecto del E_2 liberado de implantes de polidimetilsiloxano sobre el peso testicular (g) (media \pm e. e.m.) durante 6 y 12 semanas.

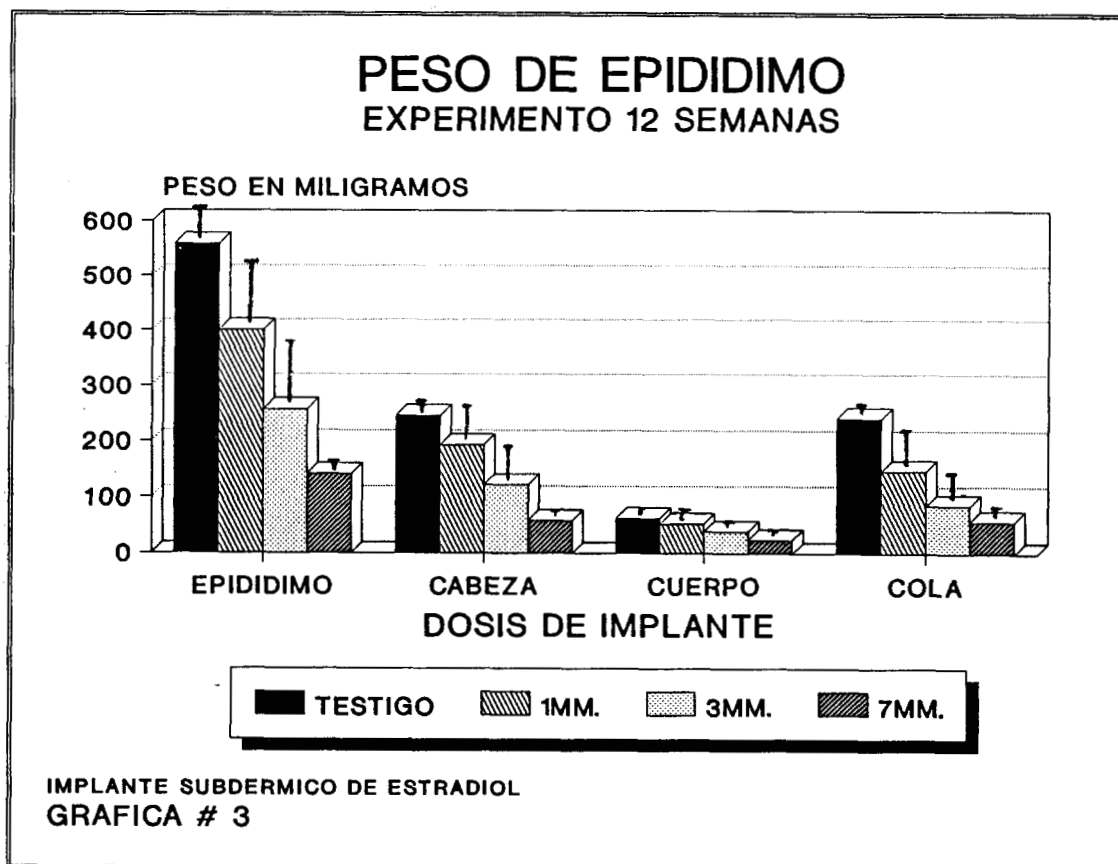
a. $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

GRAFICA # 1

PESO DEL EPIDIDIMO:

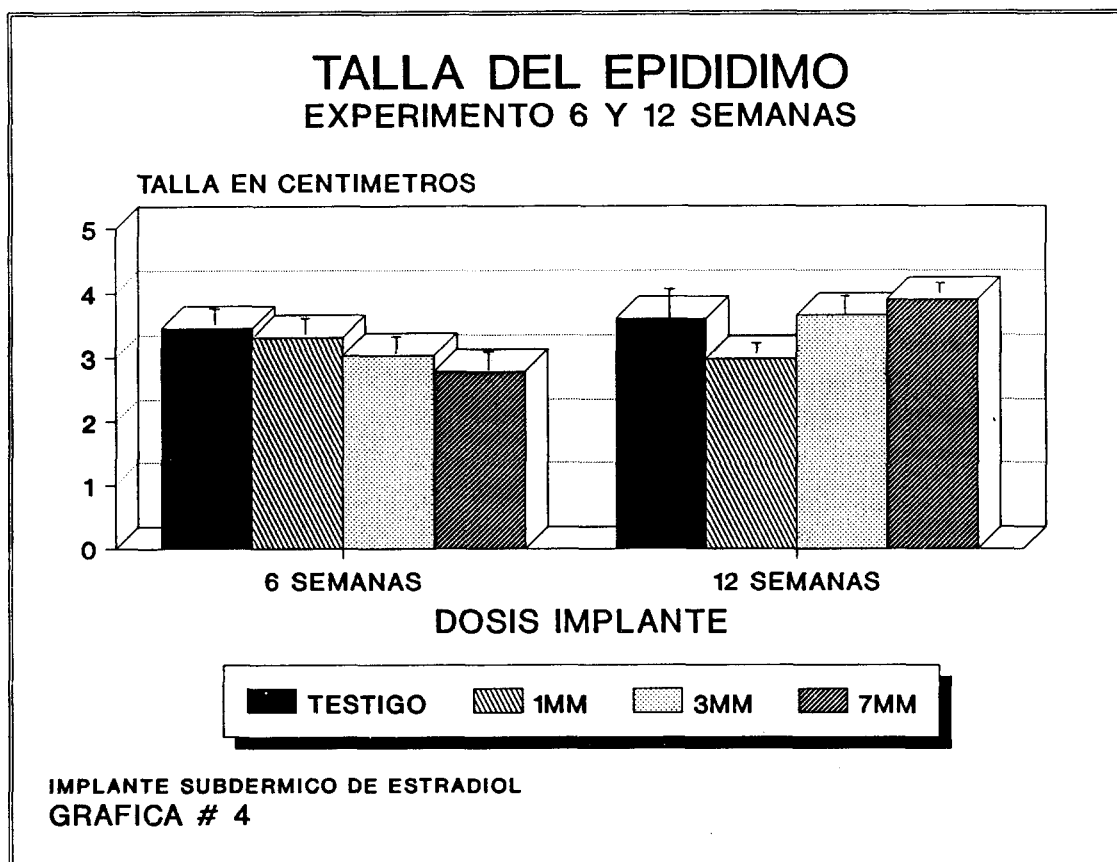
En el tratamiento de 6 semanas al igual que en el de 12 semanas hay una notoria disminución del peso conforme sea el aumento en la longitud del implante y al tiempo de tratamiento (gráficas # 2 y 3).



PESO DEL EPIDIDIMO:

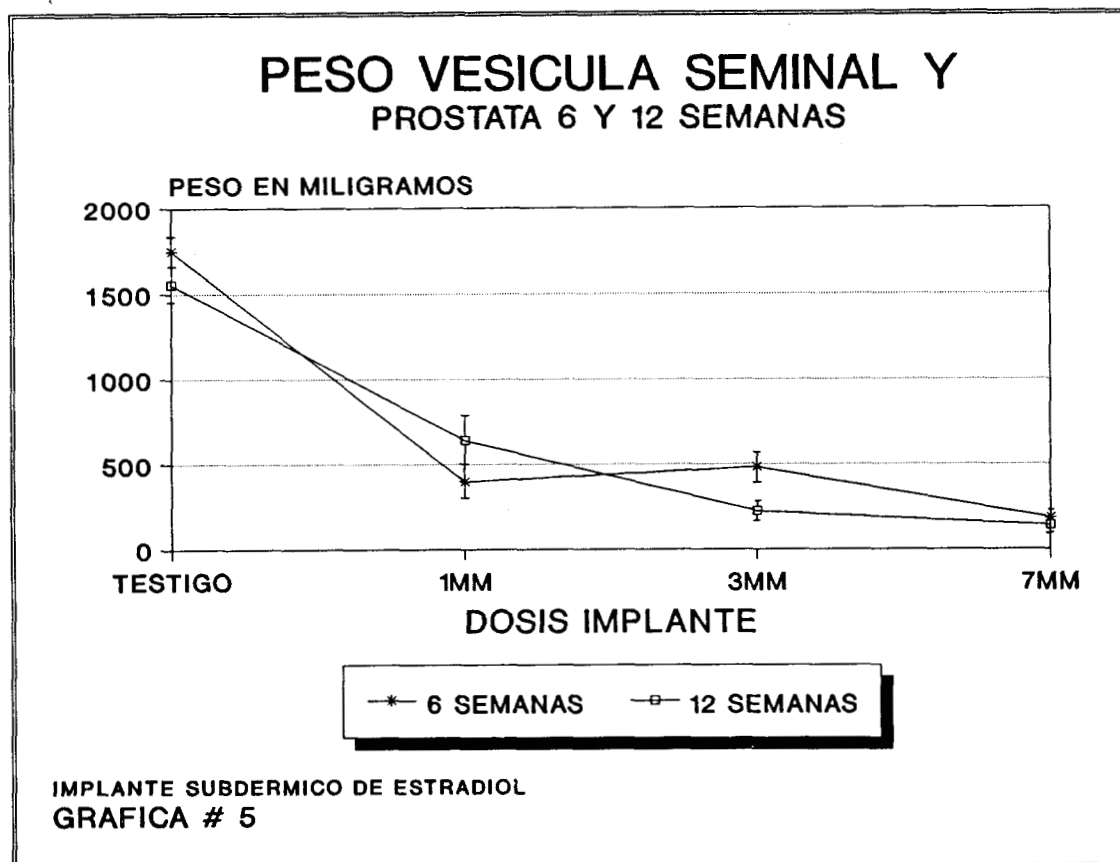
TALLA DEL EPIDIDIMO:

Con respecto a la talla se ve también una reducción, aunque no sea tan drástica como en el peso, esto es debido a que el epidídimo está unido al testículo y se va haciendo más delgado sobre todo en la parte del cuerpo, pero no pierde su talla aunque va perdiendo peso. (gráfica # 4)



PESO DE PROSTATA Y VESICULA SEMINAL.

En dosis altas el peso de estas dos partes anatómicas del aparato reproductor del macho se ven severamente castigadas.
(gráfica # 5).



HISTOLOGIA:

I.- EPIDIDIMO DE RATAS TESTIGO.

Al microscopio de luz (fig . 1), se encuentran cortes transversales del tubo del epidídimo dividido en tres regiones: cabeza (A,B), cuerpo (C,D) y cola (E,F) de los animales control. En dichos cortes se ve claramente la lamina epitelial, que consiste en un epitelio columnar estereociliado de tipo pseudo estratificado (fig. 1.A).

Los estereocilios son microvellosidades de las células epiteliales, que carecen de disposición microtubular interna y sirven para incrementar la superficie de absorción o secreción de revestimiento (fig. 1.B y fig. 3.B).

La lámina propia consiste de un tejido conjuntivo areolar vascularizado. La lámina muscular esta dispuesta en forma circular y se va engrosando hacia la cola del epidídimo (fig. 1.A).

En el lumen del conducto epididimario encontramos gran cantidad de espermatozoides llevando a cabo su maduración. La mayor concentración de los espermatozoides se observa en la cola del epidídimo ya que están densamente compactados, fungiendo este segmento terminal como reservorio (fig. 1.E).

En esta misma figura 1B, los tipos de células que se encuentran en los diferentes segmentos del epidídimo son:

- a) Células principales
- b) Células estrechas.
- c) Células claras.
- d) Células basales

Las células principales (P), se pueden observar fácilmente ya que son moderadamente teñidas y muestran algunas microvellosidades altas que forman una barrera como cepillo (fig. 3B-flecha). Estas células contienen un núcleo redondo y pálido con un nucleolo pronunciado. Tienen una función lisosómica y fagocítica muy activa. (Hoffer y col 1973).

Las células estrechas (E) del epidídimo son células columnares altas, siendo más estrechas que las células principales y se encuentran en el segmento inicial de la cabeza. Se identifican por tener una gran cantidad de pequeñas vesículas no recubiertas y mitocondrias distribuidas por todo el citoplasma. La función de las vesículas se cree sea la de endocitosis adsortiva (Sun y Flicke ger 1980).

Las células estrechas son precursoras de las células claras (1F. flecha); que están presentes en la cabeza, el cuerpo, y la cola del epidídimo. Se caracterizan por tener microvellosidades que se extienden de la membrana plasmática apical hacia el lumen (Hamilton 1977); así como de numerosas vesículas y vacuolas debido a su función endocítica que es mayor en las células claras que en las células principales particularmente en la cola del epidídimo (Robaire, Hermo 1988). Hay una abundante cantidad de cuerpos densos, largos y teñidos (Hamilton 1977).

Los gránulos secretores (GS), se encuentran en mayor cantidad en la cabeza (A,B,C,D) y en menor cantidad en la cola (E,F); lo cual muestra que la mayor actividad secretora se lleva a cabo en la cabeza y el cuerpo del epidídimo.

Por último encontramos las células basales (cb)(fig 1B), que aparecen a lo largo de todo el ducto epididimario. Estas células, en la rata son pequeñas, redondas o elongadas de núcleo grande y poco citoplasma. Se establecen usualmente entre las células principales y la base del epitelio en donde tienen una extensa área de contacto con la membrana basal. Se pueden encontrar desmosomas entre las células principales y basales. Estas células no llegan alcanzar el lumen.

II. EXPERIMENTO CON IMPLANTE DE DOSIS 1MM Y 3MM. DE 17 β ESTRADIOL DURANTE 6 Y 12 SEMANAS DE DURACION.

Al microscopio de luz en las figuras 2,3,5,6; se encuentra el epitelio de las distintas zonas del epidídimo en perfectas condiciones y sus diferentes tipos de células continúan con su alta actividad endocítica sin alterar el diámetro luminal.

En la cabeza (fig. 5B), cuerpo (fig. 5C), cola (fig. 5E), hay una gran cantidad de gránulos de secreción mostrando una constante actividad secretora al igual que en el epidídimo de las ratas utilizadas como control del experimento.

III. EXPERIMENTO CON IMPLANTE DE DOSIS DE 7MM. DE 17 β ESTRADIOL DURANTE 6 Y 12 SEMANAS DE DURACION.

El daño que se produce por el efecto del implante de 17 β estradiol se ve al microscopio de luz ya desde las 6 semanas de tratamiento (fig. 4); siendo un poco más drástico a las 12 semanas (fig. 7).

Los cambios en las diferentes zonas del epidídimo son notorios. Se puede observar que el lumen es muy estrecho, perdiendo aproximadamente de un 85% a un 95% el diámetro del mismo, siendo mayor la estrechez en el cuerpo y más aún en la cola del epidídimo, que es donde la luz casi desaparece debido al engrosamiento y fibrosis de la lámina propia de la membrana muscular.

El túbulo adquiere un aspecto irregular debido a las invaginaciones que sufre el epitelio y al plegamiento de las membranas basales. (fig. 4D y 7F, flechas).

No se encuentra ningún espermatozoide en las tres diferentes secciones del epidídimo (fig. 4.A,C,E y 7 A,C,E).

MICROSCOPIO ELECTRONICO:

En la figura # 8 de microscopía electrónica de una porción del epitelio del tubo en la zona de la cabeza del epidídimo de la rata control, podemos ver la gran cantidad de retículo endoplasmático (Re) de las células con que cuenta esta zona, así como de células secretoras (CS) y cuerpos multivesiculares pálidos (CM)

En la figura # 9 de microscopía electrónica de una porción la cabeza del epidídimo de rata tratadas con dosis de 7mm. de 17 β estradiol durante 12 semanas; en la luz la presencia de microvellosidades es menor que en el testigo. Las células todavía tienen retículo endoplasmático rugoso más o menos abundante y conservan las inclusiones de gránulos de secreción.

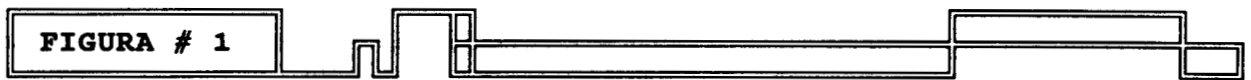
Hay un aumento de colágena (C) pero en menor cantidad que a continuación vamos a observar en la figura # 11 y 12 de la cola del epidídimo. Podemos observar también células de infiltración de tipo linfocítico, que provienen de los vasos sanguíneos (CI)

En la figura # 10 del cuerpo del epidídimo de rata tratados con dosis de 7mm. de 17 β estradiol durante 12 semanas, se observa la disminución del retículo endoplasmático y una gran cantidad de lisosomas con figuras mielínicas (*).

Al microscopio electrónico en las figuras # 11 y 12 se muestra que el 17 β estradiol a dosis de 7 mm. durante 12 semanas induce un incremento en los componentes fibromusculares del epidídimo, especialmente en la cola. Hay una hiperplasia e hipertrofia de fibras musculares lisas, en la zona de la lámina propia.

La presencia de abundantes lisosomas sugiere una gran actividad fagocitaria de las células epiteliales, debido probablemente a la alta mortalidad de células del epitelio.

En la figura # 11, las células principales y claras se muestran íntegras pero su actividad secretora parece estar muy disminuida como lo sugiere la escasa cantidad de gránulos en su citoplasma.



Microscopía de luz del epidídimo de rata control dividido en:

A) Cabeza del epidídimo (100x). Se puede apreciar dos asas del túbulo epididimario (T) en cortes tangenciales. En su interior hay una gran cantidad de espermatozoides (e) fijados con una disposición reticular (flechas).

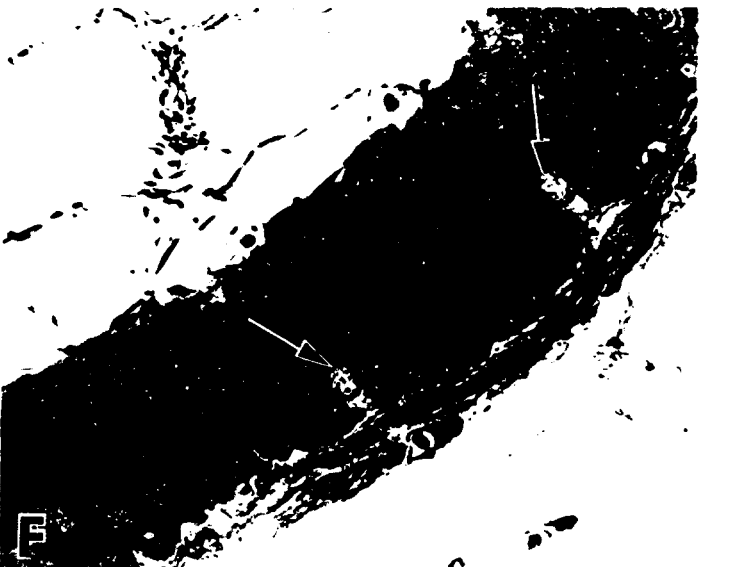
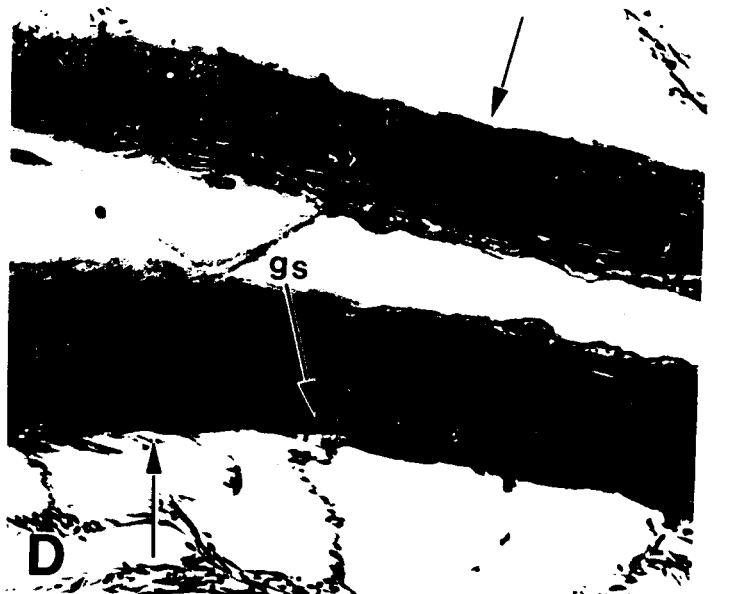
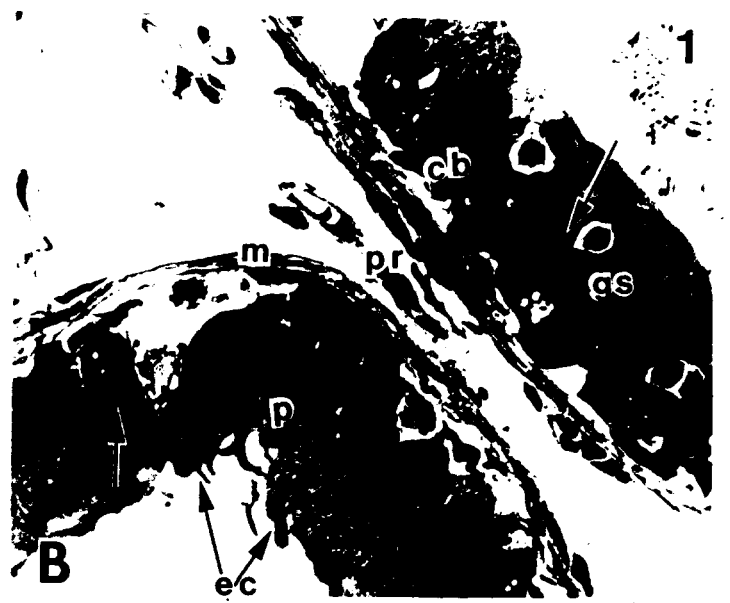
B) La cabeza del epidídimo a mayor aumento (600x). Se observan las diferentes células características de ésta zona: Células principales (P) del epitelio que poseen abundantes estereocilios (ec) gránulos de secreción (flechas (gs)); células basales (cb); también se observa la lámina propia (pr) y la lámina muscular (m).

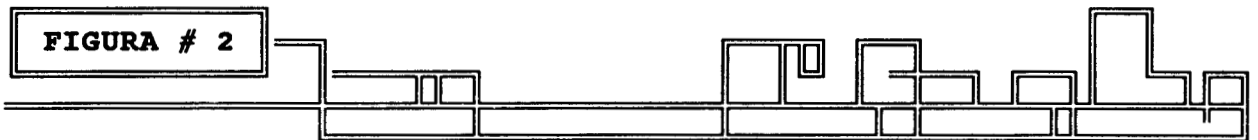
C) Cuerpo del epidídimo (100x).

D) Cuevo del epidídimo (600x). Los estereocilios en esta zona son más cortos (flechas) y los gránulos de secreción aparecen poco densos (gs)

E) Cola del epidídimo (100x). La concentración de espermatozoides (e) en ésta zona es mayor que en los otros dos segmentos.

F) Cola del epidídimo (600x). Se observan dos células claras con abundantes gránulos densos de secreción



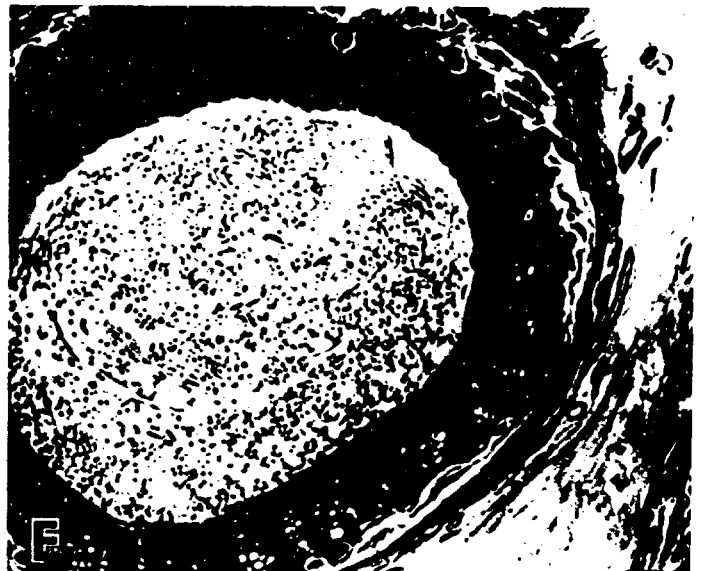
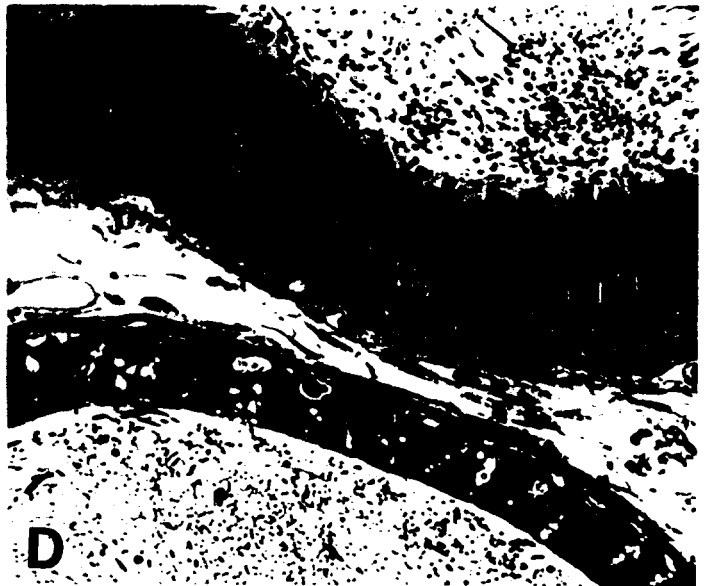


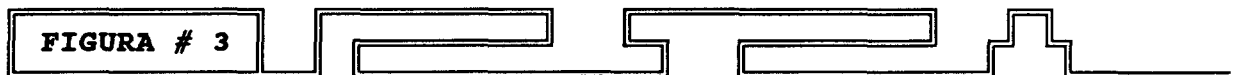
Microscopía de luz de epidídimo de Ratas tratadas con dosis de 1m de 17 β estradiol, durante 6 semanas. Cortes tangenciales y transversales.

En estos cortes se observan claramente los espermatozoides gracias a una mejor penetración del fijador a la luz del tubo.

- A) Cabeza del epidídimo (100x)
- B) Cabeza del epidídimo (400x)
- C) Cuerpo del epidídimo (100x)
- D) Cuerpo del epidídimo (400x)
- E) Cola del epidídimo (100x)
- F) Cola del epidídimo (400x)

No hay cambios aparentes con ésta dosis en ninguno de los tres segmentos.

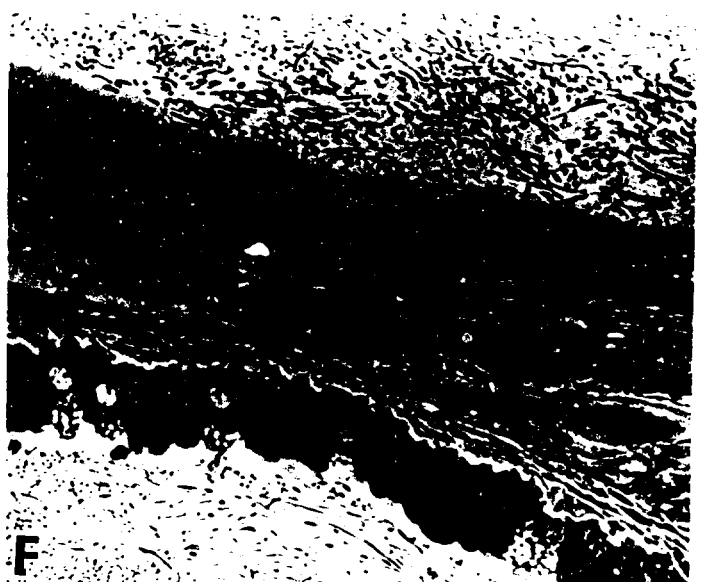
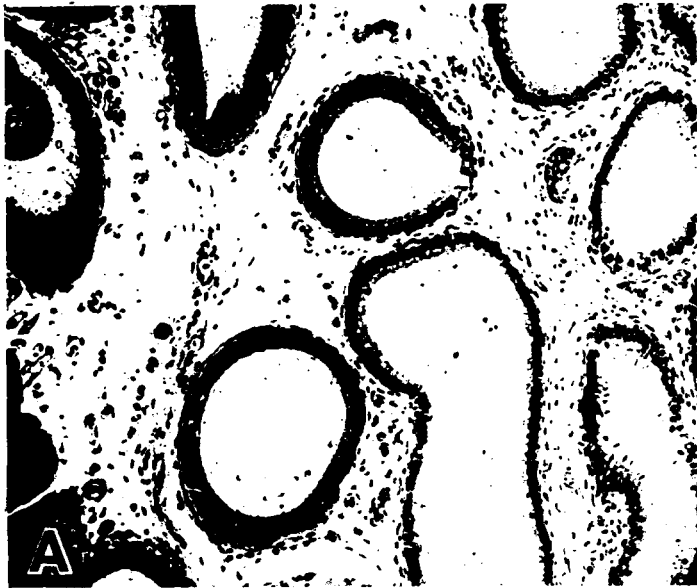


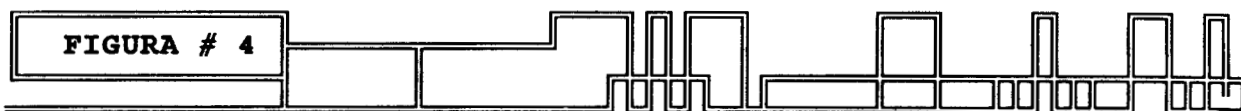


Microscopía de luz de epidídimo de ratas tratadas con dosis de 3mm de 17 β estradiol, durante 6 semanas.

- A) Cabeza del epidídimo (100x)
- B) Cabeza del epidídimo (400x). Las flechas indican los estereocilios
- C) Cuerpo del epidídimo (100x)
- D) Cuerpo del epidídimo (600x)
- E) Cola del epidídimo (100x)
- F) Cola del epidídimo (400x)

Sigue una alta concentración de espermatozoides en el lumen de los túbulos epididimarios en cada uno de los diferentes segmentos, sin mostrar cambios significativos.





Microscopía de luz de epidídimo de ratas tratadas con dosis de 7mm de 17 β estradiol, durante 6 semanas.

A) Cabeza del epidídimo (100x). El túbulo se ve colapsado, hay poca luz en el tubo (*), en comparación con los testigos.

B) Cabeza del epidídimo (600x). Las flechas muestran espermatozonias no siendo normal en esta zona encontrarlas. No se encuentran espermatozoides en esta zona.

C) Cuerpo del epidídimo (100x). La cavidad luminal aparece más estrecha que en la región de la cabeza.

D) Cuerpo del epidídimo (400x). El túbulo toma una forma irregular, debido a las invaginaciones que sufre el epitelio (flecha). Hay un engrosamiento de la capa muscular (ms) y una gran fibrosis en la lámina propia (pr).

E) Cola del epidídimo (100x). La cavidad luminal está completamente colapsada (*).

F) Cola del epidídimo (600x). La cavidad luminal colapsada es evidente, las células del epitelio poseen pocos gránulos de secreción y la lámina propia (pr) se muestra fibrosa. Esta zona del epidídimo es la más afectada de las tres.

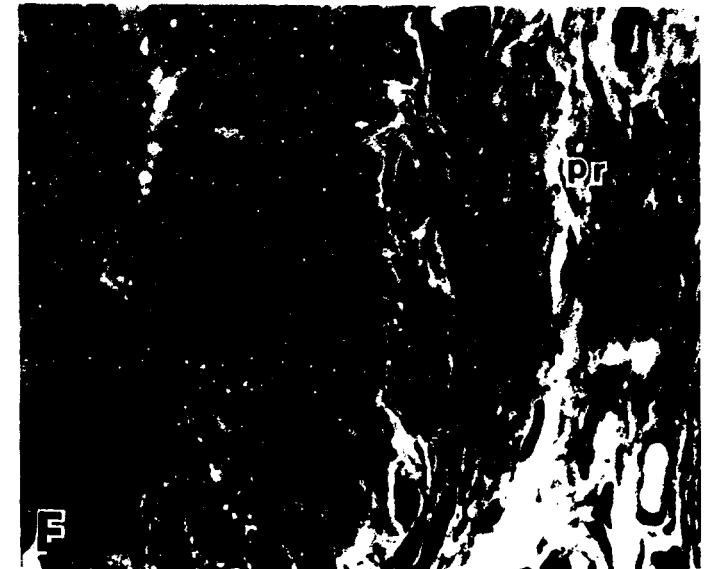
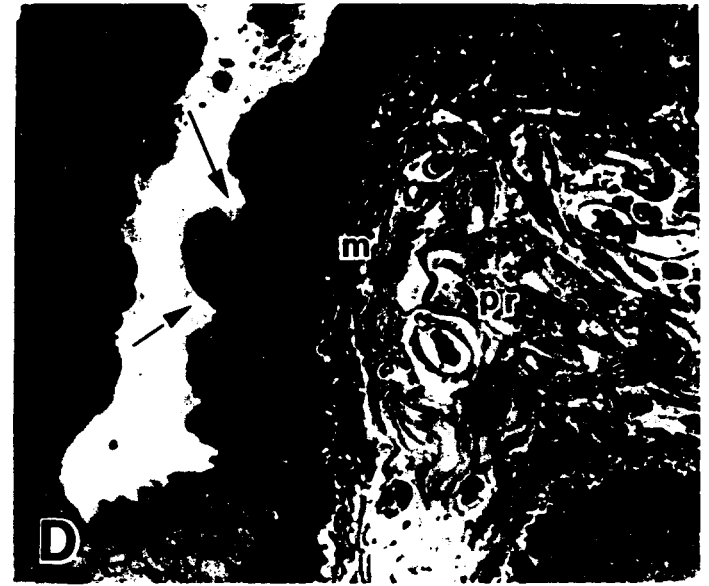
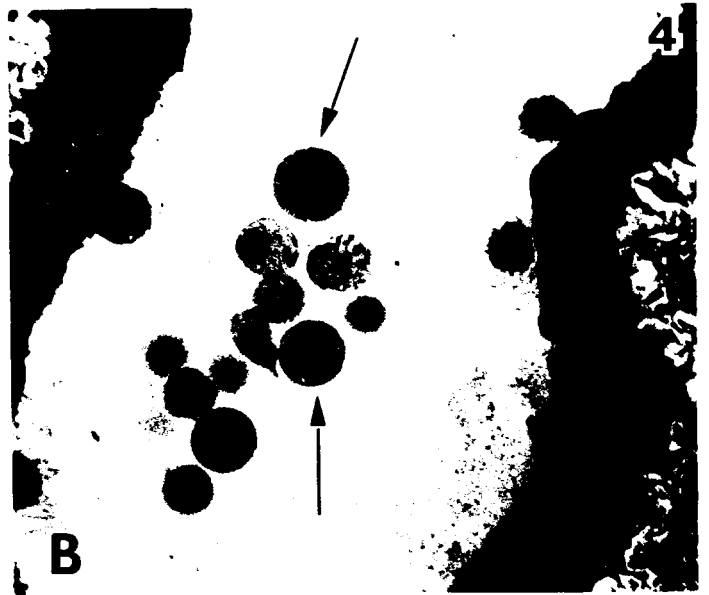
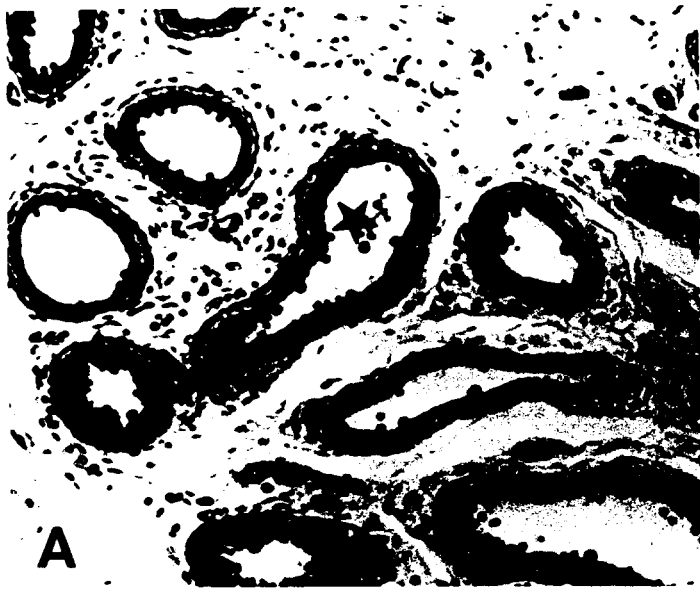




FIGURA # 5

Microscopía de luz de epidídimo de ratas tratadas con dosis de 1mm de 17 β estradiol durante 12 semanas.

A) Cabeza del epidídimo (100x). Las flechas indican la aglutinación de los espermatozoides (e), en forma reticular debido únicamente al tipo de fijación.

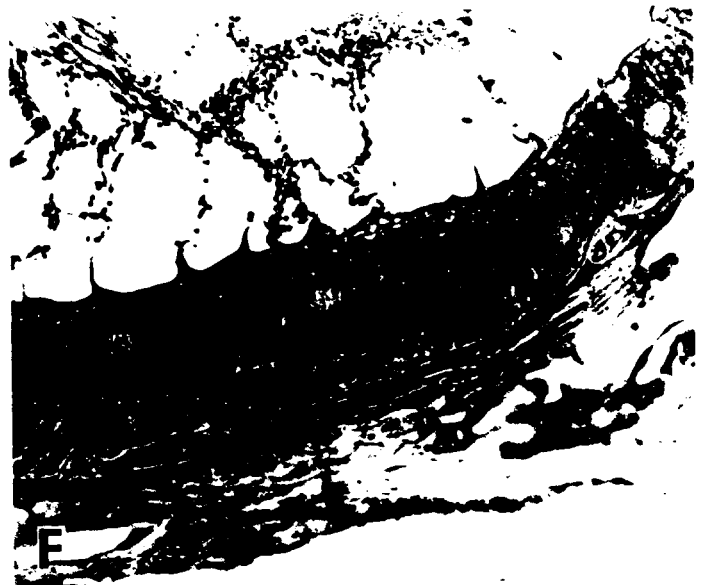
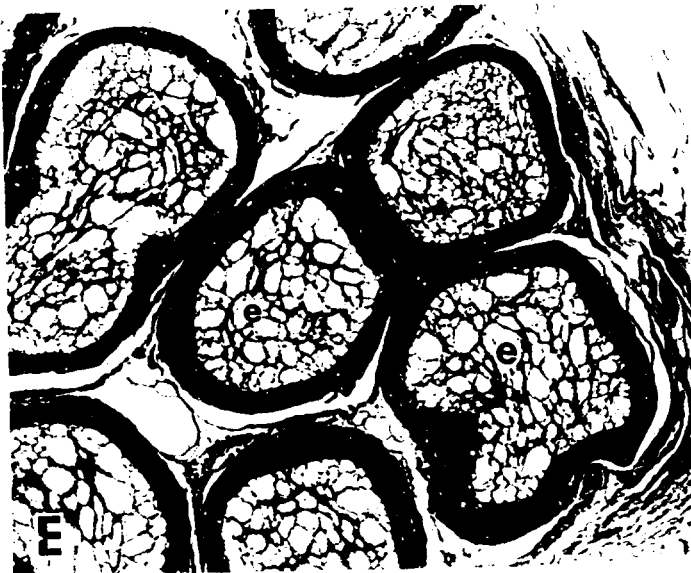
B) Cabeza del epidídimo (400x). Observe aquí la gran cantidad de gránulos secretores (gs).

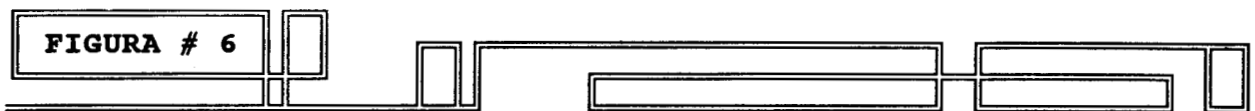
C) Cuerpo del epidídimo (100x). Observe los espacios vacíos ocupados principalmente por vasos sanguíneos (flecha); y grandes vasos linfáticos

D) Cuerpo del epidídimo (600x)

E) Cola del epidídimo (100x). Ni la concentración de espermatozoides (e); ni el aspecto histológico del epidídimo se ven afectados por esta dosis.

F) Cola del epidídimo (600x). Detalle de la pared epitelial del tubo seminífero de la cola. Observe a su vez los diferentes tipos celulares.

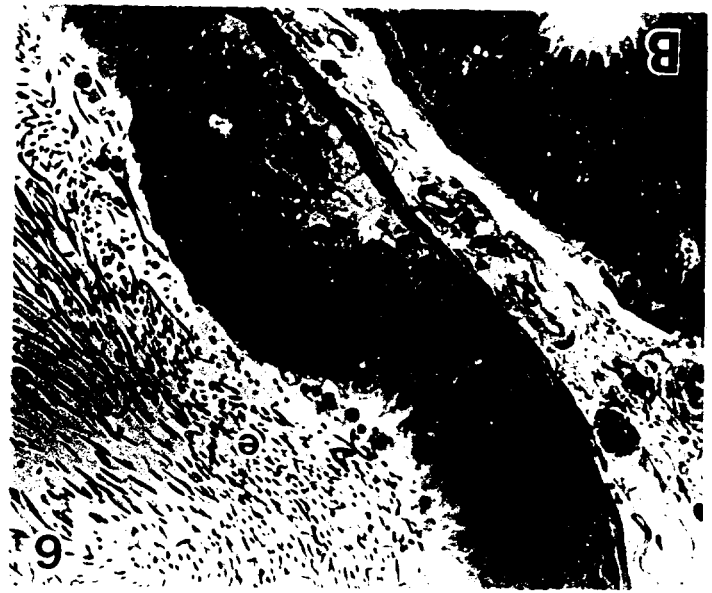
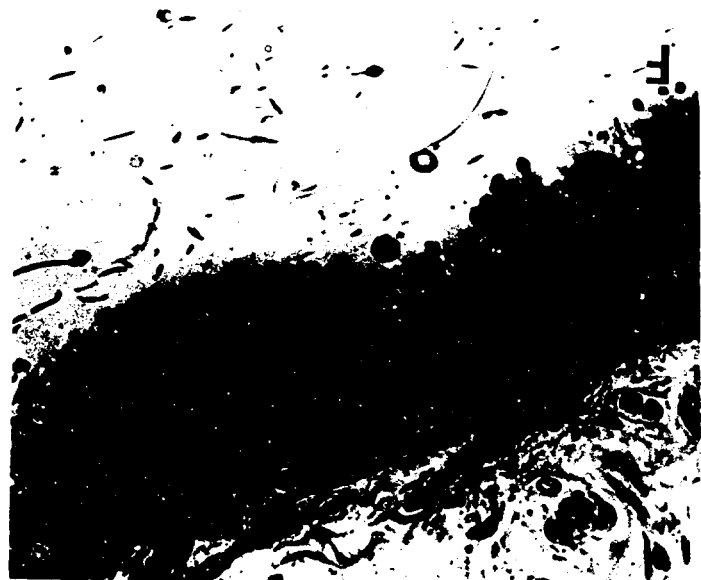


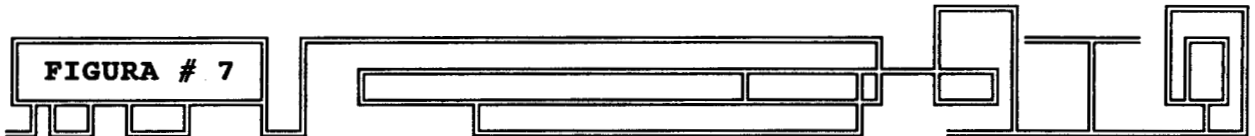


Microscopía de luz de epidídimo de ratas tratadas con dosis de 3mm de 17 β estradiol durante 12 semanas.

- A) Cabeza del epidídimo (100x)
- B) Cabeza del epidídimo (400x).
- C) Cuerpo del epidídimo (100x)
- D) Cuerpo del epidídimo (400x)
- E) Cola del epidídimo (100x)
- F) Cola del epidídimo (400x)

La concentración de espermatozoides (e), en los diferentes segmentos sigue siendo alta, sin mostrar cambios en el túbulo epididimario.





Microscopía de luz de epidídimo de ratas tratadas con dosis de 7mm de 17 β estradiol durante 12 semanas.

A) Cabeza del epidídimo (100x). El túbulo se encuentra colapsado y el lumen del tubo (*), ha disminuido considerablemente; sin embargo el túbulo se encuentra bien delineado.

B) Cabeza del epidídimo (200x).

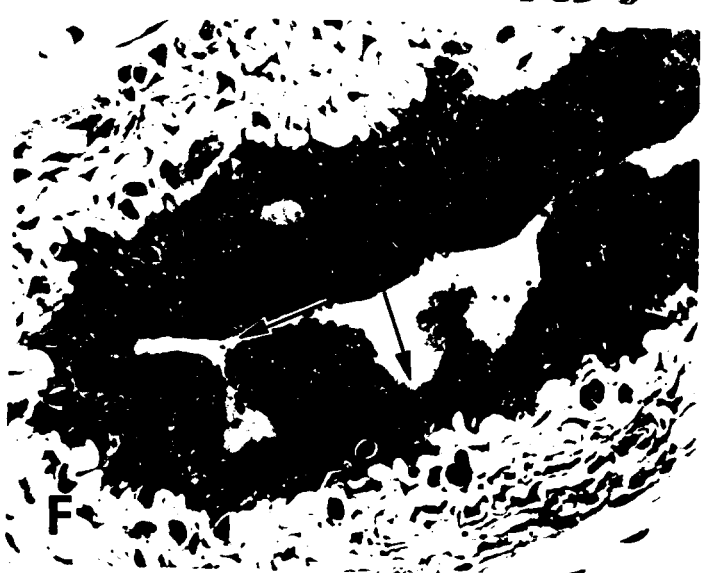
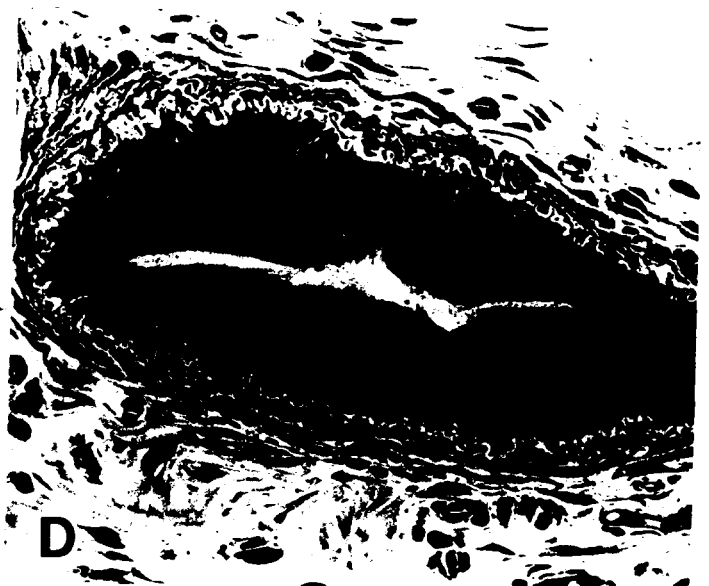
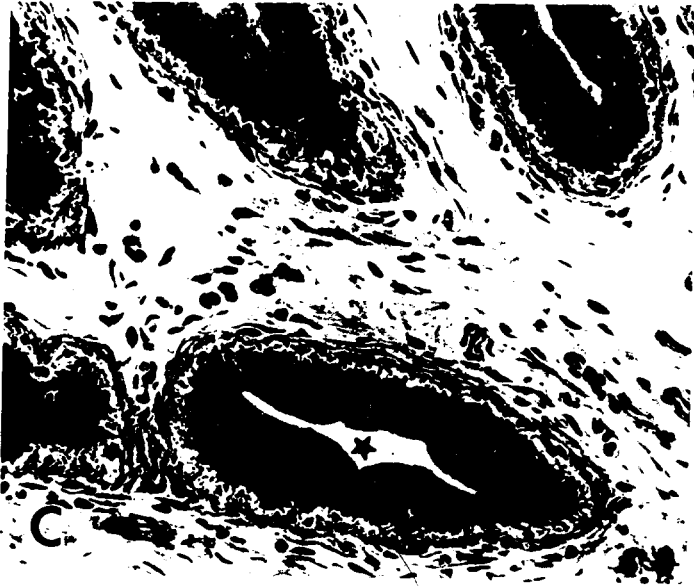
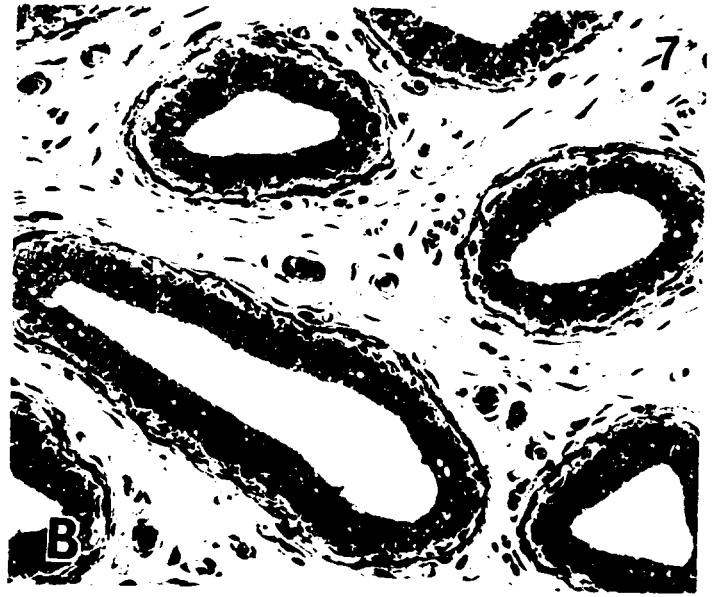
C) Cuerpo del epidídimo (100x). El túbulo se vuelve más estrecho aún, tiene una forma irregular (*).

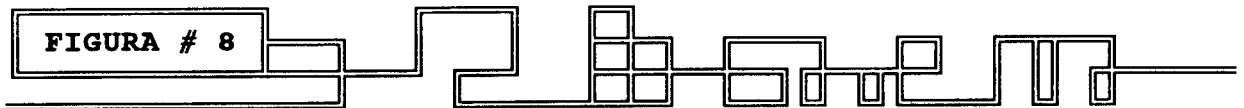
D) Cuerpo del epidídimo (400x)

E) Cola del epidídimo (200x). Los túbulos han perdido casi por completo la luz luminal (flecha), debido al engrosamiento y fibrosis de sus láminas, disminuyendo considerablemente su diámetro.

F) Cola del epidídimo (400x). El túbulo toma una forma irregular debido a las invaginaciones que sufre su epitelio (flecha).

La cola del epidídimo es la más afectada en esta dosis al igual que en el experimento de 12 semanas (fig. # 4)





Microscopía electrónica de una porción del epitelio de la cabeza del epidídimo control (1950X).

Se puede observar la gran cantidad de retículo endoplasmático (Re) de las células de ésta zona; así como células secretoras (S); la capa muscular (M); la membrana basal (B); los estereocilios (es) y un corte transversal del flagelo de un espermatozoide (flecha).





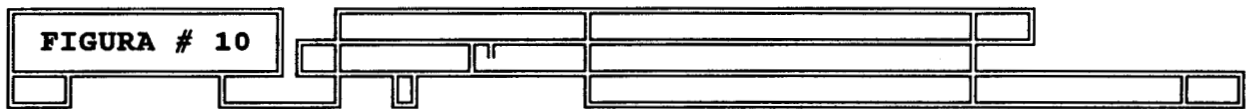
Microscopía electrónica (1950X) de una porción del epitelio del tubo de la cabeza del epidídimo, tratado con dosis de 7mm de 17β estradiol durante 12 semanas.

Las células epiteliales muestran escasos gránulos de secreción y grandes lisosomas. La membrana basal tiene abundantes pliegues entre los cuales se insinuan células del músculo.

Hay aumento de colágena (c) pero en menor cantidad que en la zona de la cola del epidídimo. Observe usted las células de infiltración (in) provenientes de los vasos sanguíneos.

- e. células del estroma.
- c. colágena
- in. células de infiltración
- mb. membrana basal
- i. inclusión lisosómica.
- estereocilios (flechas)
- * lumen del tubo.





Microscopía electrónica (1950X) del epitelio epididimal de la región del cuerpo, tratados con dosis de 7mm. de 17 β estradiol durante 12 semanas.

Observese la disminución del retículo endoplasmático y la gran cantidad de lisosomas con figuras mielínicas (FM).

es. estereocilios

* lumen del tubo



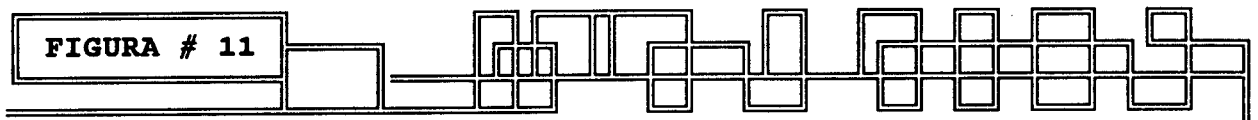
FM

es

σ



10



Microscopía electrónica (1950X) de una porción del epitelio del tubo de la cola del epidídimo de rata tratados con dosis de 7mm. de 178 estradiol durante 12 semanas.

Se encuentran células de infiltración de tipo linfocitario que provienen de los vasos sanguíneos (i).

Hay gran cantidad de colágena (C); y de mitocondrias (m).

Hay desprendimiento de los estereocilios (es).

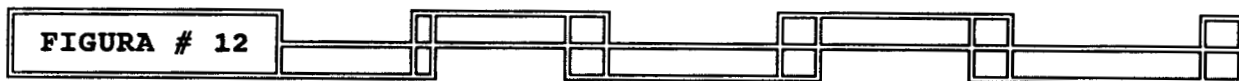
C. colágena.

d. desmosomas.

b. lámina basal.

* lumen del tubo.





Microscopía electrónica (1950X) de una porción de la lámina propia del cuerpo del epidídimo de rata tratados con dosis de 7mm. de 17 β estradiol durante 12 semanas.

En ésta micrografía se pueden ver claramente las fibras colágenas (C), que explican la fibrosis de esta región y secciones de numerosas células de musculo liso muy hipertrofiadas por éste tratamiento, que se han formado y las fibras musculares (FM).

m. mitocondria.



DISCUSION

Recientemente se ha indicado la utilización de dosis pequeñas de estradiol como un recurso para lograr el control de la fertilidad en el hombre. La utilización, en el animal experimental de cantidades semejantes a las que se han recomendado en el hombre para lograr este fin (Aprox. 240ng/día/animal), no son capaces de modificar los niveles séricos de estradiol que se encuentran en los animales no tratados y por lo tanto no se han encontrado cambios significativos en el patrón reproductivo de los animales así tratados.

La utilización de dosis mayores de estradiol en el animal experimental si es un procedimiento capaz de modificar la fertilidad del macho (Rao y Chinoy, 1983), de inhibir la espermatogénesis (Okó y Rudka, 1984), de reducir el peso y la función de los órganos sexuales accesorios (Rao y Chinoy, 1983; Okó y Rudka, 1984; Robaire y col, 1987), y de causar disminución de la conducta sexual (Frick y col, 1984). Particularmente Robaire y col (1987), han demostrado que la utilización de estradiol a las dosis utilizadas en los medicamentos utilizados como anticonceptivos en el hombre no son capaces de provocar ningún cambio significativo en los parámetros de fertilidad ni de funcionamiento de los órganos sexuales de la rata macho. Sin embargo dosis mayores, hasta de 1680 ng/día/animal, modifican drásticamente tanto la producción de espermatozoides por el testículo como el patrón de conducta sexual y de disminuir, aunque no de manera muy clara el número de embarazos producidos en hembras normales. Tampoco se observó ninguna modificación en los embriones normalmente implantados ni en el número de malformaciones fetales observadas.

En vista de que los resultados de Robaire y col (1987) muestran alguna evidencia de la respuesta diferencial del epidídimo a la presencia de estrógenos, que concuerda con algunos otros datos reportados sobre la presencia de receptores a estrógenos en el tejido epididimario, nosotros decidimos estudiar el efecto de la presencia continua de estrógenos sobre la morfología y la histología del epidídimo en sus tres regiones anatómicas, cabeza, cuerpo y cola en un intento por demostrar que la regulación endócrina del epidídimo se realiza de manera diferencial en estos tres sectores anatómicos, lo cual abriría nuevas perspectivas para la utilización de técnicas anticonceptivas hormonales utilizables en el hombre.

La liberación continua de diversas cantidades de estradiol a ratas machos adultos (implantes subdérmicos de polidimetil siloxano de 1mm. de longitud, los cuales liberan aproximadamente 240 ng/día animal, hasta implantes de 7mm. que liberan 1680 ng de la hormona/día/animal) (Robaire y col, 1987), durante un periodo de 6 a 12 semanas indujo la detención del crecimiento del animal de una manera que fué dependiente de la dosis y del tiempo de implantación. El efecto de las dosis mayores es consistente con los resultados publicados previamente (Hunt y col, 1976; Oko y Rudka, 1984, 1984; Robaire y col, 1987), sin embargo en nuestras manos aún la dosis mas pequeñas fué capaz de inducir una diferencia de peso estadísticamente significativa en relación a los animales normales a los cuales se les implantaron tubos de polidimetil siloxano vacios.

El mecanismo por el cual la administración de estradiol a ratas machos es capaz de modular la ganancia de peso de los animales no esta completamente elucidado. Sin embargo, puesto que el efecto es claramente dependiente de la dosis y el tiempo de exposición y por otro lado es significativamente mayor que el efecto logrado mediante la orquidectomía (Robaire y col, 1977), debe uno concluir que el efecto del estradiol sobre este parámetro no se encuentra mediado exclusivamente por la supresión del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, sino que deben quedar involucrados otros mecanismos. En relación a esto es importante mencionar los resultados de Williams y Daugadad (1981), quienes demostraron que la administración de estrógenos naturales o sintéticos a ratas macho jóvenes y adultas indujo una reducción significativa de la secreción de hormona de crecimiento. Es tambien importante mencionar que en los estudios de Robaire y col (1979, 1987), se encontró en animales tratados con implantes subcutáneos de estradiol un aumento importante en el peso de la pituitaria, la cual puede ser relacionada con un intento de suplir, mediante la hipertrofia del tejido, la funcionalidad afectada de esta importante glándula de secreción interna. Estos resultados deben ser tomados muy en cuenta cuando se traate de administrar estrógenos, como tratamiento anticonceptivo, a sujetos jóvenes que no hayan terminado su periodo normal de crecimiento.

El efecto que tiene la liberación continua de estradiol sobre varios parámetros del aparato reproductor ha sido descrito con anterioridad (Robaire, 1979; 1987). En relación con nuestro campo de interés es importante mencionar que la presencia continua de estradiol indujo una disminución, dependiente de dosis, en el peso de la cabeza y la cola del epidídimo, sin modificar significativamente el peso del cuerpo de éste órgano; este efecto diferencial es ya una indicación importante de que la presencia de estrógenos, a dosis mayores de las presentes bajo condiciones normales en el animal adulto, modifica de manera diferencial a los diferentes segmentos anatómicos del epidídimo.

Un análisis cuidadoso de los resultados (Fig # 2,3), demuestra que, en todos los casos, el peso de la cola del epidídimo fué significativamente más afectado que el peso de la cabeza de este órgano. Younes y col (1981), han demostrado que los receptores androgénicos se encuentran en mayor cantidad en cabeza y en menor cantidad en cuerpo y cola del epidídimo. Fawcett (1991), asevera que la cabeza del epidídimo es la región metabólicamente más activa y Turner y Roddy (1990), demuestran que la proteína transportadora de andrógenos (ABP) y los mismos andrógenos existen en mayores concentraciones en el lumen y el tejido mismo de la cabeza del epidídimo.

Estos datos, junto con los resultados discutidos anteriormente, parecerían indicar que el tejido epididimario responde de manera diferencial a los andrógenos y a los estrógenos, de manera tal que la cabeza y tal vez la parte inicial del cuerpo son regulados fundamentalmente por la presencia y el nivel de esteroides androgénicos, mientras que el funcionamiento de la cola depende de una manera fundamental de la presencia y el nivel de estrógenos. Nuestros resultados en cuanto a las modificaciones histológicas inducidas por la presencia continua de estrógenos en la rata macho parecerían apoyar esta hipótesis.

De lo más sobresaliente en los cambios que sufre el epitelio epididimal es la cantidad considerable de colágena que se encuentra depositada entre las asas del tubo epididimal y la hiperplasia e hipertrofia de las fibras musculares lisas. Estos cambios a nivel de la lámina propia hacen desaparecer el aspecto lagunar que los vasos linfáticos dan al epidídimo normal. Asimismo, se provoca un colapso del tubo del epidídimo que prácticamente hace desaparecer la cavidad luminal de este.

En cuanto al efecto provocado por la dosis mayor del estradiol a nivel de las células epiteliales del epidídimo, el adelgazamiento de la pared sugiere una pérdida de células y/o una menor proliferación de las células tronco (stem) del epitelio. Además, al microscopio electrónico, la disminución de gránulos de secreción y de retículo endoplásmico rugoso indican un abatimiento en la actividad sintética de los productos de secreción de las células epiteliales. Así mismo la presencia de abundantes lisosomas y aparatos de Golgi en las células epiteliales, que permanecen, sugiere una actividad lítica, probablemente auto destructiva de éstas células.

Finalmente, otro cambio observado fue la presencia de abundantes células linfocíticas de infiltración en el epitelio epididimal. Aunque es difícil explicar que papel juega en estas condiciones del tratamiento, se ha reportado su presencia en otros órganos sometidos a alteraciones patológicas o experimentales.

Todos estos cambios se ven más acentuados en la parte de la cola y en menor grado en la cabeza.

En conclusión, si nuestra hipótesis es cierta, como parecen indicar nuestros resultados y los de muchos otros autores, la funcionalidad del epidídimo como órgano inductor de la llamada maduración del espermatozoide, es decir de la adquisición de la movilidad y la capacidad fertilizante de ésta célula, la cual se realiza en la cabeza y la porción proximal del cuerpo del epidídimo, sería fundamentalmente regulada por la presencia de andrógenos. En cambio las alteraciones terminales de la membrana del espermatozoide, la estructuración final de la compleja disposición nuclear, así como la capacidad de almacenamiento, reabsorción y transporte del epidídimo dependerían de la presencia de estrógenos en el medio ambiente.

En conclusión hemos presentado en este trabajo la primera evidencia clara de que la regulación endócrina del epidídimo se hace diferencialmente en los diferentes segmentos anatómico-funcionales de este órgano, cabeza, cuerpo y cola, y sentado las bases para un estudio mas intencionado de los factores reguladores que participan en algunos de los fenómenos mas importantes para la persistencia de las especies, tales como la maduración epididimaria de los espermatozoides, así como de su transporte, almacenamiento y finalmente de su eyección en el momento de la eyaculación.

A mismo tiempo, los resultados presentados en este trabajo deberían ser tomados en cuenta en todos los intentos de lograr un método de regulación de la fertilidad aplicable al varón, sobre todo en aquellos en que se intenta lograr este resultado por medios endócrinos.

B I B L I O G R A F I A

Amann. Rupert. (1989): Structure and function of the normal testis and epididymis. J. of The American College of Toxicology., vol 8, No. 3: 457-471.

Banks William. (1986): Histología Veterinaria Aplicada. 1ª edic. Edit. Manual Moderno. México.

Baker, G. Murray F.T. Jefferson L. Li, J. and Bardin C. (1980): Perfusion of accessory sex organs and testes. En: Male Accessory Sex Glands. Cap. 12; Ed. Spring-mills & Hafez. Elsevier/North Holland Biomedical Press. p.215-222.

Bedford J., y Calvin H. (1974): Changes in S-S linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observation in sub mammalian species. J. Exp. Zool., 187:181-204.

Briggs M., Briggs M. (1974): Oral contraceptive for men. Nature 252:585-586.

Clearmont, Y. y Harvey C. (1967): The effects of hormones on spermatogenesis in the rat. Endocrinol. 16:173-189.

Clearmont Y., Flannery J. (1970): Mitotic activity in the epithelium of the epididymis in young and old adult rats. Biol. Reproduc. 3:283-292.

Cormack David. (1987): Histología de HAM.9a. edic., edit. Harla., México. p.797-824.

Court M. (1984): The male in farm animal Reproduction. Edit. Institut National de la Recherche Agronomique. France. p. 79-101.

D'Addario D., Turner T., y Howards S. (1980): Effect of vasectomy on the osmolarity of hamster testicular and epididymal intraluminal fluid. J. Androl., 1:167-170.

Danzo B., Pavlou S., Anthony H. (1990): Hormonal regulation of androgen-binding protein in the rat. Endocrinol. 127:2829-2838.

Eddy E., Vermon R. Muller C. Hahnel A. y Fenderson B. (1985): Immunodissection of sperm surface modification during epididymal maturation. Am. J. Anat., 174:225-237.

Fawcett Don. (1991): Tratado de Histología. 11ª. edic., edit. Interamericana., México. p.840-850.

Hall Peter. (1989): Testicular Steroid Synthesis. En: The Physiology of Reproduction., Vol I, capítulo 22. edit. Raven Press, New York.

Hamilton D. (1972): The mammalian epididymis. En: Reproductive Biology. Edit. Glasser. Amsterdam.

Hamilton, Olson, Cooper. (1977): Regional variation in the surface morphology of the epithelium of the rat ductuli efferentes, ducts epididymis an vas deferens. Anat. Rec. 188:13-27.

Hamilton D. y Gould R. (1980): Galactosyltransferasa activity associated with rat epididymis. Anat. Rec. , 196:71

Hammerstedt R., Hay S. y Amann R. (1982): Modification of ram sperm membranes during epididymal transit. Biol. Reprod. 27:745-754.

Hansson V., Ritzen E., French F.S., y Nayfeh S. (1975): Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis. En: Handbook of Physiology. Sec. 7., Vol. 5, edit. Greep y Astwood. Washington., p. 173-201

Hoffer, Hamilton, Fawcett. (1973): The ultraestructure of principal cells and intraepithelial leucocytes in initial segment of the rat epididymis. Anatom. Rec., 175:169-202.

Jenkins, Lechene, Howards. (1980): Concentrations of seven elements in the intraluminal fluids of the rat seminiferous tubules, rete testis, and epididymis. Biol. Reprod. 23: 981-987.

Karnovsky M.J. (1965): A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy J. cel. Biol., 27:137A.

Kevin, Harwood y col. (1980): Regulation of peptide hormone receptor and gonadal steroidogenesis., Recent. Prog. in Horm. Res., vol 36:557-621.

Kretser, Kerr. (1988): The Cytology of the Testis. En: The Physiology of Reprod. Edit. Raven Press. Vol I. Capítulo 20. New York.

Lacy D., Lofts B. (1965). Studies on the structure and function of the mammalian testis. Cytological and histochemical observations after continuous treatment with estrogenic hormone effects of FSH and LH. Proc. Royal Soc. 162:188-197.

Luft J.H. (1961): Improvements in epoxy resins embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9:409-416.

Monesi V. (1982): Espermatogenesis y espermatozoides. En: Células Germinales y Fertilización. edit. Prensa Med. Mex., Vol. 1: 49-85 México.

Monhi. H. y Yanagimachi R. (1980): Characteristics of motor apparatus in testicular epididymal and ejaculated spermatozoa. Exp. Cell Res., 127:191-196.

Morato T., Flores F. (1982): Testículo. En: Fundamentos de endocrinología Clínica. 3a edic. edit. La Prensa Médica Mexicana. México., p.180-204.

Oko R., Hrudka F. (1984): Comparison of the effects of gossypol, estradio -17 beta and testosterone compensation on male rat reproductive organs. Biol. Reprod. 30:1198-1207.

Orgebin-Crist M.C. (1981): Epididymal physiology and sperm maturation. Prog. Reprod. Biol., 8:80-89.

Orgebin-Crist M.C. (1983): The effects of estradiol, tamoxifen, and testosterone on the weights and histology of the epididymis and accessory sex organs of sexually immature rabbits. Endocrinology., Vol 113, No. 5: 1703-1715.

Oyen O., Myklebust F., Scott J., Cadd G., Hansson V., (1990): Subunits of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase show differential and distinct expression patterns during germ cell differentiation. Biol. Reprod. 43(1):46-54.

Rao M., Chinoy N. (1983): Effect of estradiol benzoate on reproductive organs and fertility in the male rat. J. Obstet Gynecol Reprod Biol. 15:189-198.

Reid B. Cleland. (1957): The structure and function of the epididymis. I. The histology of the rat epididymis. Australian Journ. Zool., 5:223-246.

Robaire B., Ewing L., Irby C. y Desjardins C. (1979): Interactions of Testosterone and Estradiol 17 β on the reproductive tract of the Male Rat. Biol. Reprod. 21:455-463.

- Robaire B., Ewing L., Irby D., Desjardins C.** (1979): Interactions of testosterone and Estradiol-17 β on the Reproductive tract of the male rat. *Biol of reprod.* 21:455-463.
- Robaire B., Smith S., y Hales BF.** (1984): Suppression of spermatogenesis by testosterone in adult male rats: effect on fertility, pregnancy outcome, and progeny. *Biol Reprod.* 31:221-230.
- Robaire, Hermo.** (1988): Efferent ducts, Epididymis, and vas deferens: Structure, Functions and their regulation. De: *The Physiology of Reproduction. Vol 2*, edit. Raven Press, New York. p. 999-1080.
- Robb, Amann R. y Killian.** (1978): Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fert.*, 54:103-107.
- Rosado A, Hernandez O.** (1988): Biología molecular del espermatozoide humano. *Ciencia.*, 39:249-260.
- Setchell, B.P.** (1979): Testicular blood supply, lymphatic drainage and secretion of fluid. En: *The Testis. Vol I.*, Academic Press, New York. p. 101-218.
- Setchell B. y Brooks D.** (1988): Anatomy, Vasculature, Innervation, and fluids of the Male Reproductive Tract. En: *The Physiology of Reproduction. Vol I. Cap. 19.* Edit. Raven Press. New York. p.753-837.
- Short R. V.** (1982): Papel de las hormonas en los ciclos sexuales. En: *Hormonas y Reproducción.* Edit. Prensa Med. Mexicana., Tomo 3 cap. 3: 41-52. México.
- Sivella P. McNeilly A. y Collins P.** (1978): A comparison of the effectiveness of FSH, LH and prolactin in the reinitiation of testicular function of hypophysectomized and estrogen-treated rats. *Biol. Reprod.* 17:878-885.
- Stratton, L. Ewing, L. Desjardins, C.** (1973): Efficacy of testosterone filled polydimethylsiloxane implants to maintain plasma testosterone in rabbits. *J. Reprod. Fert.* 35:235-244.
- Sun E., Flickinger C.** (1979): Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. *Am Journal Anat.*, 154:27-55
- Sun E., Flickinger C.** (1980): Morphological characteristics of cells with apical nuclei in the initial segment of the adult rat epididymis. *Anat. Rec.* 196:285-293.

- Suzuki F., Nagano T.** (1980): Epididymal maturation of rat spermatozoa studied by thin sectioning and freeze-fracture. *Biol. Reprod.* 22:1219-1231.
- Swerdloff R., y Walsh P.** (1973): Testosterone and oestradiol suppression of Lh and FSH in adult male rats: duration of castration, duration of treatment and combined treatment. *Acta Endocrin.* 73:11-21
- Turner, Jones, Howards, Ewing, Zegaye.** (1984): On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinology.* 115:1925-1932.
- Turner T., Gleavy J., Harris J.** (1990): Fluid movement in the lumen of the rat epididymis: effect of vasectomy and subsequent vasovasostomy. *J. Androl.* 11:422-428.
- Turner T., Roddy M.,** (1990): Intraluminal androgen binding protein alters 3h-androgen uptake by rat epididymal tubules in vitro. *Biol. Reprod.* 43:414-419.
- The Testis.** (1975): Epididymis and epididymal serum. Vol I. Cap. V. Edit. Academic Press. N.Y. p.139-159.
- Van Beurden W., Mulder E., Jong F., y Van Der Molen H.** (1977): The effect of estrogens on luteinizing hormone plasma levels and on testosterone production in intact and hypophysectomized rats. *Endocrinol.* 101:342-349.
- Wilson, George, Griffin.** (1981): The hormonal control of sexual development. *Science,* 211:1278-1284.
- Yanagimachi R.** (1988): Mammalian Fertilization. En: *The Physiology of Reproduction.* Cap. 5, Vol I. edit. Raven Press. New York. p. 135-185.
- Yen S., Jaffe R.** (1986): Endocrine Regulation of the reproductive system. Vol I. Edit. Saunders. USA. p.177-199.
- Schlegel R., Hammerstedt R., Cofer G., y Kozarsky K.** (1986): Changes in the organization of the lipid bilayer of the plasma membrane during spermatogenesis and epididymal maturation. *Biol. Reprod.,* 34:379-391.
- Yen y Jaffe.** (1986): *Reproductive Endocrinology.* edit. Saunderson Co. Vol. I, Cap. 7: 177-200
- Younes M.A. y Pierrepoint. C.** (1981): Androgen steroid-receptor binding in the canine epididymis. *Prostate.* 2:133-142.
- Zetterqvist H.** (1956): The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Thesis Karolinska Institutet. Estocolmo, Suecia.