



Universitat de Girona

ESTRUCTURA I ULTRAESTRUCTURA TESTICULAR  
DEL MASCLE REPRODUCTOR PORCÍ (*Sus domesticus*)

**Núria GARCIA GIL**

**ISBN: 84-688-6510-9**  
**Dipòsit legal: GI-406-2004**

**ESTRUCTURA I ULTRAESTRUCTURA  
TESTICULAR DEL MASCLE  
REPRODUCTOR PORCÍ  
*(Sus domesticus)***

**Núria Garcia Gil**

**Universitat de Girona  
2002**



Universitat de Girona

**ESTRUCTURA I ULTRAESTRUCTURA  
TESTICULAR DEL MASCLE  
REPRODUCTOR PORCÍ  
(*Sus domesticus*)**

Memòria que presenta Núria Garcia Gil per optar al grau de Doctor per la Universitat de Girona.

Vist-i-plau dels directors,

Dr. Sergi Bonet Marull  
Àrea de Biologia Cel·lular  
Unitat de Reproducció Assistida en Porcí  
Departament de Biologia  
Universitat de Girona

Dra. Ma Dolors Briz González  
Àrea de Biologia Cel·lular  
Unitat de Reproducció Assistida en Porcí  
Departament de Biologia  
Universitat de Girona

Girona, juliol de 2002

# ÍNDEX

---

## AGRAÏMENTS

## INTRODUCCIÓ

### 1. OBJECTIUS DEL TREBALL I ORGANITZACIÓ DE LA MEMÒRIA 1

- 1.1. Objectius del treball de recerca 1
- 1.2. Organització de la memòria 3

### 2. ANTECEDENTS 4

- 2.1. El sector porcí 4
- 2.2. La raça Landrace – varietat anglesa:
  - història, característiques i importància dins el sector porcí 6
- 2.3. Anatomia testicular 8
- 2.4. L'espermatogènesi 11
- 2.5. L'espermiogènesi 14
- 2.6. L'espermatozoide de *Sus domesticus* 16
- 2.7. Factors que influeixen en la fertilitat del mascle reproductor porcí 20
  - 2.7.1. Factors fisiologicoanatòmics 20
  - 2.7.2. Factors ambientals 22
- 2.8. Control de l'espermatogènesi 26
- 2.9. El mascle reproductor porcí com a model animal per a l'estudi de l'anatomia normal i patològica del testicle d'humans 30

## MATERIAL I MÈTODES

### 1. MATERIAL 33

- 1.1. Característiques dels exemplars 33
- 1.2. Obtenció i conservació de les mostres 34

<b>2. MÈTODES</b>	<b>34</b>
2.1. Processament de les mostres testiculars per a Microscòpia Òptica	34
2.2. Processament de les mostres testiculars per a Microscòpia Electrònica de Transmissió	36
2.3. Anàlisi morfològica del testicle	40
2.3.1. La càpsula testicular i el teixit intersticial	40
2.3.2. L'epiteli seminífer	40
2.3.3. El cicle de l'epiteli seminífer	40
2.3.4. L'espermiogènesi	41
2.4. Anàlisi morfomètrica del testicle	42
2.4.1. La càpsula testicular	42
2.4.2. Els vasos sanguinis	43
2.4.3. El percentatge de parènquima testicular ocupat per túbuls seminífers i per teixit intersticial	43
2.4.4. El diàmetre dels túbuls seminífers	44
2.4.5. L'alçada de l'epiteli seminífer en cada estadi	45
2.4.6. La longitud de cada estadi	45
2.4.7. La freqüència relativa de cada estadi	46
2.4.8. La durada relativa de cada estadi	46
2.4.9. El número de cèl·lules de Sertoli respecte al número d'espermatogònies, d'espermatòcits primaris i secundaris i, d'espermàtides arrodonides i en fase d'elongació	47

## ***Capítol 1: ESTRUCTURA TESTICULAR***

<b>RESULTATS</b>	<b>48</b>
1.1. ANÀLISI MORFOLÒGICA I MORFOMÈTRICA DEL TESTICLE	48
1.1.1. La càpsula testicular	49
1.1.1.1. La túnica vaginalis	49
1.1.1.2. La túnica albugínia	50
1.1.1.3. La túnica vasculosa	50
1.1.2. El parènquima testicular	52
1.1.2.1. Els túbuls seminífers	52
1.1.2.2. El teixit intersticial	53

1.2. ELS ESTADIS DEL CICLE DE L'EPITELI SEMINÍFER	55
---	----

<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>65</b>
------------------	-----------

## ***Capítol 2:* ULTRAESTRUCTURA TESTICULAR**

<b>RESULTATS</b>	<b>82</b>
------------------	-----------

2.1. EL TEIXIT INTERSTICIAL	82
-----------------------------	----

2.1.1. Les cèl·lules de Leydig	82
--------------------------------	----

2.1.2. Els fibroblasts	84
------------------------	----

2.1.3. Els mastòcits	84
----------------------	----

2.1.4. Els vasos sanguinis	85
----------------------------	----

2.2. ELS TÚBULS SEMINÍFERS	86
----------------------------	----

2.2.1. La làmina pròpia	86
-------------------------	----

2.2.2. L'epiteli seminífer	87
----------------------------	----

2.2.2.1. Les cèl·lules de Sertoli	87
-----------------------------------	----

2.2.2.2. Les cèl·lules germinals	90
----------------------------------	----

Les espermatogònies	91
---------------------	----

Els espermatòcits	93
-------------------	----

2.2.2.3. Les espermatides i l'espermiogènesi	95
--	----

El nucli i l'embolcall nuclear	99
--------------------------------	----

L'aparell de Golgi i el sistema acrosòmic	100
---	-----

El reticle endoplasmàtic	102
--------------------------	-----

Els centríols i la formació de la peça de connexió	103
--	-----

Les fibres denses	105
-------------------	-----

La beina fibrosa	106
------------------	-----

Els mitocondris	106
-----------------	-----

<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>109</b>
------------------	------------

## **CONCLUSIONS**

- *De la morfologia i la morfometria del testicle* **120**
- *Del cicle de l'epiteli seminífer* **121**
- *De l'espermioquèsi* **122**

## **BIBLIOGRAFIA**

**125**

## AGRAÏMENTS

Vull expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que, directa o indirectament, han col·laborat en la realització d'aquesta tesi doctoral.

En primer lloc, vull agrair expressament a en Sergi la confiança que ha dipositat en mi, la paciència, els bons consells i les hores que m'ha dedicat.

A totes les companyes de la Unitat de Reproducció Assistida en Porcí pel recolzament i ajut donats en algun moment de desànim i, sobretot, per la seva amistat. En particular vull agrair a la Mailo la codirecció i revisió de la tesi, a la Beth haver-me ajudat en l'elaboració dels articles i en la feixuga tasca de positivar les microfotografies de microscòpia electrònica que apareixen en aquesta tesi, a la Sílvia per encomanar-me el seu bon humor i donar-me més d'un cop de mà amb la part experimental del treball, a l'Elena per fer-me riure de tant en tant amb els seus comentaris divertits de "foteta" i per ajudar-me en el processament de les mostres, a la Judit per haver compartit amb mi moltes tardes fent els contactes preliminars de totes les microfotografies de microscòpia electrònica i, a l'Anna i a l'Elisabet per la seva bona disposició en l'*sprint* final.

A tot el personal del Servei de Microscòpia Òptica i Electrònica de la Universitat de Girona, en particular a en Jordi Blàvia, per donar-me multitud de bons consells pràctics i teòrics en la preparació i observació de mostres al microscopi electrònic de transmissió.

Al servei de Sistemes d'Informació Geogràfica i Teledetecció (SIGTE) de la Universitat de Girona per ajudar-me en el càlcul d'àrees a partir de microfotografies.

A la Cesca Rivas, la laborant de la nostra unitat de recerca, perquè amb la seva col·laboració m'ha estalviat molts viatges i temps.

A la meva família per donar-me confiança i suport dia a dia. Als meus pares perquè han posat tant o més entusiasme que jo en aquest projecte, sense ells segurament no hauria pogut ni començar ni acabar. A la Lourdes i a en Xicu i, a l'Emili i a la Marta perquè sempre m'han animat i han compartit amb mi tant les penes com les alegries. Als meus nebots: l'Isaac, la Carla i en Pau per ajudar-me a desconnectar amb els seus jocs, crits, plors i rialles infantils.

Per últim, vull agrair la paciència que ha tingut en David durant tots aquests anys d'estudi, perquè ha suportat i viscut els meus mals humors, els nervis, els moments d'alegria i eufòria, les filosofades sobre possibles hipòtesis i interpretacions, i perquè, sobretot, ha estat amb mi en tot moment.

Probablement m'hagi deixat algú, si és així disculpeu-me i accepteu també el meu agraïment.



# INTRODUCCIÓ

## 1. OBJECTIUS DEL TREBALL I ORGANITZACIÓ DE LA MEMÒRIA

### 1.1. Objectius del treball de recerca

El present treball de recerca té com a objectiu general l'estudi al microscopi òptic i al microscopi electrònic de transmissió del testicle de *Sus domesticus* (raça Landrace – varietat anglesa) a partir de mascles sans adults.

Aquest estudi forma part d'un projecte molt més ampli que es proposa caracteritzar, des del punt de vista estructural i ultraestructural, tots els òrgans que constitueixen l'aparell reproductor masculí de *Sus domesticus*, és a dir, tots els òrgans implicats en la formació i en el transport del semen. L'objectiu principal de tots els Centres d'Inseminació Artificial Porcina i de les Explotacions de Selecció i Multiplicació Porcina és garantir una excel·lent qualitat espermàtica al llarg de la vida reproductiva útil d'un mascle reproductor porcí. Així doncs, un millor coneixement dels patrons estructural i ultraestructural normals dels òrgans reproductors permetrà diagnosticar amb facilitat quina ha estat la funció o l'estructura afectada de l'aparell reproductor masculí quan s'observa una davallada de la qualitat del semen.

Existeixen diversos factors com la temperatura, la llum, el medi ambient, la dieta, l'estrés, les toxines, l'estat sanitari o l'edat que poden alterar la capacitat reproductiva dels mascles en mamífers domèstics i humans (Okwun i col., 1996; Sprando i col., 1999; Dobson i Smith, 2000; Veeramachaneni, 2000; Young i col., 2000; Kandeel i col., 2001). Les alteracions reproductives es manifesten en anomalies en la qualitat del semen i en els nivells hormonals a causa de les alteracions del testicle (espermatogènesi, espermiogènesi,

secreció endocrina de les cèl·lules de Leydig), dels espermiductes (maduració epididimària) i/o de les glàndules accessòries (Gottreich i col., 2000; Pinart i col., 2000). Les anàlisis seminals i hormonals són certament crucials en la valoració d'aquests mascles, però, no són totalment informatives de les alteracions en el tracte reproductor, ja que és necessari conèixer l'organització microscòpica (Okwun i col., 1996; Silber i col., 1997; Sprando i col., 1999; Gottreich i col.; 2000; Pinart i col., 2000).

Per tal de millorar el diagnòstic de la subfertilitat, és important conèixer les característiques morfològiques i morfomètriques dels òrgans reproductors masculins sota condicions normals (Gottreich i col., 2000; Veeramachaneni, 2000). Diversos estudis sobre testicle han demostrat que per a l'avaluació de la funció testicular els marcadors més sensibles són els següents: (1) la grandària testicular, (2) el gruix i l'organització de la càpsula testicular, (3) el percentatge de túbuls seminífers i de teixit intersticial al parènquima testicular, (4) el diàmetre dels túbuls seminífers, (5) l'alçada i la composició de cèl·lules germinals de l'epiteli seminífer, (6) el gruix i l'organització de la làmina pròpia i, (7) la morfologia i la grandària de les cèl·lules de Leydig (Okwun i col., 1996; Ford i col., 1997; Silber i col., 1997; Sprando i col., 1999, 2000). El *primer objectiu* concret del present estudi ha estat, per tant, caracteritzar tots aquests paràmetres testiculars en mascles porcins sans adults. Un millor coneixement de les característiques testiculars i, especialment, dels marcadors testiculars en mascles porcins sans, pot ser de gran utilitat en la identificació de les alteracions testiculars sota condicions patològiques (Okwun i col., 1996; Sprando i col., 1999, 2000; Pinart i col., 2000).

El *segon objectiu* concret d'aquest estudi ha estat descriure els estadis del cicle de l'epiteli seminífer en els mascles reproductors porcins de la raça Landrace, classificats d'acord amb el mètode de la morfologia tubular i, també, estimar llur longitud, freqüència relativa i durada. La divisió del cicle en estadis és fonamental per estudiar qualitativa i quantitativament la diferenciació normal i anormal de les cèl·lules germinals dins el testicle (Paula i col., 1999; Onyango i col., 2000).

El *tercer objectiu* concret del treball ha estat descriure a nivell ultraestructural el procés d'espermioogènesi i, relacionar les transformacions que experimenten les espermàtides en fase d'elongació amb els canvis ultraestructurals que es donen a les diferents cèl·lules que constitueixen el testicle (cèl·lules germinals, de Sertoli i de Leydig, principalment).

## **1.2. Organització de la memòria**

La memòria s'ha estructurat en cinc apartats: Introducció, Material i Mètodes, Resultats i Discussió, Conclusions i Bibliografia. Els resultats obtinguts i llur discussió s'han agrupat en dos capítols titulats: Estructura testicular i Ultraestructura testicular.

A la Introducció es descriu com s'organitza el sector porcí i quina importància té la raça Landrace dins aquest sector. Per altra banda, també es fa una descripció, a partir d'una revisió bibliogràfica, de les característiques anatòmiques del testicle dels mamífers, de l'espermatogènesi i dels factors que l'afecten i la controlen, de la microanatomia de l'espermatozoide de porcí i, finalment, es destaquen els avantatges que ofereix el mascle reproductor porcí com a model animal per a l'estudi de l'anatomia normal i patològica del testicle d'humans.

Al Material i Mètodes es descriuen les característiques dels mascles utilitzats i les tècniques de processament de les mostres per a Microscòpia Òptica i per a Microscòpia Electrònica de Transmissió i, els protocols seguits a les anàlisis morfològica i morfomètrica del testicle. La redacció dels protocols de preparació de mostres s'ha fet d'acord amb l'establert en diversos llibres sobre els aspectes formals per a l'elaboració de la memòria escrita de tesis doctorals i treballs de recerca (Coromina i col., 2000; Rigo i Genescà, 2000).

El primer capítol, titulat Estructura testicular, s'organitza en dos apartats: Resultats i Discussió. Als Resultats s'exposen tant les dades morfomètriques com les característiques histològiques i histoquímiques de: la càpsula testicular i les capes que la constitueixen, el teixit intersticial, la làmina pròpia i l'epiteli seminífer. Dins aquest apartat també es descriuen els estadis del cicle espermatogènic i les seves característiques morfomètriques. A la Discussió es comparen les dades obtingudes amb les presentades per altres autors.

El segon capítol, titulat Ultraestructura testicular, s'ha subdividit també en dos apartats: Resultats i Discussió. A l'apartat de Resultats s'ha fet una descripció ultraestructural detallada de totes les cèl·lules que configuren el testicle dedicant una especial atenció a les cèl·lules germinals. A la Discussió es comparen les dades obtingudes amb les d'altres autors i, es correlacionen els canvis a nivell ultraestructural que experimenten les diferents

cèl·lules que constitueixen l'epiteli seminífer (cèl·lules germinals i de Sertoli) i el teixit intersticial (cèl·lules de Leydig) amb l'estadi del cicle espermatogènic i, més concretament, amb el procés d'espermioogènesi.

A les Conclusions es recullen les dades més rellevants obtingudes a partir del treball de recerca i a la Bibliografia se citen aquelles obres més significatives consultades durant el treball experimental i en l'elaboració de la memòria.

## **2. ANTECEDENTS**

### **2.1. El sector porcí**

L'explotació de l'espècie porcina no és homogènia si la considerem a nivell mundial. En general, es poden distingir 5 models productius diferents els quals es poden associar a 5 zones geogràfiques diferenciades: Europa Occidental, Europa Oriental, Nord-Amèrica, Sud-Amèrica i la Xina. A cada una d'aquestes zones s'aplica un model socioeconòmic productiu diferent.

A grans trets, els 5 models anteriorment esmentats es poden simplificar en 3 sistemes de producció diferents: el sistema extensiu, el sistema semiextensiu i el sistema intensiu. Al sistema extensiu, l'animal està integrat en el medi natural i els nivells d'exigència tècnica i de resultats productius són sensiblement inferiors als dels altres dos models, especialment, al model intensiu. Aquest sistema està àmpliament representat a la Xina i a centre i Sud-Amèrica, però, a Europa i, concretament a Espanya, està en un segon pla. Al sistema semiextensiu l'animal està parcialment integrat al medi natural però, s'aplica la tècnica pecuària en aspectes com l'alimentació, la manipulació i les instal·lacions.

Models d'aquest tipus, sobretot des del punt de vista reproductiu, són fàcils de trobar, per exemple, a Anglaterra, Alemanya o als Estats Units on les femelles reproductores passen

moltes etapes de la seva vida als prats. Al sistema intensiu l'animal està integrat en un medi molt artificial i l'objectiu principal és obtenir un alt rendiment a un cost reduït. Aquest model és el més freqüent a Europa Occidental i és el que s'aplica, fonamentalment, a Espanya.

Les explotacions porcines de tipus intensiu es classifiquen en quatre tipus de granges (Buxadé, 1984): de Selecció, de Multiplicació, de Producció i d'Engreix. Aquestes granges s'organitzen de manera piramidal i mantenen una relació de dependència entre elles.

A les granges de Selecció s'ubiquen les races pures (generalment, Landrace o Large White) i, mitjançant tècniques genètiques, se seleccionen els millors exemplars. Els exemplars escollits es designen com a GGP (Great Grand Parents), dels quals a partir d'encreuaments intraracials, s'obtenen els anomenats GP (Grands Parents). D'entre els GP se seleccionen aquells exemplars amb un elevat índex de fertilitat i de conversió, amb un bon creixement diari i amb una carn de bona qualitat. Aquestes granges són les més complexes des del punt de vista de l'explotació animal, per això és indispensable que reuneixin les millors condicions d'allotjament i de control higiènic i sanitari. Es preveu que els programes de selecció porcina progressin en un futur immediat, ja que tota la investigació i la informació obtingudes a partir del projecte Genoma Humà podrien ser aplicades al sector porcí. Diversos laboratoris estan utilitzant sondes humanes per localitzar gens porcins homòlegs. Així doncs, la genètica molecular pot ser de gran utilitat per identificar els principals gens que afecten la reproducció i altres caràcters importants de producció en porcs; en aquest sentit, s'han trobat alguns gens que controlen la taxa de creixement i la quantitat de greix dels porcs (Webb, 1995).

A les granges de Multiplicació s'encreuen els llinatges selectes procedents de les granges de Selecció per tal d'obtenir femelles reproductores. L'encreuament és interracial, normalment entre mascles GP Large White i femelles GP Landrace. D'aquests encreuaments en resulten els híbrids que superen per efecte de l'heterosi, en alguns aspectes, els seus progenitors.

A les granges de Producció, les femelles reproductores s'aparellen amb els mascles finalitzadors, que poden ser mascles de raça pura (Piétrain, Duroc i Landrace Alemany, Belga o Anglès) o mascles híbrids (p.ex. Piétrain x Large White). La finalitat d'aquests encreuaments és la producció d'animals d'engreix.

A les granges d'Engreix s'obté el producte final. Els resultats de l'engreix estan condicionats per dos tipus de factors (Knap, 1997; Puigvert i col., 1997): (1) factors inherents al propi animal, com són el genotipus i el sexe i, (2) factors externs al propi animal, com són les condicions d'allotjament i maneig, el règim alimentari i l'estat sanitari. La selecció genètica ha permès obtenir uns bons índexs tècnics però, com a contrapartida, també ha comportat una major sensibilitat a factors com l'estrés i la temperatura ambiental. Així doncs, malgrat que l'engreix és un procés senzill, cal tenir cura de la higiene del recinte, controlar el nombre d'animals per cel·la, la temperatura i els nivells d'humitat. La durada del procés d'engreix està condicionada per les exigències del mercat ja que, en últim terme, són les que determinen el pes final dels animals.

A més de les Explotacions de Selecció i Multiplicació Porcina hi ha els Centres d'Inseminació Artificial destinats bàsicament a la producció de dosis seminals d'elevada qualitat sanitària i fecundant. La tècnica de la Inseminació Artificial és actualment una de les eines més emprades en porcicultura per a la producció i millora genètica de l'espècie porcina, ja que a partir d'uns pocs mascles altament seleccionats es poden inseminar un gran nombre de femelles. D'entre els nombrosos avantatges que ofereix aquesta pràctica, cal destacar la disponibilitat d'una gran varietat de línies genètiques sense necessitat d'invertir en mascles reproductors, el que permet al ramader canviar el programa de reproducció de la seva explotació segons la tendència del mercat, sense haver de pensar en les conseqüències econòmiques que podrien derivar de la reposició dels mascles reproductors.

## **2.2. La raça Landrace - varietat anglesa: història, característiques i importància dins el sector porcí**

L'origen de la raça Landrace i de totes les seves varietats se situa a Dinamarca. Segons les referències que existeixen, sembla ser que, entre els anys 1830 i 1840, Dinamarca va importar porcs anglesos, portuguesos, alemanys, espanyols i xinesos per millorar i

desenvolupar les seves races indígenes. El significat etimològic de Landrace és raça del país i, de fet, durant molt temps ho va ser ja que Dinamarca va mantenir el monopoli de la seva explotació. Aquesta actitud la va afavorir el fet que Alemanya l'any 1887 i la Gran Bretanya l'any 1892 van tancar les fronteres a la importació d'animals vius de l'espècie porcina. Com a conseqüència, van augmentar considerablement les exportacions daneses de bacó i els esforços sobre la selecció. L'any 1896 es va crear el primer Centre de Selecció per a la raça Landrace amb l'objectiu de convertir aquesta agrupació racial en la més important del model de l'Europa Occidental. Tots aquests factors van contribuir que Dinamarca mantingués durant molts anys el monopoli de l'explotació d'aquesta raça. Malgrat tot, durant el primer terç del segle XX van arribar Landrace danesos a Suècia a través del contraban. Posteriorment, a través d'exportacions regularitzades, els sementals danesos van contribuir a la formació dels altres tipus de Landrace que avui dia existeixen: anglès, suec, francès, alemany, belga, holandès,...

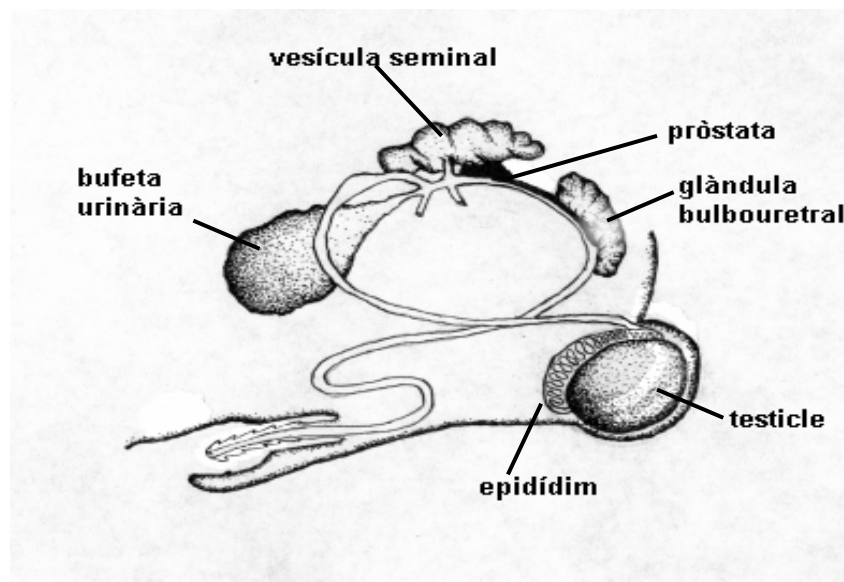
El Landrace anglès (Làm. I - Fig. A), com la resta de varietats Landrace, es troba majoritàriament a tots els països del Nord d'Europa, però el fet que aquesta raça posseeixi uns paràmetres productius tan òptims ha motivat que la seva explotació s'estengués a altres països del continent europeu i del món. L'any 1949, Anglaterra va importar de Dinamarca els primers exemplars Landrace, els quals van ser utilitzats en estudis experimentals. Més tard, l'any 1953, es van produir oficialment noves importacions d'*stocks* de races registrades. Actualment, és Anglaterra el país que està exportant algun dels seus millors exemplars Landrace a la resta del món. Tot i que aquestes exportacions no són tan nombroses com les de Large White, ocupen el segon lloc en les exportacions d'*stocks* porcins d'Anglaterra.

El Landrace anglès presenta les següents característiques morfològiques (Làm. I – Fig. A): color blanc, orelles fortes i caigudes que li tapen bona part de la cara, cos llarg i musculat, línia dorsolumbar recta i ventre recollit, terç anterior i posterior ben desenvolupats i extremitats curtes i robustes. Pel que fa a les característiques productives, el Landrace anglès presenta: carn d'elevada qualitat, bons rendiments a l'engreix, alta docilitat i prolificitat, bona fecunditat i, comparativament amb altres races angleses, un menor gruix de greix dorsal i un creixement molt ràpid de les femelles nul·líparas i dels mascles reproductors joves. En contrapartida, la raça Landrace, en general, és més delicada i menys rústica que, per exemple, la raça Large White.

Les òptimes característiques productives que presenta la raça Landrace han fet que aquesta agrupació racial tingui un paper molt important dins el sistema productiu intensiu, podent ser utilitzada en qualsevol nivell. Els mascles porcins Landrace, o llurs dosis seminals, s'utilitzen, majoritàriament, com a mascles finalitzadors per a l'obtenció d'animals d'engreix.

### **2.3. Anatomia testicular**

Els testicles són les gònades de l'aparell reproductor masculí (Fig. 1 vegeu pàg. 8, Làm. I – Fig. B; Làm. II - Fig. A, Làm. III - Fig. A). Tots els mamífers presenten un parell de testicles, la grandària dels quals sembla que està relacionada amb l'estratègia reproductiva; de manera que, espècies amb una elevada freqüència d'ejaculació, com les espècies polígames, tendeixen a tenir testicles grans, mentre que, les espècies monògames, amb una freqüència d'ejaculació baixa tenen, en general, els testicles més petits (Harcourt i col., 1981).

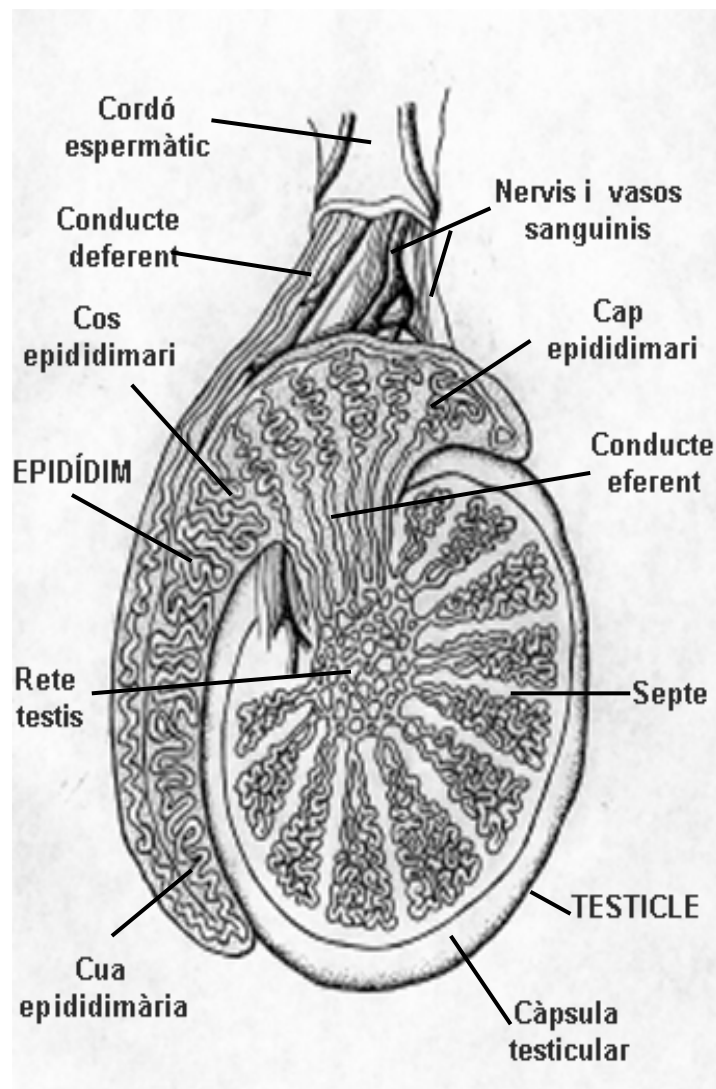


*Figura 1.* Visió lateral de tots els òrgans que formen l'aparell reproductor masculí en porcí.



Els testicles tenen bàsicament dues funcions, una és endocrina i l'altra és la producció d'espermatozoides (espermatogènesi). Ambdós processos tenen lloc en compartiments diferents: el primer es localitza a la zona vascularitzada del teixit intersticial, en concret a les cèl·lules de Leydig, i el segon té lloc a l'epiteli dels túbuls seminífers.

En la majoria de mamífers cada testicle es troba suspès en l'escrot per l'extrem d'un pedicel vascular de teixit conjuntiu, el cordó espermàtic, el qual està format pel conducte deferent, i els vasos sanguinis i nervis que arriben al testicle (Fig. 2 vegeu pàg. 9, Làm. III – Fig. A).



**Figura 2.** Representació esquemàtica del testicle i de l'epidídim de mamífer.

L'organització dels testicles és essencialment la mateixa per a tots els mamífers, tot i que cada espècie presenta unes característiques pròpies. Cada testicle està envoltat per una càpsula gruixuda de naturalesa conjuntiva molt resistent. A partir de la càpsula es formen uns septes de teixit conjuntiu que penetren al testicle, dividint-lo en lòbuls, i convergeixen al centre del testicle en un nucli central de teixit conjuntiu anomenat mediastí testicular. Per sota d'aquesta càpsula fibrosa s'hi distingeix el parènquima seminífer, el qual està constituït pel conjunt de túbuls seminífers i l'estroma o teixit intersticial; aquest últim es localitza entre els túbuls seminífers i conté cèl·lules de Leydig, vasos limfàtics i sanguinis i nervis.

Els túbuls seminífers estan formats per un epitelí estratificat complex constituït per dos tipus cel·lulars: les cèl·lules germinals i les cèl·lules de Sertoli. Les cèl·lules germinals es disposen a diferents nivells de l'epitelí seminífer envoltades pel citoplasma de les cèl·lules de Sertoli el qual s'estén per tota l'alçada de l'epitelí seminífer. La disposició d'aquestes cèl·lules somàtiques facilita la funció de suport de les cèl·lules germinals, la secreció del fluid que omple els túbuls seminífers i d'algunes proteïnes específiques del fluid testicular, la fagocitosi de cèl·lules espermatogèniques en regressió i l'alliberament dels espermatozoides a la llum dels túbuls seminífers. A més, les cèl·lules de Sertoli participen en la sincronització dels esdeveniments espermatogènics. Entre les cèl·lules de Sertoli s'estableixen unes unions que determinen la formació de la barrera hematotesticular. Aquesta barrera protegeix les cèl·lules germinals en desenvolupament d'agents químics circulants en sang potencialment nocius i, crea un microambient controlat perquè els processos vitals de meiosi i espermiogènesi no es vegin afectats; a la vegada, la barrera també impedeix la resposta immunitària enfront de les pròpies cèl·lules haploides (espermàtides). La barrera hematotesticular determina a banda i banda de les unions dos compartiments, tant des del punt de vista anatòmic com funcional: el compartiment basal que conté espermatogònies i espermatozoïts primaris preleptotens i, el compartiment adluminal que conté espermatozoïts primaris en un estat més avançat de desenvolupament, espermatozoïts secundaris, espermàtides arrodonides i espermàtides en fase d'elongació.

El testicle està irrigat pel complex vascular format per l'artèria testicular, la qual s'origina a partir de l'artèria aorta, i les venes testicular i epididimària. A prop del pol distal del testicle, l'artèria es ramifica formant branques que corren per la càpsula i, posteriorment, penetren als septes testiculars. Les venes que abandonen el testicle es divideixen a prop del

pol dorsal per formar el plexe pampiniforme, que envolta l'artèria testicular. Fora del complex vascular hi ha nombrosos vasos limfàtics que s'originen al testicle i a l'epidídim.

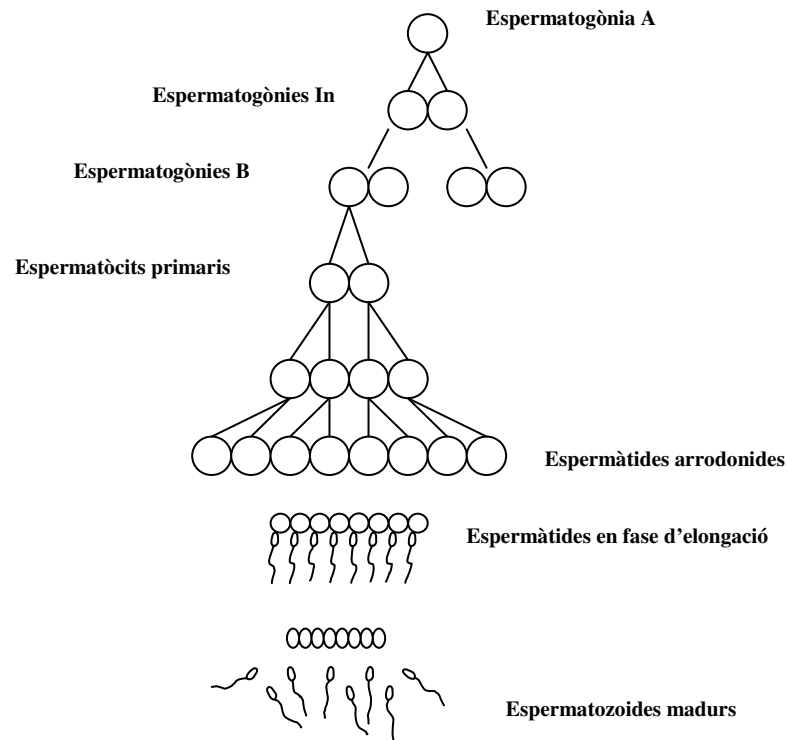
Els testicles estan innervats per fibres nervioses que corren paral·leles a l'artèria testicular. A prop del testicle, els nervis comencen a ramificar-se en nervis més fins que corren conjuntament amb les branques terminals de l'artèria testicular.

## **2.4. L'espermatogènesi**

El conjunt d'esdeveniments que porten a la formació d'espermatozoides madurs a partir de cèl·lules precursors rep el nom d'espermatogènesi. Aquest procés té lloc dins els túbuls seminífers al llarg de tota la vida reproductiva de l'animal. Algunes espècies poden interrompre o subdividir l'espermatogènesi en una sèrie de diferents fases, d'acord amb determinades condicions ambientals que són traduïdes a senyals estimuladors o inhibidors de l'espermatogènesi, aquest seria el cas de la reproducció estacional (Lincoln, 1989). El porc domèstic és capaç de reproduir-se al llarg de tot l'any, però a l'estiu, a causa de les altes temperatures i del fotoperíode disminueix lleugerament la seva eficiència reproductiva, la qual cosa demostra l'existència d'una influència estacional del seu ancestre, el porc salvatge (*Sus scrofa*) que presenta anestre els mesos d'estiu i tardor (Mauget, 1987).

En mamífers l'espermatogènesi és un procés de diferenciació cel·lular altament sincronitzat, regular, llarg i molt complex pel qual una espermatogònia es transforma de manera gradual en una cèl·lula haploide extremadament diferenciada, l'espermatozoide (França i col., 1998, 1999; Paula i col., 1999; Pinart i col., 2000, 2001b). En aquesta diferenciació hi intervenen tres tipus de cèl·lules germinals, les quals estan orientades centrípetament d'acord amb el seu grau de diferenciació: espermatogònies, espermatòcits i espermàtides (França i col., 1999; Paula i col., 1999; Calvo i col., 2000; Pinart i col., 2000, 2001b). Les espermatogònies són les cèl·lules germinals més immadures i se situen a la base del túbul seminífer. Els espermatòcits es localitzen a la part medial de l'epiteli seminífer i, les espermàtides es localitzen a prop del lumen tubular on són alliberades, després d'una sèrie de transformacions, com a espermatozoides.

L'espermatogènesi es divideix en tres fases: l'espermatocitogènesi o mitosi, la meiosi i l'espermiogènesi; cada una d'aquestes tres fases es caracteritza pel desenvolupament d'espermatogònies, espermatòcits i espermàtides, respectivament (Fig. 3 vegeu pàg. 12) (França i col., 1998; 1999; Paula i col., 1999; Pinart i col., 2000, 2001b). En la primera fase de l'espermatogènesi, l'espermatocitogènesi, les espermatogònies es divideixen diverses vegades per mitosi per renovar la seva pròpia població i per produir cíclicament espermatòcits primaris. La meiosi és la segona fase de l'espermatogènesi en què els espermatòcits primaris es divideixen successivament dues vegades amb una única duplicació del material genètic, produint quatre espermàtides haploides. En la fase final, les espermàtides es diferencien en espermatozoides. Aquesta diferenciació és el resultat d'una sèrie de transformacions químiques i citològiques molt complexes que, en conjunt, reben el nom d'espermiogènesi.



**Figura 3.** Dibuix esquemàtic dels esdeveniments seqüencials durant l'espermatogènesi.

L'epiteli seminífer dels animals sexualment madurs conté una o dues generacions d'espermatogònies en contacte amb la membrana basal, una o dues generacions

d'espermatòcits i, una o dues generacions d'espermàtides situades molt a prop del lumen del túbul seminífer. Una generació es defineix com el conjunt de cèl·lules que es troben en el mateix punt de desenvolupament, per tant, aquestes cèl·lules han estat formades al mateix temps i evolucionen de manera sincrònica al llarg del procés espermatogènic. Les diferents generacions de cèl·lules germinals no s'associen a l'atzar, sinó que formen associacions cel·lulars fixes anomenades estadis (Russell i col., 1990; de Kretser i Kerr, 1994; Sharpe, 1994).

En l'examen de diverses seccions histològiques de parènquima seminífer s'observa un nombre limitat d'associacions cel·lulars. Els diferents estadis es van repetint de forma successiva i, com que la seqüència es repeteix indefinidament, l'epiteli seminífer evoluciona en conjunt d'una forma cíclica, de manera que una sèrie completa d'estadis constitueix un cicle de l'epiteli seminífer (Leblond i Clermont, 1952; de Kretser i Kerr, 1994). Per determinar la durada del cicle, la metodologia més emprada és la injecció de timidina tritiada a través de l'artèria testicular. Aquest isòtop s'incorpora selectivament al DNA de les cèl·lules que s'estan preparant per a mitosi o per a meiosi. En l'anàlisi quantitativa de seccions transversals de túbuls seminífers s'observen nombroses cèl·lules marcades que donen valors fiables i reproduïbles de la durada del cicle de l'epiteli seminífer en les diferents espècies de mamífer estudiades. La determinació de la durada del cicle es pot fer amb certa fiabilitat, ja que el cicle de l'epiteli seminífer té un començament i un final ben definits. La determinació de la durada del procés global de l'espermatogènesi presenta més dificultats atès que, no és fàcil definir el punt d'inici (el moment exacte en què l'espermatogònia entra en mitosi) i el punt final (el moment exacte en què els espermatozoides són alliberats de l'epiteli seminífer). La durada de l'espermatogènesi varia segons l'espècie i el criteri utilitzat per definir l'inici i el final del procés.

Com que l'espermatogènesi és un procés continu, la divisió en estadis és artificial i el nombre d'estadis dependrà del criteri (de Kretser i Kerr, 1994; Sharpe, 1994; Paula i col., 1999). Com més exhaustiu és el criteri utilitzat, més específics i detallats són els estadis que s'identifiquen (Paula i col., 1999). Un dels criteris utilitzats per a la identificació d'estadis es basa en les característiques morfològiques de les espermàtides, en particular del nucli i de l'acrosoma (Russell i col., 1990). Amb aquest mètode, el nombre d'estadis i les característiques utilitzades per l'esquema de classificació variaran entre espècies i sovint, en la mateixa espècie, entre investigadors (Paula i col., 1999). Per contra, el mètode de la morfologia tubular es basa en la morfologia de les espermàtides però també, i

sobretot, en la composició de cèl·lules germinals. Aquest mètode proporciona vuit estadis del cicle en tots els mamífers, essent la classificació menys arbitrària, la qual cosa fa que sigui el mètode més emprat (França i col., 1999; Paula i col., 1999).

El cicle de l'epiteli seminífer és un concepte diferent al d'ona de l'epiteli seminífer. Mentre que el cicle de l'epiteli seminífer és un fenomen dinàmic que té lloc en un temps i en una zona determinada de l'epiteli seminífer, l'ona es refereix a la distribució més o menys ordenada dels estadis al llarg de l'epiteli seminífer en un determinat moment.

## **2.5. L'espermioènesi**

La transformació de les espermatides en espermatozoides implica una seqüència molt complexa d'esdeveniments que constitueix el procés d'espermioènesi. Aquest procés és en essència una metamorfosi ja que una cèl·lula haploide arrodonida és converteix en una cèl·lula mòbil altament diferenciada. Tot i que les principals característiques de l'espermioènesi són comunes a totes les espècies, els factors genètics determinen diferències interespecífiques en la morfologia dels espermatozoides. Molts aspectes són visibles amb el microscopi òptic, però els detalls més fins requereixen l'augment i la resolució del microscopi electrònic. Per tant, en aquest apartat de la introducció, es descriuen conjuntament les característiques estructurals i ultraestructurals del procés espermioènic. Els canvis citològics que tenen lloc durant l'espermioènesi es poden dividir en una sèrie de passos de desenvolupament que impliquen diferents orgànuls cel·lulars, però és important remarcar que alguns passos tenen lloc simultàniament. Respecte a aquests canvis els més importants són: la formació de l'acrosoma, la condensació de la cromatina nuclear, el desenvolupament del flagel, la reorganització del citoplasma i dels orgànuls cel·lulars i la pèrdua del material sobrant de l'espermàtida (citoplasma, aigua i orgànuls) que no és necessari per a l'espermatozoide madur. En l'espermioènesi de rata s'han definit 19 passos, en hàmmster 17, en mones 14 i en humans 6 (Clermont i col., 1993). L'espermioènesi de porcí ha estat dividida en 9 passos per Suswillo i Watson (1990) i, en 15 passos per Dadoune i Demoulin (1993). La classificació

proposada per la rata és utilitzada, normalment, com a sistema de referència tant per a estudis al microscopi òptic com al microscopi electrònic.

D'acord amb les modificacions que experimenta el nucli i el sistema acrosòmic en desenvolupament, els diferents passos en què es divideix l'espermioogènesi s'han agrupat en quatre fases: Golgi, caputxó, acrosòmica i de maduració (Guraya, 1987; Wrobel i Dellman, 1998). En seccions histològiques rutinàries, la fase Golgi i la fase caputxó estan caracteritzades per un nucli esfèric, mentre que, la fase acrosòmica i de maduració es caracteritzen per un nucli allargat.

A la fase Golgi, les vesícules de Golgi presenten al seu interior els grànuls proacrosòmics; aquestes vesícules, finalment, es fusionen per formar un únic grànul acrosòmic a l'interior d'una vesícula acrosòmica. Aquesta estructura s'uneix a l'embolcall nuclear provocant una lleugera depressió al nucli i, formant així el pol anterior del futur cap de l'espermatozoide.

Durant la fase caputxó, la vesícula acrosòmica creix i forma l'acrosoma, que cobreix els dos terços anteriors del nucli. Al final d'aquesta fase, l'espermàtida, que encara és esfèrica, es polaritza, ja que el nucli i l'acrosoma són desplaçats a una posició excèntrica. Els dos centríols se situen al pol posterior del nucli i el centríol distal origina el flagel.

A l'inici de la fase acrosòmica, el nucli i el cos cel·lular comencen a allargar-se en direcció distal, al mateix temps les espermàtides giren de tal manera que el nucli s'orienta cap a la perifèria tubular i la cua en desenvolupament cap al lumen tubular. Les espermàtides queden immerses en recessos apicals de les cèl·lules de Sertoli. Quan el nucli comença a allargar-se, les histones nuclears, que són responsables de la disposició espacial normal del DNA nuclear, són gradualment substituïdes per proteïnes bàsiques (protamines), que permeten un empaquetament dens de la cromatina. Després d'aquesta condensació, el DNA és des del punt de vista transcripcional inactiu i més resistent a agents nocius. Durant la fertilització, les protamines han de ser substituïdes per histones abans de la descondensació de la cromatina.

Al llarg de la fase de maduració, la condensació nuclear es completa. En la regió de la futura peça intermèdia de l'espermatozoide, la majoria dels mitocondris es reuneixen al voltant de l'axonema de manera helicoidal. Es desenvolupa el sistema de les fibres denses i la beina fibrosa de la futura peça principal. El volum d'una espermàtida en la fase final de maduració és només del 20 % o del 30 % d'una espermàtida en fase caputxó. Aquesta reducció de mida és conseqüència fonamentalment dels processos autolítics. Els

perllongaments citoplasmàtics de les cèl·lules de Sertoli que envaeixen les espermatides participen en l'absorció de material espermàtic. Abans de l'espermiació, els ponts citoplasmàtics entre les espermatides en fase de maduració desapareixen i els citoplasmes sobrants són eliminats com a cossos residuals. Aquests cossos residuals tenen diferents destins, alguns són fagocitats per les cèl·lules de Sertoli, altres es perden al lumen tubular i altres experimenten una autolisi ràpida quan s'uneixen a l'extrem apical de l'epiteli seminífer. Una petita porció romanent de citoplasma de l'espermàtida, la gota citoplasmàtica dels espermatozoides joves, es perd durant el seu pas per l'epidídim.

## **2.6. L'espermatozoide de *Sus domesticus***

La forma del nucli determina la forma del cap de l'espermatozoide, que ahora és específica d'espècie i està subjecte a grans variacions. En mamífers, els espermatozoides s'agrupen en dues categories principals: els espermatozoides espatulats i els espermatozoides falciformes. Els espermatozoides espatulats tenen el cap més o menys pla o en forma de pala com és el cas de l'espermatozoide de porcí; dins d'aquest grup el cap piriforme o en forma de pera dels espermatozoides d'humans es considera una variant. Els espermatozoides falciformes tenen el cap allargat, corbat i punxegut i, tot i que presenten una àmplia varietat de configuracions amb el cap en forma de falç, l'espermatozoide de rata és el més ben conegut.

L'espermatozoide madur de *Sus domesticus* ha estat recentment descrit de forma molt rigorosa per Bonet i col. (2000). En l'espermatozoide de porcí, de 45 µm de longitud, s'hi distingeixen tres parts: el cap, la peça de connexió o coll i la cua. La cua està formada per tres peces: la intermèdia o mitocondrial, la principal i la terminal.

El cap, de forma oval i plana, presenta una longitud de 7 µm, una amplada màxima de 3,7 µm i un gruix de 0,4 µm. Les dues cares del cap no són iguals; mentre que una és plana, l'altra presenta una protuberància apical en forma de semilluna. En el cap de l'espermatozoide s'hi distingeixen les estructures següents: l'acrosoma, la làmina densa postacrosòmica, l'espai subacrosòmic, el material fibrós perinuclear i el nucli.



L'acrosoma és una vesícula que es disposa sobre el nucli en forma de caputxa i abasta el 80 % de la longitud nuclear. Aquesta part del cap que conté l'acrosoma és coneguda com a regió acrosòmica. Es distingeixen tres segments acrosòmics: apical, principal i equatorial. El segment apical de l'acrosoma és la zona més dilatada de la vesícula acrosòmica.

La làmina densa postacrosòmica es disposa paral·lela per sota de la membrana plasmàtica, abasta el 20 % de la longitud del nucli i coincideix amb la regió del nucli no coberta per la vesícula acrosòmica. Aquesta làmina està formada per una capa homogènia de material fibrós i electrodens.

L'espai subacrosòmic (o perinuclear) és l'espai existent entre el nucli i la membrana acrosòmica interna o la cara interna de la làmina densa postacrosòmica. L'espai subacrosòmic està ocupat per una matriu poc electrodensa i un material fibrós perinuclear de major electrodensitat.

El material fibrós perinuclear (o subacrosòmic) es disposa formant la làmina electrodensa al voltant del nucli. El desenvolupament d'aquesta làmina és màxim en la regió postacrosòmica del cap, mentre que en la regió acrosòmica del cap la làmina és més prima, menys compacta i menys electrodensa.

El nucli conté una cromatina molt condensada i electrodensa. La longitud del nucli és de 6,6 µm, i el gruix varia en les dues regions del cap.

La peça de connexió o coll, de 0,7 µm de longitud per 0,5 µm de gruix, té forma cònica amb la base més ampla en contacte amb el cap, i la més estreta en contacte amb la peça intermèdia. Al llarg del recorregut de la membrana plasmàtica per la peça de connexió i la regió postacrosòmica del cap, s'observa una lleugera escotadura circular just en el límit entre ambdues parts del gàmeta. En la peça de connexió s'hi distingeixen les següents parts: la placa basal, els cossos laminars, el *capitulum*, les columnes segmentades, el cos basal i l'axonema.

La placa basal es troba situada a la base del nucli adherida a la membrana externa de l'embolcall nuclear. La placa basal està formada per un material electrodens, d'aspecte i gruix molt semblants als de la làmina densa postacrosòmica.

Els cossos laminars procedeixen d'evaginacions molt pronunciades de l'embolcall nuclear que contenen un espai lliure de cromatina. Aquestes evaginacions parteixen del perímetre de la base nuclear i s'estenen fins els primers mitocondris de la beina mitocondrial de la peça intermèdia.

El *capitulum* és una estructura arciforme que es disposa per sota de la placa basal. Les columnes segmentades sorgeixen dels extrems del *capitulum* i es dirigeixen cap a la peça intermèdia. Així com els cossos laminars de la peça de connexió es continuen amb la beina mitocondrial de la peça intermèdia, les columnes segmentades es continuen amb les fibres denses de la peça intermèdia.

Les columnes segmentades s'individualitzen en nombre de nou i presenten forma cilíndrica. Aquestes columnes recorren uns 0,8 µm cap a la peça intermèdia i engloben l'axonema.

El cos basal es disposa amb un angle de 45° respecte a l'eix longitudinal del gàmeta a la base de la convexitat que defineixen el *capitulum* i les columnes segmentades.

La cua té forma filamentosa i cilíndrica. La peça intermèdia té una longitud de 9 µm i un diàmetre de 0,7 µm; la peça principal té una longitud de 26,2 µm i un diàmetre de 0,4 µm i, finalment, la peça terminal té una longitud de 2,2 µm i un diàmetre de 0,2 µm.

La peça intermèdia de la cua de l'espermatozoide s'estén des de la part distal de la peça de connexió fins a l'anell de Jensen (anell electrodens que marca el límit entre la peça intermèdia i la peça principal). En la peça intermèdia s'hi distingeixen les estructures següents: l'axonema, la beina mitocondrial, les fibres denses i els grànuls perifèrics.

L'axonema ocupa l'eix central de la peça intermèdia, presenta la fórmula microtubular típica 9+2 i disposa dels elements axonemàtics típics. L'axonema s'estén al llarg de tota la cua de l'espermatozoide i en travessa les tres peces.

Per sota de la membrana plasmàtica trobem la beina mitocondrial, la qual està formada per diversos mitocondris disposats l'un darrere de l'altre helicoidalment al voltant de l'axonema.

Les fibres denses són estructures citoesquelètiques, filamentoses i electrodenses disposades entre la beina mitocondrial i cadascun dels doblets de microtúbuls de l'axonema. S'estenen al llarg de tota la peça intermèdia i del primer terç de la peça principal. El gruix i el diàmetre són màxims a la zona límit amb la peça de connexió i es van reduint progressivament al llarg de les dues peces següents. Les fibres denses presenten forma de piràmide truncada amb la base estreta dirigida cap als doblets microtubulars i amb la base ampla, de contorn curvilini, dirigida cap a la beina mitocondrial. No totes les fibres denses

presenten el mateix gruix i diàmetre, a més les fibres es van afinant al llarg del seu trajecte per la regió mitocondrial.

Els grànuls perifèrics poden observar-se únicament en la zona proximal de la peça intermèdia, distribuïts entre les fibres denses.

La peça principal és el segment més llarg de la cua i s'estén des de l'anell de Jensen fins a l'extrem proximal de la peça terminal. En la peça principal s'hi distingeix: la beina fibrosa, les fibres denses, l'axonema i l'anell de Jensen.

La beina fibrosa de la peça principal presenta una electrodensitat molt elevada, i substitueix la beina mitocondrial de la peça intermèdia. La beina fibrosa està formada per dos eixos longitudinals continus i coplanars amb la parella de microtúbuls centrals que es troben units per una sèrie de costelles que formen circumferències distribuïdes regularment al voltant de la peça principal. Els eixos fibrosos es disposen entre la membrana plasmàtica i les fibres denses número 3 i 8. El gruix dels eixos és màxim en el primer terç de la peça principal i, al llarg dels dos terços següents, disminueix progressivament fins a equiparar-se amb el gruix de les costelles.

Les fibres denses, s'estenen únicament al llarg del primer terç de la peça principal, ja que van disminuint progressivament de gruix fins a desaparèixer. Els dos terços posteriors de la peça principal es distingeixen del primer terç per l'absència de fibres denses i perquè el gruix dels eixos fibrosos s'igualava al de les costelles fibroses. El gruix de les costelles, juntament amb el gruix dels eixos, es va reduint progressivament a mesura que la beina fibrosa s'aproxima a la peça terminal.

L'anell de Jensen és una estructura electrodensa disposada per sota de la membrana plasmàtica, i en el límit de la peça intermèdia i la peça principal. La membrana plasmàtica s'adhereix estretament a l'anell de tal manera que separa la beina mitocondrial de la beina fibrosa i impedeix el pas dels mitocondris cap a la peça principal.

La peça terminal és l'últim i més curt segment de la cua de l'espermatozoide. En aquesta peça no hi ha cap estructura citoesquelètica. La peça terminal està formada, únicament, per l'axonema envoltat per la membrana plasmàtica. L'axonema es desorganitza progressivament a mesura que s'allunya de la peça principal.

## **2.7. Factors que influeixen en la fertilitat del mascle reproductor porcí**

Existeixen diversos factors, tant endògens com exògens, que influeixen sobre la funció reproductora de l'espècie porcina. Quan un factor altera la funció reproductora d'un mascle reproductor porcí ho fa, de manera habitual, alterant la libibo i/o la producció, qualitat i capacitat fecundant del semen.

Entre els factors que afecten la qualitat espermàtica i, per tant, la fertilitat dels mascles porcins, cal destacar: el pes i la grandària dels testicles, l'edat, la raça, el genotipus, el ritme d'extraccions, la temperatura ambiental, el fotoperíode, l'estació de l'any, les condicions d'allotjament i maneig, el règim alimentari, l'estat sanitari i els trastorns orgànics de l'aparell reproductor.

### **2.7.1. Factors fisiologicoanatòmics**

#### *(a) La grandària testicular*

Existeix una correlació positiva entre la grandària testicular i la producció d'espermatozoides (Cameron, 1982; Trudeau i Sanford, 1989; Berndtson i Thompson, 1990a, 1990b; Dadoune i Demoulin, 1993). Alhora, la mida dels testicles està condicionada per diversos factors com: l'edat, la raça i el genotipus.

#### *(b) L'edat*

La producció espermàtica augmenta amb l'edat, justament, perquè augmenta la mida dels testicles (Sánchez i col., 1989; Berndtson i Thompson, 1990a, 1990b; Buxadé, 1984; Cameron, 1990). Tot i que els mascles porcins comencen a produir espermatozoides des dels 3-4 mesos d'edat, la producció espermàtica no assoleix els nivells normals fins als 7-8 mesos d'edat i, en alguns casos, la maduresa sexual no arriba fins als 8-9 mesos.

*(c) La raça*

La raça influeix en la grandària dels testicles i, per tant, en la producció espermàtica (Flowers, 1997; Gordon, 1997). Existeixen diferències significatives entre les diferents races quant a producció espermàtica; en general, les races amb una elevada massa corporal i/o amb una marcada aptitud maternal (p.ex.: Large White, Landrace i Yorkshire) tenen uns testicles més grans que les races amb aptitud càrnica (p.ex.: Blanc Belga i Piétrain) (Martín, 1982; Buxadé, 1984; Gordon, 1997).

Les línies d'una raça altament selectes mostren menor fertilitat si se les compara amb les línies d'animals no tan seleccionades de la mateixa raça (Hudghes i Varley, 1980). La disminució de la capacitat reproductora dels animals seleccionats s'atribueix a un desequilibri fisiològic originat per la mateixa selecció (Gordon, 1997). Per altra banda, és conegut que la consanguinitat té un efecte negatiu sobre la fertilitat, mentre que, l'heterosi l'afavoreix.

*(d) El genotipus*

Quant a la grandària testicular hi ha diferències individuals molt marcades dins una mateixa raça. Existeixen línies o famílies que es caracteritzen per tenir una grandària testicular significativament superior a la mitjana poblacional pròpia de la raça a la qual pertanyen (Buxadé, 1984; Flowers, 1997). Les característiques relacionades amb la fertilitat tenen, en termes generals, una heretabilitat mitjana o baixa, de manera que la variabilitat genotípica depèn pràcticament dels factors ambientals (Gordon, 1997).

*(e) El ritme d'extraccions*

La freqüència de recollida de semen és un factor important a tenir en compte (Buxadé, 1984; Pérez, 1991; Bonet i col., 1992, 1993; Cooper i col., 1993; Matilsky i col., 1993; Briz i col., 1995). Durant l'ejaculació es produeix l'expulsió dels espermatozoides madurs que es troben a la cua de l'epidídim. Els espermatozoides, produïts al testicle, tarden de 7 a 8 dies en arribar a la cua de l'epidídim. Aquest procés no s'accelera per la intervenció de factors externs, així que, un nombre excessiu d'extraccions seminals, sense descans, és altament perjudicial perquè produeix: (1) un ràpid esgotament de la reserva

d'espermatozoides de l'epidídim, (2) una sensible reducció del nombre d'espermatozoides per ejaculat i, (3) una possible ejaculació d'espermatozoides que no han arribat a madurar.

Contràriament, el fet de reduir el ritme d'extraccions més d'una setmana també és perjudicial perquè causa: (1) una menor producció d'espermatozoides com a conseqüència del gran nombre d'espermatozoides acumulats a la cua de l'epidídim, els quals actuen impedit el seu propi trànsit, inhibint al seu torn l'espermatogènesi i desaprofitant, per tant, el potencial de l'animal i, (2) un augment del nombre d'espermatozoides envellits la qual cosa provoca una reducció del poder fecundant del semen i una davallada del període de conservació del semen destinat a inseminació artificial.

D'acord amb aquestes dades, per tal d'aprofitar al màxim el potencial del mascle porcí, l'interval òptim de recollida és de 3-4 dies (2 cops per setmana i de forma regular, així s'aconsegueix que la producció d'espermatozoides sigui homogènia i constant en el temps, malgrat que el mascle porcí presenta, igualment, una producció d'espermatozoides força constant i regular) (Hughes i Varley, 1980).

### **2.7.2. Factors ambientals**

#### *(a) La temperatura*

La producció d'espermatozoides es veu influenciada tant per les altes temperatures com per les baixes temperatures (Cameron i Blackshaw, 1980; Buxadé, 1984; Malmgrem i Larsson, 1984; Sánchez i col., 1989; Colenbrander i Kemp, 1989, 1990; Cameron, 1990; Pérez, 1991; Flowers, 1997). Segons Fuentes i col. (1993) les temperatures elevades (30-35 °C) no redueixen l'impuls sexual dels porcs, no obstant, sí que redueixen sensiblement la quantitat i qualitat del semen, ja que es produeix: (1) una disminució de la concentració d'espermatozoides per ml, (2) una reducció del 50 % de la motilitat dels espermatozoides i, (3) un augment del nombre d'espermatozoides amb l'acrosoma anòmal. L'efecte de les temperatures elevades sobre la qualitat del semen es prolonga fins a les 6 setmanes després d'haver desaparegut aquest efecte (Christenson, 1973). Actualment es creu que l'efecte negatiu de la temperatura és conseqüència més que de la mateixa temperatura, de les oscil·lacions d'aquesta (Aleandri i col., 1996). Les baixes temperatures no semblen tenir

cap efecte negatiu sobre la qualitat del semen; segons Buxadé (1984) el fred no modifica la producció i la qualitat dels espermatozoides però, sí que en facilita l'excreció. També sembla ser que el fred estimula el creixement testicular dels mascles porcins joves (Buxadé, 1984).

*(b) El fotoperíode*

La llum juga un paper molt important en el procés de producció d'espermatozoides. En general, es considera que el fotoperíode estimula l'espermatogènesi (Flowers, 1997). No obstant, s'ha comprovat que fotoperíodes superiors a 16 hores produeixen una davallada del poder fecundant del semen (Hoagland i Diekman, 1982; Buxadé, 1984; Sánchez i col., 1989; Trudeau i Sanford, 1989; Pérez, 1991). D'altra banda, el manteniment dels mascles en foscor absoluta comporta: una reducció del volum d'ejaculat, un lleuger descens del nombre d'espermatozoides vius i un increment del percentatge de les malformacions espermàtiques (Buxadé, 1984). Un estudi recent (Sancho, 2002) demostra que aquestes alteracions seminals són conseqüència d'una disminució de la producció testicular i d'anomalies en la diferenciació testicular i epididimària dels espermatozoides. Aquest mateix estudi conclou que els mascles porcins sotmesos tant a llum contínua com a foscor absoluta no modifiquen la resistència osmòtica dels acrosomes ni la vitalitat i motilitat espermàtiques, per tant, aquests dos fotoperíodes no afecten la diferenciació de l'acrosoma, del nucli i del flagel, respectivament. Per altra banda, Sancho (2002) també ha demostrat que, en aquestes condicions lumíniques, l'activitat de les glàndules accessòries no es veu alterada, almenys des del punt de vista quantitatiu, ja que ni el volum ni el pH es modifiquen.

*(c) L'estació de l'any*

La qualitat del semen varia d'acord amb l'estació de l'any, com a conseqüència, en realitat, dels factors llum i temperatura (Pérez, 1991; Roser i Hughes, 1992; Fuentes i col., 1993). La qualitat del semen és òptima a l'hivern perquè les temperatures són baixes i els dies curts. A l'estiu, en canvi, la qualitat seminal disminueix considerablement a causa de les altes temperatures i els dies llargs. Aquests factors afecten també les femelles reproductores i, per tant, hi ha una addició d'efectes que determinen en conjunt una important davallada de la productivitat de les granges durant els mesos d'estiu.

*(d) Les condicions d'allotjament i maneig*

Per tal d'aconseguir un bon desenvolupament del mascle reproductor porcí i, en conseqüència, una òptima producció de semen, és necessari que els mascles puguin fer exercici físic, preferentment, sobre un parc de terra, ja que s'ha demostrat que en aquestes condicions arriben abans a la pubertat i mostren més desig sexual (Buxadé, 1984).

És recomanable mantenir els mascles adults aïllats a causa del seu comportament inestable. Els mascles mantinguts en allotjaments individuals totalment aïllats (sense veure ni olorar altres individus) produeixen un volum superior de semen i d'espermatozoides que presenten, alhora, una major vitalitat (Martín, 1990a, 1990b; Le Dividich, 1996).

El maneig, a més, ha de ser molt especial essent aconsellable que el cuidador sigui sempre el mateix i, que la manipulació es faci amb destresa i delicadesa. El mascle reproductor ha de ser ben tractat i manipulat a fi que el seu comportament sigui el més desitjable possible per tal d'aconseguir el màxim rendiment de l'explotació.

*(e) El règim alimentari*

Tant la subalimentació com la sobrealimentació provoquen alteracions de caire reproductiu (Martín 1990a, 1990b; Le Dividich, 1996; Flowers, 1997).

La subalimentació origina un retard en l'aparició de la pubertat al mascle, una disminució de la libido i del vigor sexual i, una reducció de la qualitat del semen. La subalimentació abans de la pubertat provoca un mal desenvolupament del sistema endocrí, el qual és pràcticament irreversible i, en conseqüència, no es pot compensar amb una alimentació posterior abundant. Els efectes de la sobrealimentació també són negatius i consisteixen en un escurçament de la vida sexual i en una degeneració del parènquima testicular.

Dins de la mateixa ració s'ha de tenir en compte, per la seva influència en la producció espermàtica:

*El nivell proteic de la ració.* Les dietes hipoprotèiques afecten tot l'organisme i, conseqüentment, els teixits gonadals, el que deriva en una reducció de la producció espermàtica i en una lleugera alteració de la qualitat del semen (Kemp i Hartog, 1990; Kemp, 1991; Louis i col., 1992). Les dietes hiperprotèiques tenen un efecte beneficiós pràcticament només quan el mascle porcí es troba en una situació negativa de desnutrició (Buxadé, 1984). Per tant, el consum de proteïna influeix sobre la quantitat



de semen produït però, té poc efecte sobre la qualitat seminal o la libido del mascle porcí.

*Els aminoàcids essencials.* Un increment a la ració de metionina i cisteïna comporta un increment de la producció espermàtica (Kemp i Hartog, 1990).

*Les vitamines A, B, C, D i E.* La vitamina A és la més important ja que actua com a protectora dels epitelis seminífers evitant que es desencadenin lesions que perjudiquin l'espermatogènesi. A més, la vitamina A juntament amb el complex B i la vitamina C són importants per estimular la libido, incrementar el vigor sexual i afavorir el nombre, motilitat i vitalitat dels espermatozoides. La deficiència d'aquestes vitamines provoca una inhibició de la producció espermàtica. Un suplement de vitamina E té efectes beneficiosos perquè augmenta molt significativament la concentració i qualitat espermàtiques (Brzezinska-Slebodzinska i col., 1995).

*Minerals.* La deficiència de fòsfor condueix a l'esterilitat. Un dèficit de manganès provoca una reducció de la libido i, nivells baixos de molibdè comporten una disminució del volum seminal a conseqüència del deteriorament de les cèl·lules de Leydig (Buxadé, 1984).

*(f) L'estat sanitari i els trastorns orgànics de l'aparell reproductor*

El manteniment d'un bon estat sanitari dels mascles és molt important ja que són nombroses les explotacions contaminades per la compra de nous reproductors, encara que només es tracti d'un sol animal. Són diverses les malalties provocades tant per virus com per bacteris que tenen incidència directa o indirecta en l'àmbit sexual del mascle porcí. En general, els virus causen una infecció generalitzada amb una localització sexual secundària. L'herpesvirus PHV I, responsable de la malaltia d'Aujeszky, fa que els mascles no immunes a aquest virus presentin anomalies espermàtiques com a conseqüència de la febre, la qual remet a les 6 setmanes (López, 1999). El virus PRRS, causant de la síndrome respiratòria-reproductiva, provoca una disminució de la libido i, com que es multiplica en les cèl·lules germinals dels túbuls seminífers i en els macròfags testiculars, altera la qualitat espermàtica (Pietro i Castro, 1998; Osorio, 2001). El semen contaminat dels mascles infectats pel PRRS es transmet per via venèria a les femelles, la qual cosa provoca virèmia en les truges contaminades i el desenvolupament de la malaltia. Malgrat tot, les principals malalties que afecten negativament el potencial reproductiu són les provocades bàsicament

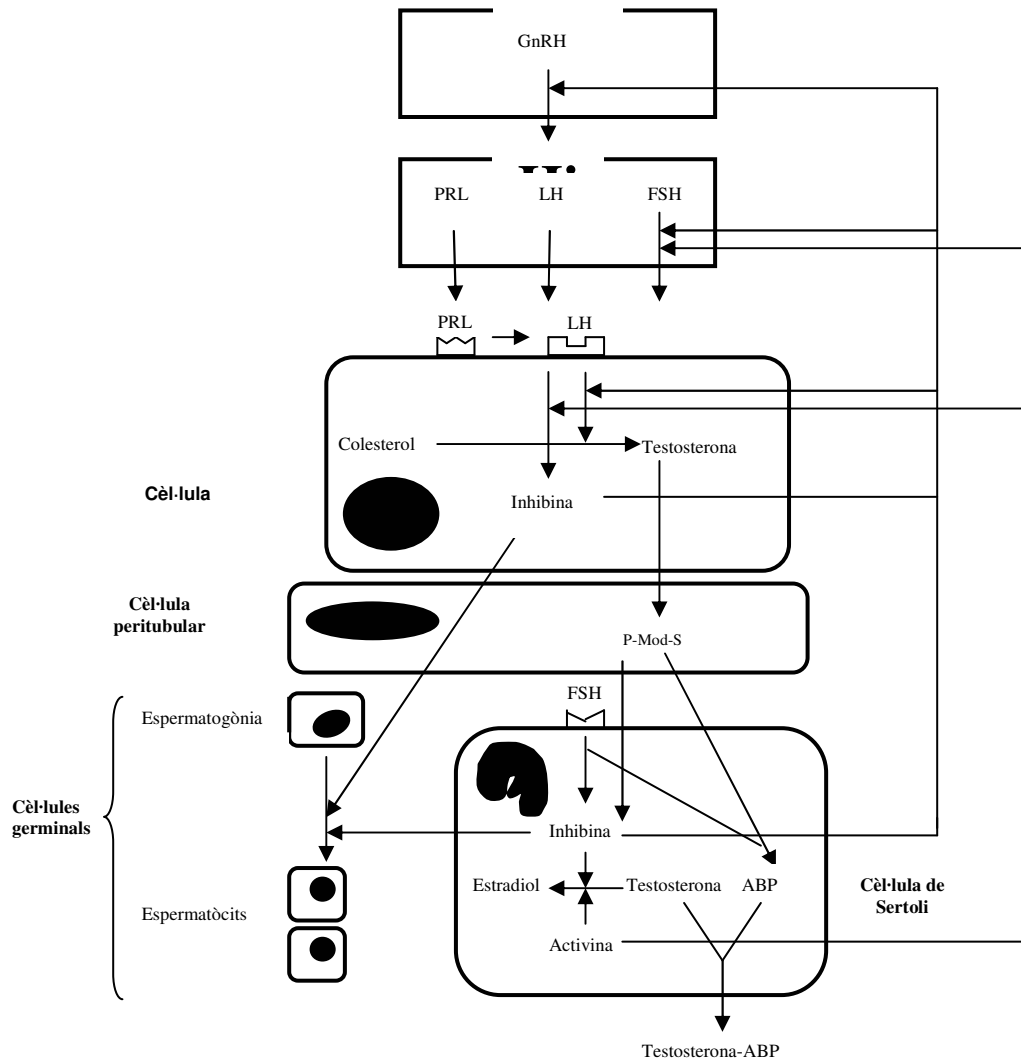
per bacteris (Séculi i col., 1980; Buergelt, 1997). El bacteri *Brucella spp* es transmet per via venèria i afecta directament els òrgans genitals la qual cosa ocasiona orquitis, epididimitis, inflamació de les glàndules accessòries, probable atrofia testicular, progressiva pèrdua de la libido, impotència i esterilitat. Els *Mycoplasmas hyosynoviae* i *hyorhinis* poden localitzar-se a l'escrot i òrgans genitals i reduir la qualitat del semen. L'*Erysipelothrix insidiosa* provoca l'alteració de l'epiteli seminífer la qual cosa provoca una reducció de la fertilitat durant algunes setmanes. El semen del mascle pot actuar com a portador de bacteris com *Corynebacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. que, tot i que es poden aïllar dels òrgans genitals del mascle, no són ells els que desenvolupen la malaltia, sinó que, per contagi veneri, provoquen baixos índexs de concepció, mortinatalitat, camades menys nombroses i metritis, mastitis i agalaxia a les femelles.

Els trastorns testiculars més freqüents són la criptorquídia, la hipoplàsia testicular, l'hermafroditisme, l'orquitis, la degeneració testicular i la neoplàsia testicular (Séculi i col., 1980; LeBlanc, 1993; Buergelt, 1997).

## **2.8. Control de l'espermatogènesi**

Els testicles tenen dues funcions principals, l'espermatogènesi i la producció d'andrògens (Fig. 4 vegeu pàg. 27). Aquestes dues funcions estan controlades per l'activitat secretora de l'hipotàlem i de la hipòfisi. L'hipotàlem secreta el factor alliberador de gonadotropines (GnRH) el qual, quan arriba a la hipòfisi provoca l'alliberament de l'hormona luteinizant (LH), l'hormona fol·liculoestimulant (FSH) i la prolactina (PRL).

La secreció hipotalàmica de GnRH està regulada pels nivells de melatonina (Arendt, 1998). Aquesta hormona es sintetitza a la glàndula pineal sota l'estímul del ritme circadiari de llum-fosc. Malgrat la controvèrsia existent, s'ha comprovat que en el porc domèstic la síntesi i secreció de melatonina es veu estimulada per la fase de fosc i decreix en la fotofase (Brandt i col., 1986; Minton i col., 1989; Diekman i col., 1992).



**Figura 4.** Representació esquemàtica de les principals vies de regulació de la funció testicular.

La LH estimula les cèl·lules de Leydig per a que produeixin testosterona; alhora, el nivell circulant d'aquest androgen regula la producció de LH per mitjà d'un mecanisme de retroalimentació negativa sobre l'hipotàlem i la hipòfisi (Hadley, 1997).

La FSH estimula les cèl·lules de Sertoli per a que produeixin, principalment, la proteïna fixadora d'andrògens (ABP) la qual s'uneix a la testosterona. Aquesta proteïna d'unió facilita un mecanisme d'emmagatzematge de testosterona proper als espermatòcits, la maduració dels quals és dependent d'aquesta hormona. En primats, la FSH estimula la multiplicació de les espermatogònies Ap i manté uns nombres normals d'espermatòcits i espermatides, no obstant, la FSH no pot sostenir per si sola una espermiogènesi normal (Weinbauer i col., 1991; Hadley, 1997; Plant i Marshall, 2001). Com que les cèl·lules germinals deficientes en receptors per andrògens poden desenvolupar-se com a espermatòcits fèrtils en presència de cèl·lules de Sertoli normals, es creu que els efectes dels andrògens sobre l'espermatogènesi es troben mediat per aquestes cèl·lules. L'ABP pot actuar alhora com un mecanisme d'acumulació de testosterona a l'interior de les cèl·lules de Sertoli, que permet alliberar, sota estímul, aquesta hormona al lumen dels túbuls seminífers. En el lumen tubular, l'ABP funciona com a mitjà de transport de la testosterona fins a l'epidídim, on els espermatozoides acaben de madurar i adquireixen el potencial per a la fertilització i la motilitat.

Les cèl·lules peritubulars sintetitzen i alliberen una proteïna que estimula les cèl·lules de Sertoli a secretar ABP i transferrina, alhora que inhibeix l'activitat aromatasada estimulada per FSH. Skinner (1991) va anomenar a aquesta proteïna S-Mod-P (proteïna moduladora de les cèl·lules de Sertoli). El paper de la transferrina encara és incert, però s'ha vist una correlació positiva entre els nivells d'aquesta proteïna al plasma seminal i el nombre d'espermatozoides a l'ejaculat (Dadoune i Demoulin, 1993).

La FSH i la testosterona són essencials per iniciar el procés d'espermatogènesi durant la maduració sexual (Spiteri-Grech i Nieschlag, 1993; Plant i Marshall, 2001). La FSH, per si sola, mai s'ha descrit que fos capaç d'iniciar o mantenir l'espermatogènesi en mascles, mentre que la LH és capaç d'estimular la producció d'espermatozoides quan existeixen deficiències en la producció de gonadotropines (Weinbauer i col., 1991; Hadley, 1997). En alguns casos però, cal una combinació d'ambdues hormones perquè el procés pugui iniciar-se.

La PRL estimula l'esteroidogènesi ja que incrementa, d'una banda, el nombre de receptors de LH a les cèl·lules de Leydig i, d'altra banda, l'afinitat d'aquests receptors pel seu

l·ligand. Aquest efecte favorable de la PRL no s'observa sempre, ja que, a nivells baixos, sembla tenir una funció inhibidora (Dadoune i Demoulin, 1993).

Moltes altres hormones interfereixen en les funcions testiculars. Al testicle s'han detectat receptors per al cortisol i la insulina. El cortisol actua reduint els nivells plasmàtics de testosterona en humans, mentre que, la insulina millora l'esteroidogènesi. Les patologies de les glàndules tiroides, adrenal i pancreàtica s'associen regularment a deficiències espermatogèniques. La inhibina, la qual és elaborada tant per les cèl·lules de Leydig com per les cèl·lules de Sertoli, redueix la secreció hipofisiària de FSH (Fingscheidt i col., 1990) però, també suprimeix la secreció de FSH via acció hipotalàmica (Hadley, 1997). Les cèl·lules de Sertoli, per si mateixes, no són capaces de reduir els nivells de FSH en absència d'espermatogènesi, el que indica, que la producció d'inhibina per les cèl·lules de Sertoli estaria regulada d'alguna manera pels espermatozoides en maduració. L'activina té l'efecte oposat a la inhibina, és a dir, estimula la secreció de FSH per part de les cèl·lules hipofisiàries però, no influencia la secreció de LH.

Els nivells plasmàtics de LH són completament androgenodependents, mentre que, els nivells de FSH són igualment regulats per testosterona i inhibina (de Kretser i col., 1987).

Les funcions de les diferents poblacions cel·lulars del testicle no depenen únicament de les hormones, sinó que també depenen de les anomenades parahormones, les quals estan implicades en mecanismes de regulació paracrina i autocrina (Hecht, 1990). Tant les cèl·lules de Leydig com les cèl·lules de Sertoli secreten diferents parahormones que actuen directament les unes sobre les altres o, via cèl·lules peritubulars, sobre l'epiteli vascular (Demoulin i col., 1989). Molts factors de creixement que actuen com a parahormones han estat identificats al testicle (Dadoune i Demoulin, 1993; Gnessi i col., 1997; Mackay, 2000; Mariani i col., 2002).

## **2.9. El mascle reproductor porcí com a model animal per a l'estudi de l'anatomia normal i patològica del testicle d'humans**

El mascle reproductor porcí pot ser utilitzat com a model animal per a l'estudi de les lesions estructurals i ultraestructurals en el testicle produïdes per factors exògens o endògens. Existeixen una sèrie de motius que avalen l'ús dels mascles reproductors porcins com a model animal:

- (a) *L'elevada producció espermàtica dels mascles porcins* (Martín, 1982 i 1990b; Bahamonde, 1987). Els porcs i els toros tenen una producció espermàtica molt superior a la de l'home i els rosegadors. Aquesta major producció espermàtica, juntament amb l'elevat volum d'ejaculat (200-300 ml), fa que el mascle reproductor porcí sigui un model idoni per a l'estudi de les lesions en el procés espermatogènic i de les alteracions quantitatives i qualitatives de l'esperma. L'estudi de les anomalies espermàtiques de l'ejaculat s'utilitza en moltes espècies per diagnosticar els factors que, possiblement, les han induït.
- (b) *La similitud estructural dels espermatozoides d'humans i de porcí* (Guraya, 1987). L'espermatozoide humà presenta una major similitud estructural i ultraestructural amb l'espermatozoide de porcí que amb l'espermatozoide de rosegadors. Aquesta similitud en l'organització permet correlacionar els tipus d'anomalies espermàtiques presents en l'ejaculat de mascles porcins que pateixen una determinada patologia amb les d'humans en les mateixes condicions.
- (c) *Les similituds estructurals del testicle d'humà i de porcí* (Setchell, 1991; Dadoune i Demoulin, 1993; Setchell i col., 1994). Els testicles d'humans i porcins presenten setpes testiculars que divideixen el parènquima seminífer en diferents compartiments; en rosegadors l'absència d'aquests setpes determina que cada testicle s'organitzi com una massa parenquimàtica uniforme. Humans i porcins també mostren una gran similitud en els mecanismes de termoregulació testicular; així, les seves càpsules testiculars són riques en cèl·lules musculars llises que faciliten el flux testicular. La càpsula testicular de rosegadors no conté cèl·lules musculars llises, sinó una escassa població de miofibroblasts.

(d) *Les característiques estructurals i ultraestructurals específiques del testicle de mascles porcins* (Setchell, 1991; Setchell i col., 1994). El testicle dels mascles porcins presenta unes característiques morfològiques que el capaciten com a model per a l'estudi de les lesions en el teixit intersticial, l'epiteli seminífer i la làmina pròpia. El teixit intersticial en mascles porcins representa el 40 % del volum testicular, mentre que, en humans i en rosegadors representa el 30 % i el 15 %, respectivament. Per tant, l'estudi de les lesions del teixit conjuntiu i de la vascularització es faran més evidents en el teixit intersticial del testicle dels mascles porcins. A més, les cèl·lules de Leydig de porcins mostren un gran desenvolupament si es compara amb les d'humà i les de rosegadors. El nombre de cèl·lules de Leydig per gram de testicle és de  $90 \times 10^6$  en porcins i de  $15 \times 10^6$  en rosegadors, d'altra banda, el diàmetre de les cèl·lules de Leydig en porcí és d'uns 20  $\mu\text{m}$  i en humans d'uns 10  $\mu\text{m}$ . A més, l'aparell de Golgi de les cèl·lules de Leydig presenta un desenvolupament màxim en porcins; si, tot i que es desconeix a través de quin mecanisme un estímul gonadotròpic determina un major desenvolupament de l'aparell de Golgi, les cèl·lules de Leydig de porcí seran un model idoni per a l'estudi de les seves alteracions.

El cicle de l'epiteli seminífer dura 8,6 dies en porcins i 16 dies en humans (Heller i Clermont, 1963; Swierstra, 1968). En porcins l'espermatogènesi es realitza durant 34 dies, en quatre cicles, i en l'home, malgrat que també es dona en quatre cicles, dura 64 dies. Així doncs, les lesions produïdes durant l'espermatogènesi es manifestaran abans en porcins que en humans. A més, la major celeritat de l'espermatogènesi en porcí permetrà observar els diferents estadis d'evolució de les lesions testiculars.

La làmina pròpia dels túbuls seminífers dels testicles de rosegadors presenta una única capa de miofibroblasts, enfront de les dues capes de cèl·lules peritubulars de l'espècie porcina (una capa de cèl·lules mioïdes i una capa de fibroblasts). El major desenvolupament de la làmina pròpia en porcí permetrà un estudi més detallat de les seves alteracions.

L'espècie porcina és, en definitiva, un model d'interès biomèdic per a l'estudi de les patologies que afecten el testicle; a més, per al sector porcí relacionat amb les Explotacions de Selecció i Multiplicació Porcina i per als Centres d'Inseminació Artificial, l'estudi de les lesions testiculars i de les alteracions de la qualitat espermàtica dels ejaculats és també

de gran interès. A fi de poder millorar el diagnòstic de la subfertilitat és molt important i necessari conèixer les característiques morfològiques i morfomètriques dels òrgans reproductors masculins en condicions normals.



# MATERIAL I MÈTODES

## 1. MATERIAL

### 1.1. Característiques dels exemplars

Per a l'estudi de l'estructura i la ultraestructura testiculars s'han utilitzat tres mascles reproductors porcins sans de la raça Landrace varietat anglesa. Aquests mascles van ser sotmesos des dels 8 mesos d'edat a un ritme d'extraccions de semen de dues vegades per setmana, amb un període de repòs de 48 hores abans del seu sacrifici a l'edat de 9,5 mesos. Al llarg del tractament, els mascles mostraven una bona qualitat del semen, sense diferències significatives entre ells en els paràmetres seminals (volum, concentració, motilitat, vitalitat i morfologia espermàtiques i, resistència osmòtica dels acrosomes). En el moment del sacrifici el pes corporal dels mascles era de 143,910 Kg, 151,905 Kg i 138,922 Kg (Taula 1, vegeu apartat de Resultats pàg. 47).

Els mascles, procedents d'un Centre de Selecció i Multiplicació Porcina, estaven confinats en una nau climatitzada a 18 °C, sota un estricte control sanitari i alimentats amb una dieta equilibrada constituïda per pinso per a reproductors subministrat manualment per tècnics especialitzats de la pròpia explotació porcina.

## **1.2. Obtenció i conservació de les mostres**

Un cop sacrificats els animals, es van extreure els testicles de forma immediata i es van portar al laboratori de l'explotació porcina on, en primer lloc, van ser pesats i, tot seguit, van ser disseccionats per tal d'obtenir les mostres per a la seva observació al microscopi òptic i al microscopi electrònic de transmissió. Els fragments de testicle per a Microscòpia Òptica van ser submergits ràpidament en líquid fixador de Bouin i, els fragments de testicle per a Microscòpia Electrònica de Transmissió en líquid fixador de Karnovsky. Totes les mostres van ser extretes a diferents nivells del parènquima testicular d'ambdós testicles (dret i esquerre).

## **2. MÈTODES**

### **2.1. Processament de les mostres testiculars per a Microscòpia Òptica**

El processament de les mostres testiculars s'ha fet a partir de fragments de teixit de 5 mm de gruix i d'acord amb el protocol descrit per Kiernan (1990).

#### **◆ *Fixació:***

- 1) Fixeu les mostres amb líquid de Bouin durant 24 hores.

#### **◆ *Rentat i deshidratació:***

- 2) Renteu les mostres amb alcohol de 70° (*overnight*). Aquest pas pot accelerar-se afegint una gota d'amoníac per cada 100 ml d'etanol 70°.

- 3) Deshidrateu les mostres en la sèrie etanòlica següent: etanol 90° (1 canvi de 2 hores); alcohol absolut (3 canvis de 1,5 hores cada un).

◆ **Imbibició i inclusió:**

- 4) Embeveu les mostres en xilol (2 canvis de 1,5 hores i de 2 hores, respectivament).
- 5) Procediu a la inclusió de les mostres en parafina de 56-58 pF a 60 °C (2 canvis de 2,5 hores cada un).
- 6) Transferiu les mostres a uns motllos plens de parafina fosa (a 60 °C) i, ràpidament, submergiu el conjunt en un recipient amb aigua a 4 °C a fi que la parafina solidifiqui i es constitueixin els blocs de parafina amb la mostra inclosa.

◆ **Microtomia:**

- 7) Piramideu els blocs i procediu a l'obtenció de seccions histològiques de 14 µm i 7 µm de gruix.  
Les seccions histològiques han estat obtingudes amb un micròtom de rotació Medin.

◆ **Tinció:**

- 8) Les seccions de 14 µm de gruix han estat tenyides només amb hematoxilina-eosina. Les seccions de 7 µm de gruix han estat tenyides amb la tinció general hematoxilina-eosina, amb les coloracions tricròmiques de Mallory i van Gieson, amb els procediments de l'àcid periòdic-Schiff (PAS)-hematoxilina de Groat i de l'orceïna-hematoxilina de Delafield-eosina, amb les tècniques argèntiques de Gomori i Holme i amb el colorant metacromàtic blau de toluïdina. El blau alcilà de la tinció de Mallory s'uneix específicament a les fibres de col·lagen, l'orceïna s'uneix a les fibres elàstiques, i la plata de la tècnica de Gomori s'uneix a les fibres de col·lagen i de reticulina. La solució de Schiff reacciona amb els gliconjugats neutres, mentre que, la tècnica de Holme és específica per les fibres nervioses adrenèrgiques i colinèrgiques.

◆ **Observació i microfotografia:**

9) Les seccions tenyides han estat observades amb un microscopi òptic de camp clar Zeiss (Jenalumar) i, les microfotografies s'han efectuat amb una pel·lícula per a diapositiva en color Ektachrome 160 ASA per a llum artificial de filament de tungstè.

**REACTIUS**

• *Líquid de Bouin*

<i>Solució aquosa saturada d'àcid pícric</i>	<i>300 ml</i>
<i>Formol al 40 %</i>	<i>100 ml</i>
<i>Àcid acètic glacial</i>	<i>20 ml</i>

**2.2. Processament de les mostres testiculars per a Microscòpia Electrònica de Transmissió**

Per al processament de les mostres testiculars per a Microscòpia Electrònica de Transmissió s'han obtingut uns fragments d'uns 2 mm de gruix màxim i s'ha procedit d'acord amb el protocol descrit per Bonet i col. (1994).

◆ **Fixació:**

- 1) Fixeu les mostres amb líquid de Karnovsky durant 2,5 hores a 4 °C.
- 2) Renteu les mostres amb tampó fosfat de Sörensen 0,16 M i pH 7,2 a 4 °C durant 3 o 4 hores (efectuant 3 canvis).

◆ **Postfixació:**

- 3) Postfixeu les mostres amb tetraòxid d'osmi a l'1 % en tampó fosfat de Sörensen 0,16 M i pH 7,2, durant 2 hores a temperatura ambient. Protegiu els flascons de la llum.
- 4) Renteu les mostres amb tampó fosfat de Sörensen 0,16 M i pH 7,2 a 4 °C i a les fosques durant un temps màxim de 15 minuts totals (amb un mínim de 3 canvis).
- 5) Renteu les mostres amb aigua bidestil·lada durant 30 minuts totals (amb un mínim de 3 canvis).

◆ **Deshidratació:**

- 6) Deshidrateu les mostres en la sèrie acetònica següent: acetona 50° (10 minuts), acetona 70° (15 minuts a 12 hores a 4° C), acetona 95° (10-15 minuts) i acetona absoluta (10 minuts totals amb 3 canvis).

◆ **Imbibició:**

- 7) Embeveu les mostres amb resina Spurr de baixa viscositat d'acord amb la sèrie següent: acetona-òxid de propilè 1:1 (15 minuts totals amb dos canvis), òxid de propilè-Spurr 2:1 (30 minuts), òxid de propilè-Spurr 1:1 (60 minuts), Spurr a 4 °C (12 hores), Spurr a 4 °C (2 hores), Spurr a 55 °C (24 hores).

◆ **Inclusió:**

- 8) Transferiu les mostres a uns motllos de silicona plens de resina Spurr i manteniu-los a 60 °C durant 8-24 hores.

◆ **Ultramicrotomia:**

- 9) Piramideu els blocs i procediu a l'obtenció de seccions semifines d'1 µm de gruix. Contrasteu les seccions semifines amb blau de metilè al 0,5 % sobre una placa calefactora a 80 °C durant 2 minuts.
- 10) Procediu a l'obtenció de seccions fines de 70 nm de gruix, i dipositeu les seccions sobre reixetes de coure (3 mm de diàmetre). Deixeu-ho assecar.

Les seccions fines i semifines han estat obtingudes amb un ultramicrotòtom LKB model Supernova amb ganivetes de diamant.

◆ **Contrastació:**

- 11) Contrasteu les seccions fines amb una gota d'acetat d'uranil durant 10 minuts.
- 12) Renteu-ho amb aigua destil·lada i deixeu-ho assecar sobre un paper de filtre.
- 13) Contrasteu les seccions fines amb una gota de solució de Reynolds filtrada durant 10 a 15 minuts.
- 14) Renteu-ho amb aigua destil·lada i deixeu-ho assecar sobre un paper de filtre.

◆ **Observació, microfotografia i microelectrografia:**

Les seccions semifines tenyides han estat observades amb un microscopi òptic de camp clar Zeiss (Jenalumar) i, les microfotografies s'han efectuat amb una pel·lícula per a diapositiva en color Ektachrome 160 ASA per a llum artificial de filament de tungstè.

Les seccions fines contrastades han estat observades amb un microscopi electrònic de transmissió Zeiss 910 del Servei de Microscòpia Òptica i Electrònica de la Universitat de Girona i, per realitzar les microelectrografies s'ha utilitzat una pel·lícula Kodak Electro Microscopy amb format 6,5 x 9 cm.

## **REACTIUS**

• *Tampó fosfat de Sørensen pH 7,2*

*Solució A. Fosfat sòdic, dibàsic*

*(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O) 11,876 g*

*Aigua destil·lada 1000 ml*

*Solució B. Fosfat potàssic, monobàsic*

*(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 9,08 g*

*Aigua destil·lada 1000 ml*

*Barregeu 72,6 ml de la solució A i enraseu fins a 100 ml amb la solució B.*

• *Líquid de Karnovsky*

*Dissoleu 1,2 g de paraformaldehid en 20 ml d'aigua destil·lada a 80 °C. Aclariu la solució amb unes gotes de NaOH 1 N fins que quedi del tot transparent (de dues a tres gotes solen ser suficients).*

*Deixeu refredar i afegiu 15 ml de tampó fosfat de Sörensen (0,16 M i pH 7,2) i 5 ml de glutaraldehid al 25 %.*

*Conserveu la mescla a 4° C i utilitzeu-la abans de 24 hores.*

• *Tetraòxid d'osmi a l'1 %*

*Tetraòxid d'osmi (OsO<sub>4</sub>) al 2 %*

*(en aigua destil·lada) 4 ml*

*Tampó fosfat de Sörensen*

*(0,16 M i pH 7,2) 4 ml*

• *Resina Spurr*

*La resina Spurr s'obté barrejant quatre components que es poden adquirir a diverses cases comercials.*

*La mescla ha de ser homogènia i, en conseqüència, la barreja caldrà fer-la lentament (evitant la formació de bombolles) aproximadament durant 1 hora.*

*Un cop elaborada hom pot conservar-la a 4 °C durant una setmana.*

---

<i>Casa Comercial</i>	<i>Bio-Rad</i>	<i>Taab</i>
<i>Components</i>	<i>ERL: 23 g</i>	<i>ERL: 10 g</i>
	<i>NSA: 62 g</i>	<i>NSA: 26 g</i>
	<i>DER: 14 g</i>	<i>DER: 6 g</i>
	<i>DMAE: 1 g</i>	<i>SI: 0,4 g</i>

---

• *Acetat d'uranil*

*Solució saturada d'acetat d'uranil en aigua bidestil·lada-acetona (1/1).*

• *Solució de Reynolds*

*Nitrat de plom*

$Pb(NO_3)_2$  1,33 g

*Citrat sòdic, dibàsic*

$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$  1,76 g

*Aigua destil·lada i bullida* 30 ml

*Agiteu-ho durant 30 minuts i afegiu 8 ml de NaOH 1 N. Enraseu fins a 50 ml amb aigua destil·lada i bullida. Conserveu la solució i protegiu-la de la llum.*

*El temps de conservació és de 2-3 mesos.*

### **2.3. Anàlisi morfològica del testicle**

#### **2.3.1. La càpsula testicular i el teixit intersticial**

La composició i organització de la càpsula testicular i les seves capes, així com també del teixit intersticial han estat descrites.

#### **2.3.2. L'epiteli seminífer**

Les diferents generacions d'espermatogònies, espermatòcits i espermàtides han estat identificades d'acord amb el criteri morfològic descrit per Pinart i col. (2000) en mascles reproductors porcins sans.

#### **2.3.3. El cicle de l'epiteli seminífer**

La classificació dels diferents estadis de l'epiteli seminífer s'ha fet a partir de les seccions histològiques de 7 µm de gruix i d'acord amb el mètode de la morfologia tubular, el qual es



basa en els paràmetres següents (Sharpe, 1994; Paula i col., 1999): (1) la composició de cèl·lules germinals de l'epiteli seminífer, (2) la fase meiòtica dels espermatòcits i, (3) els canvis nuclears i acrosòmics que experimenten les espermàtides. Per cada mascle, s'han examinat al microscopi òptic un total de 1000 túbuls seminífers tallats en secció transversal (Hess i col., 1990; França i Cardoso, 1998). Aquest mètode utilitza habitualment la coloració general hematoxilina-eosina i proporciona 8 estadis de l'epiteli seminífer (Paula i col., 1999).

Un altre criteri molt utilitzat és el que té en compte els diferents passos de la diferenciació de les espermàtides en seccions histològiques de parènquima testicular tenyides amb PAS-Schiff i Hematoxilina de Groat. En aquesta tècnica, l'acrosoma de les espermàtides en desenvolupament es tenyeix de color porpra i, per tant, permet fer un seguiment de l'evolució que segueix aquest orgànu i distingir el grup de cèl·lules al qual pertanyen les espermàtides.

#### **2.3.4. L'espermiogènesi**

A partir de les microelectrografies de Microscòpia Electrònica de Transmissió dels diferents estadis del cicle espermatogènic, s'han descrit els canvis a nivell ultraestructural que experimenten totes les cèl·lules germinals durant el procés espermatogènic, posant especial atenció a l'evolució de les espermàtides (espermiogènesi) i correlacionant les modificacions que es van succeint en aquestes cèl·lules amb els canvis ultraestructurals que tenen lloc a les altres cèl·lules de l'epiteli seminífer (cèl·lules de Sertoli i cèl·lules germinals) i del teixit intersticial (cèl·lules de Leydig, principalment).

## **2.4. Anàlisi morfomètrica del testicle**

A més de l'estudi morfològic del testicle, s'han fet mesures quantitatives utilitzant un ocular micromètric per tal de determinar la grandària cel·lular i nuclear de les diferents cèl·lules del testicle, el gruix de la càpsula testicular i el gruix de cada una de les seves capes, el diàmetre dels vasos sanguinis, l'alçada de l'epiteli seminífer, la longitud i la freqüència relativa de cada estadi i el gruix de la làmina pròpia. El percentatge de parènquima testicular ocupat per túbuls seminífers i teixit intersticial i, el diàmetre dels túbuls seminífers s'han determinat mitjançant un programa informàtic (vegeu apartat 2.4.3. pàg. 42).

Les seccions histològiques de 7 µm de gruix han estat utilitzades per determinar tots els paràmetres quantitius descrits anteriorment, excepte per mesurar la longitud de cada estadi en què s'han fet servir les seccions histològiques de 14 µm de gruix a fi de poder examinar de forma ràpida una longitud més extensa dels túbuls seminífers.

Per cada tipus cel·lular, la grandària cel·lular i nuclear s'han mesurat utilitzant 25 cèl·lules per testicle seleccionades a l'atzar (Pinart i col., 2001c).

### **2.4.1. La càpsula testicular**

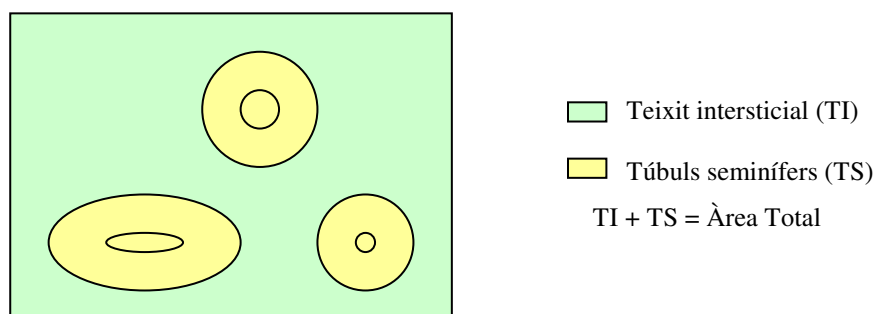
El gruix total de la càpsula testicular i el gruix de cada una de les seves capes, s'han mesurat en 10 seccions transversals per testicle escollides a l'atzar (Wrobel i Moustafa, 2000); per a cada mesura, la proporció de cada capa en relació al gruix total de la càpsula també ha estat calculada (Sprando i col., 1999).

#### **2.4.2. Els vasos sanguinis**

El diàmetre dels vasos sanguinis s'ha obtingut mesurant 20 seccions transversals per testicle seleccionades a l'atzar (Sprando i col., 2000).

#### **2.4.3. El percentatge de parènquima testicular ocupat per túbuls seminífers i per teixit intersticial**

Les àrees de parènquima testicular ocupades per túbuls seminífers i teixit intersticial s'han determinat utilitzant l'analitzador d'imatge Arcview GIS (versió 3.1). Les imatges seleccionades han estat prèviament digitalitzades amb el programa SCANWISE (grandària 200 % i 2000 dpi de resolució). L'analitzador d'imatge calcula l'àrea de tots els túbuls seminífers d'una secció, les suma i, després, divideix el resultat per l'àrea del camp visual. El valor obtingut, expressat com un percentatge, correspon a la quantitat de parènquima testicular ocupat per túbuls seminífers (r), el percentatge de parènquima testicular ocupat per teixit intersticial s'obté fent  $100-r$ . Aquest procediment s'ha repetit en 20 microfotografies diferents de parènquima testicular per mascle.



#### 2.4.4. El diàmetre dels túbuls seminífers

Utilitzant 250 seccions transversals de túbuls seminífers per mascle i, mitjançant el programa informàtic esmentat anteriorment, s'ha determinat l'àrea tubular mitjana i, per a cada un dels estadis del cicle espermatogènic identificats, les àrees que ocupen l'epiteli seminífer i el lumen. A partir d'aquestes àrees s'han establert les relacions entre l'epiteli seminífer i el lumen pròpies de cada estadi. A fi d'obtenir un únic valor que relacioni l'epiteli seminífer i el lumen s'ha aplicat la fórmula següent:

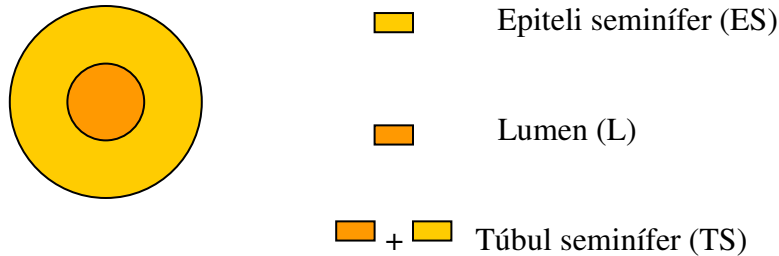
$$ES/L_m = \frac{\sum_{i=1}^{VIII} Fa_i \times ES/L_m}{\sum_{i=1}^{VIII} Fa_i} = \omega$$

*Equació 1.* ES, àrea de l'epiteli seminífer; L, àrea del lumen; m, mitjana; Fa, freqüència absoluta;  $\omega$ , constant.

Tenint en compte, per una banda, que l'àrea d'un túbul seminífer és la suma de l'àrea ocupada per l'epiteli seminífer i de l'àrea ocupada pel lumen i, per altra banda, el valor únic que relaciona l'epiteli seminífer i el lumen, s'ha dissenyat un model matemàtic que permet calcular l'àrea de l'epiteli seminífer i/o el lumen a partir només de l'àrea d'un túbul seminífer en secció transversal independentment de l'estadi en què es trobi el seu epiteli seminífer.

$$\left. \begin{array}{l} TS = ES + L \\ ES/L_m = \omega \end{array} \right\}$$

*Equació 2.* ES, àrea de l'epiteli seminífer; L, àrea del lumen; m, mitjana; TS, àrea del túbul seminífer en secció transversal;  $\omega$ , constant.



El diàmetre tubular mitjà s'ha calculat a partir de l'àrea mitjana que ocupa un túbul seminífer tallat en secció transversal i considerant que aquesta secció és circular.

#### **2.4.5. L'alçada de l'epiteli seminífer en cada estadi**

L'alçada de l'epiteli seminífer s'ha mesurat, des del límit superior de la làmina basal fins al límit del lumen tubular, en 25 seccions transversals de túbuls seminífers per cada estadi seleccionats a l'atzar (Sprando i col., 1999).

#### **2.4.6. La longitud de cada estadi**

La longitud de cada estadi ha estat estimada a partir de 100 seccions seriades de 14 µm de gruix tenyides amb hematoxilina-eosina per mascle de la manera següent: (1) en una determinada secció se selecciona un túbul seminífer a l'atzar i s'identifica el seu estadi, (2) el túbul és examinat en les seccions seriades successives fins a l'aparició de l'estadi immediatament anterior o posterior, i (3) la longitud dels estadis es calcula fent el producte entre el nombre de seccions analitzades i el gruix de les seccions (14 µm).

La freqüència relativa d'aparició d'un estadi depèn, en primer lloc, de la seva longitud i, en segon lloc, del temps que l'epiteli seminífer roman en aquell estadi en particular. Pel que fa a la longitud, com més llarg és un estadi més gran serà la seva freqüència relativa. Respecte al temps, com més durada tingui un estadi més gran serà la seva freqüència relativa. Amb l'objectiu de determinar quin dels dos factors és el responsable de la freqüència d'aparició d'un estadi es va comparar la freqüència relativa d'un estadi (%) i la seva longitud expressada com a percentatge amb el test *t-Student* amb un nivell de significació de  $P < 0,01$  (Taula 5, vegeu apartat de Resultats pàg. 62). Ambdues freqüències relatives han de tenir un valor similar, en el cas que els percentatges tinguin valors significativament diferents, la diferència es pot atribuir a la durada relativa de l'estadi.

#### **2.4.7. La freqüència relativa de cada estadi**

La freqüència relativa dels estadis s'ha calculat examinant 250 seccions transversals de túbuls seminífers tenyides amb hematoxilina-eosina per mascle (Hess i col., 1990; van Haaster i de Rooij, 1993; Paula i col., 1999).

#### **2.4.8. La durada relativa de cada estadi**

La durada en dies de cada estadi ha estat estimada multiplicant la freqüència mitjana de cada estadi per la durada total del cicle (Hess i col., 1990; Okwun i col., 1996; França i col., 1999); en porcí el valor de la durada total del cicle utilitzat per aquesta estimació és de 8,6 dies (França i Cardoso, 1998; França i col., 1999).

**2.4.9. El número de cèl·lules de Sertoli respecte al número d'espermatogònies, d'espermatòcits primaris i secundaris i, d'espermàtides arrodonides i en fase d'elongació**

Per tal de determinar l'evolució numèrica que experimenten els diferents tipus de cèl·lules germinals al llarg del cicle espermatogènic, s'ha calculat per a cada un dels estadis del cicle el número de cèl·lules de Sertoli respecte al número d'espermatogònies, d'espermatòcits primaris, d'espermatòcits secundaris, d'espermàtides arrodonides i d'espermàtides en fase d'elongació.

La relació entre el número de cèl·lules de Sertoli i el número dels diferents tipus de cèl·lules germinals per a cada estadi de l'epiteli seminífer s'ha establert a partir de 250 seccions transversals de túbuls seminífers per mascle.

L'estudi comparatiu de les dades dels tres mascles reproductors porcins sans s'ha fet utilitzant l'anàlisi de la variància (ANOVA) amb un nivell de significació de  $P < 0,01$ . Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) a les Taules 1, 2, 3, 4, 6 i 7 (vegeu apartat de Resultats pàgs. 47, 50, 54, 59, 63, 64).

## *Capítol 1*

# *Estructura testicular*



## RESULTATS

### 1.1. ANÀLISI MORFOLÒGICA I MORFOMÈTRICA DEL TESTICLE

El pes corporal, el pes testicular i el percentatge del pes d'ambdós testicles en relació al pes corporal dels tres mascles s'expressen a la Taula 1 (vegeu pàg. 47). No es van trobar diferències significatives entre els tres mascles porcins sans pel que fa al pes dels seus testicles esquerres ( $P > 0,01$ ) i al pes dels seus testicles drets ( $P > 0,01$ ) (Làm. II – Fig. A). En els mascles porcins sans, el testicle dret i el testicle esquerre tenen un pes similar ( $P > 0,01$ ), essent el valor testicular mitjà de  $330,80 \pm 16,99$  g. Els dos testicles tenen un pes mitjà de  $661,59 \pm 33,97$  g i constitueixen el  $0,46 \pm 0,01$  % del pes corporal.

TAULA 1. Pes corporal i pes testicular en mascles porcins sans\*

Paràmetre	Masclle 1	Masclle 2	Masclle 3	Mitjana $\pm$ SD (n = 3)
Pes corporal (Kg)	143,910	151,905	138,922	144,91 $\pm$ 6,55
Pes testicular (g)				
Testicle esquerre	327,54	364,79	330,76	341,03 $\pm$ 20,64
Testicle dret	311,07	335,82	314,79	320,56 $\pm$ 13,34
Pes del parell	638,61	700,61	645,55	661,59 $\pm$ 33,97
% pes testicular/pes corporal	0,44	0,46	0,47	0,46 $\pm$ 0,01

\*Els valors entre els mascles no són significativament diferents ( $P > 0,01$ )

Els testicles estan envoltats per una càpsula de naturalesa fibrosa, de la qual en parteixen uns septes radials que tabiquen el parènquima testicular en diferents lòbuls (Làm. IX – Fig. A; Là. X – Fig. A). Els espais entre els lòbuls estan ocupats per túbuls seminífers i teixit intersticial (Làm. IX – Fig. B; Là. XI – Figs. A i B; Là. XII – Fig. A).

### **1.1.1. La càpsula testicular**

A ull nu la càpsula es veu altament vascularitzada i d'un color blanquinós (Làm. III – Fig. A). El gruix de la càpsula testicular, de  $2.375,13 \pm 246,68 \mu\text{m}$ , no difereix significativament ni entre els tres mascles porcins sans ( $P > 0,01$ ), ni entre els testicles esquerre i dret ( $P > 0,01$ ) (Taula 2, vegeu pàg. 50). La càpsula testicular està dividida en tres capes que presenten diferent composició i organització (Setchell, 1978; Nakano, 1994; Arenas i col., 1997; Wrobel i Moustafa, 2000): la túnica vaginalis, la túnica albugínia i la túnica vasculosa (Làm. IV – Figs. A i B; Là. V – Figs. A-C; Là. VI – Figs. A-C). No es van trobar diferències significatives entre els tres mascles porcins sans pel que fa al gruix ( $P > 0,01$ ), la composició i el diàmetre dels vasos sanguinis ( $P > 0,01$ ) d'aquestes capes (Taula 2, vegeu pàg. 50).

#### **1.1.1.1. La túnica vaginalis**

La túnica vaginalis és la capa més externa de la càpsula (Làm. IV – Fig. B). Aquesta capa, de  $42,92 \pm 17,07 \mu\text{m}$  de gruix, constitueix el  $1,82 \pm 0,78 \%$  de la càpsula testicular. Està composta per una línia externa mesotelial i una línia interna de teixit conjuntiu, sense vasos sanguinis ni fibres nervioses (Làm. VII – Fig. A). El mesoteli consisteix en una única línia de cèl·lules endotelials que es caracteritza per la presència de nòduls pluriestratificats de cèl·lules epitelials, els quals es distribueixen a l'atzar (Làm. IV – Fig. B; Là. V – Fig. A; Là. VI – Figs. A i B; Là. VII – Fig. A).

El teixit conjuntiu conté fibroblasts, abundants cèl·lules musculars llises orientades circularment i, fibres de col·lagen formant feixos laxes de trajectòria ondulada (Làm. IV – Fig. B; Là. V – Fig. B; Là. VI – Fig. B; Là. VII – Fig. A). Les fibres reticulars són escasses i es troben preferentment al voltant de les cèl·lules musculars (Làm. V – Fig. B); no hi ha fibres elàstiques (Làm. VIII – Fig. B).

### **1.1.1.2. La túnica albugínia**

La capa central de la càpsula testicular correspon a la túnica albugínia (Làm. IV – Fig. B). Aquesta capa, de  $884,78 \pm 71,83 \mu\text{m}$  de gruix, representa el  $37,31 \pm 3,27 \%$  de la càpsula testicular. La túnica albugínia està formada per un teixit conjuntiu dens amb abundants fibres de col·lagen, poques fibres elàstiques i reticulars, i fibroblasts (Làm. IV – Fig. B; Là. V – Figs. B i C; Là. VI – Fig. C; Là. VII – Figs. A i B; Là. VIII – Fig. A). Com a la túnica vaginalis, les fibres de col·lagen formen fascicles paral·lels de trajectòria ondulada (Làm. IV – Fig. B; Là. V – Fig. B). Tant les cèl·lules musculars com les fibres elàstiques són escasses i estan orientades longitudinalment (Làm. VI – Fig. B; Là. VIII – Fig. A).

La túnica albugínia està irrigada per artèries de  $145,20 \pm 25,64 \mu\text{m}$  de diàmetre i venes de  $81,40 \pm 20,52 \mu\text{m}$  de diàmetre (Làm. IV – Fig. A; Là. V - Figs. A i B) i, innervada per fibres nervioses que corren en associació amb els vasos sanguinis.

### **1.1.1.3. La túnica vasculosa**

La túnica vasculosa se situa a la part més interna de la càpsula (Làm. IV – Fig. B). Aquesta capa, de  $1.543,80 \pm 104,78 \mu\text{m}$  de gruix, constitueix el  $64,26 \pm 4,40 \%$  de la càpsula testicular. La túnica vasculosa és una extensió del teixit intersticial, que es caracteritza per la presència de cèl·lules de Leydig, cèl·lules mastocitàries i fibroblasts immersos en un teixit conjuntiu lax (Làm. VII – Fig. C; Là. VIII – Fig. C). La matriu extracel·lular està composta per abundants fibres de col·lagen i elàstiques distribuïdes de manera desigual, i

per escasses fibres reticulars (Làm. IV – Figs. A i B; Là. V – Figs. A i C; Là. VI – Figs. A i C; Là. VIII – Fig. A; Là. IX – Fig. B; Là. X – Fig. A).

La túnica vasculosa està creuada per grans artèries (ca.  $444,40 \pm 56,17 \mu\text{m}$  de diàmetre) i venes (ca.  $170,72 \pm 43,49 \mu\text{m}$  de diàmetre) (Làm. IV – Fig. A; Là. V – Fig. A; Là. VI – Fig. A; Là. VIII – Fig. C). Com a la túnica albugínia, les fibres adrenèrgiques i colinèrgiques corren paral·leles als vasos sanguinis (Làm. X – Fig. B).

**TAULA 2.** Paràmetres morfomètrics de la càpsula testicular en mascles porcins sans\*

<b>Paràmetre morfomètric</b>	<b>Mascle 1</b>	<b>Mascle 2</b>	<b>Mascle 3</b>	<b>Mitjana <math>\pm</math> SD</b>
Gruix càpsula ( $\mu\text{m}$ )	$2.261,75 \pm 176,79$ (n = 10)	$2.454,64 \pm 280,79$ (n = 10)	$2.409,07 \pm 258,15$ (n = 10)	$2.375,13 \pm 246,68$ (n = 30)
Túnica vaginalis				
Gruix ( $\mu\text{m}$ )	$57,37 \pm 21,25$	$28,90 \pm 8,01$	$42,50 \pm 3,09$	$42,92 \pm 17,07$
% túnica vaginalis/càpsula	$1,53 \pm 0,94$ (n = 10)	$1,17 \pm 0,33$ (n = 10)	$1,76 \pm 0,13$ (n = 10)	$1,82 \pm 0,78$ (n = 30)
Túnica albugínia				
Gruix ( $\mu\text{m}$ )	$884,78 \pm 95,78$	$913,00 \pm 83,00$	$858,22 \pm 47,97$	$884,78 \pm 71,83$
% túnica albugínia/càpsula	$39,15 \pm 4,24$ (n = 10)	$37,19 \pm 3,38$ (n = 10)	$35,60 \pm 1,99$ (n = 10)	$37,31 \pm 3,27$ (n = 30)
Diàmetre vasos sanguinis ( $\mu\text{m}$ )				
Venes	$77,88 \pm 16,43$	$73,92 \pm 14,31$	$92,40 \pm 27,61$	$81,40 \pm 20,52$
Artèries	$146,85 \pm 30,18$ (n = 20)	$145,20 \pm 35,34$ (n = 20)	$143,55 \pm 15,59$ (n = 20)	$145,20 \pm 25,64$ (n = 60)
Túnica vasculosa				
Gruix ( $\mu\text{m}$ )	$1.505,07 \pm 154,25$	$1.549,33 \pm 95,85$	$1.577,02 \pm 81,07$	$1.543,80 \pm 104,58$
% túnica vasculosa/càpsula	$66,54 \pm 6,82$ (n = 10)	$63,12 \pm 3,91$ (n = 10)	$63,13 \pm 2,02$ (n = 10)	$64,26 \pm 4,40$ (n = 30)
Diàmetre vasos sanguinis ( $\mu\text{m}$ )				
Venes	$142,56 \pm 41,90$	$191,40 \pm 36,15$	$178,20 \pm 44,27$	$170,72 \pm 43,49$
Artèries	$429,00 \pm 71,29$ (n = 20)	$450,20 \pm 41,17$ (n = 20)	$453,75 \pm 65,64$ (n = 20)	$444,40 \pm 56,17$ (n = 60)

\*Els valors entre els mascles no són significativament diferents ( $P > 0,01$ )

### **1.1.2. El parènquima testicular**

El parènquima testicular està constituït pels túbuls seminífers i el teixit intersticial. Ni els tres mascles porcins sans ( $P > 0,01$ ), ni els testicles dret i esquerre ( $P > 0,01$ ) difereixen significativament en la quantitat de túbuls seminífers i teixit intersticial, els quals comprenen, respectivament, el  $72,44 \pm 2,12 \%$  i el  $27,56 \pm 2,12 \%$  del parènquima testicular (Taula 3, vegeu pàg. 54; Làm. XI –Fig. A).

#### **1.1.2.1. Els túbuls seminífers**

Els túbuls seminífers es troben extremadament recargolats i empaquetats. Aquests túbuls tenen un diàmetre mitjà d'uns  $230,44 \pm 1,49 \mu\text{m}$  (Taula 3, vegeu pàg. 54) i estan compostos per la làmina pròpia i l'epiteli seminífer.

La làmina pròpia, de  $4,0\text{-}4,5 \mu\text{m}$  de gruix, envolta l'epiteli seminífer i està formada per la làmina basal i les cèl·lules peritubulars. La làmina basal se situa a la part més interna de la làmina pròpia, en contacte amb l'epiteli seminífer, i està formada per una línia no-cel·lular de fibres de col·lagen i reticulars, i de glicoconjugats neutres (Là. XI –Fig. B; Là. XII – Fig. A; Là. XIII – Fig. B). Les cèl·lules peritubulars es disposen formant dues línies concèntriques, les quals estan incloses en un esquelet de fibres de col·lagen i reticulars i de glicoconjugats neutres (Là. XI –Fig. B; Là. XII – Fig. A; Là. XIV – Fig. B). La línia més interna de cèl·lules peritubulars està associada a la làmina basal i la formen cèl·lules mioïdes (Là. XV – Fig. C); la línia externa de cèl·lules peritubulars està en contacte amb el teixit intersticial i conté fibroblasts (Là. XVI – Fig. A<sub>2</sub>). Les cèl·lules peritubulars estan sostingudes per una fina xarxa de fibres de reticulina (Là. XIII – Fig. B).

L'epiteli seminífer, de  $66,11 \pm 10,62 \mu\text{m}$  d'alçada mitjana (Taula 3, vegeu pàg. 54), és estratificat i columnar i conté dos tipus diferents de cèl·lules: les cèl·lules de Sertoli i les cèl·lules germinals (Là. XVI-XXIII – Figs. A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>). Les cèl·lules de Sertoli són cèl·lules grans i de forma piramidal que s'estenen des de la làmina basal fins al lumen del conducte seminífer, envoltant alhora les diferents generacions de cèl·lules germinals, la qual cosa fa que presentin un contorn totalment irregular. El nucli de les cèl·lules de Sertoli es

caracteritza per tenir un o dos nuclèols molt prominents i per presentar invaginacions a l'embolcall nuclear (Làm. XVI-XXIII – Figs. A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>). Les cèl·lules germinals estan disposades en línies concèntriques a diferents nivells de l'epiteli seminífer d'acord amb el seu estat de diferenciació (Làm. XVI-XXIII – Figs. A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>). A grans trets, podem diferenciar tres tipologies cel·lulars: (1) les espermatogònies les quals formen una única línia de cèl·lules aplanades (ca. 17 µm de llarg) que es divideixen mitòticament i, es localitzen en contacte amb la làmina pròpia, (2) els espermatòcits els quals són cèl·lules meiòtiques de perfil rodó (ca. 15 µm de diàmetre) que es mouen del compartiment basal a l'adluminal de l'epiteli seminífer i, es distribueixen en dos o tres línies, i (3) les espermatides les quals es localitzen al compartiment adluminal de l'epiteli seminífer i, es distribueixen en cinc a set línies de cèl·lules mostrant diferents morfologies (ca. 10-12 µm de diàmetre). Al llarg de l'espermioogènesi, les espermatides experimenten una sèrie de canvis morfològics complexos que porten a la formació dels espermatozoides; aquests canvis bàsicament són: el desenvolupament de l'acrosoma i el flagel, l'allargament del cap i la condensació de la cromatina i, la reorganització del citoplasma i dels orgànuls cel·lulars. A mesura que la diferenciació progressa, les espermatides es mouen cap al lumen.

#### **1.1.2.2. El teixit intersticial**

El teixit intersticial ocupa els espais entre els túbuls seminífers (Làm. XI – Fig. A); és un teixit conjuntiu lax i conté abundants cèl·lules de Leydig fortament empaquetades que ocupen gairebé tot l'espai intertubular, pocs fibroblasts i cèl·lules mastocitàries i, petits vasos sanguinis i limfàtics (Làm. XI – Fig. B; Là. XII – Figs. A i B; Là. XV – Fig. B). Les cèl·lules de Leydig són polièdriques, de 15 x 12 µm, i contenen un nucli rodó (ca. 6 µm de diàmetre) o oval (ca. 8,5 x 1,5 µm) situat a la perifèria (Làm. XV – Figs. A-C). Amb la tinció de blau de metilè de talls inclosos en resina, s'observa de forma molt clara un gran nombre de grànuls distribuïts per tot el citoplasma de les cèl·lules de Leydig (Làm. XV – Fig. C). Amb aquesta coloració, a més, es poden distingir cèl·lules de Leydig amb diferent afinitat tintorial: algunes apareixen clares, mentre que d'altres es tenyeixen intensament. Les cèl·lules que queden fortament tenyides presenten alhora un nuclèol molt

més prominent. Amb la tinció general hematoxilina-eosina també s'observen cèl·lules amb un citoplasma més acidòfil que d'altres (Làm. XV – Fig. B). Ambdós tipus cel·lulars apareixen amb igual freqüència independentment de l'estadi en què es trobi l'epiteli seminífer dels túbuls seminífers més propers. En el teixit intersticial també es poden observar cèl·lules de Leydig degeneratives que presenten un nucli més petit i més dens, d'uns 5 x 3 µm.

Al teixit intersticial apareixen unes zones amb aparença d'espais oberts que es distribueixen a l'atzar i estan ocupats per escasses fibres de col·lagen i alguns fibroblasts (Làm. XV – Fig. A).

Els fibroblasts són cèl·lules afusades (ca. 8,5 x 1,5 µm) situades entre les cèl·lules de Leydig (Làm. XV – Fig. B). Les cèl·lules mastocitàries (ca. 6,5 x 4,5 µm) es localitzen preferentment en contacte amb els vasos sanguinis; són cèl·lules grosses, amb un nucli també gran, que presenten diferents morfologies ja que es deformen per poder migrar a través del teixit (Làm. XII – Fig. B). Els espais intercel·lulars estan ocupats per fibres reticulars i de col·lagen, amb absència d'elastina (Làm. XIII – Figs. A i B; Là. XIV – Fig. B).

Tant les artèries (ca. 36,82 ± 4,99 µm de diàmetre) com les venes (ca. 12,40 ± 3,88 µm de diàmetre) estan normalment associades a la làmina pròpia que envolta els túbuls seminífers, però també s'observen entre les cèl·lules intersticials (Taula 3, vegeu pàg. 54) (Làm. XI – Fig. B). Grans vasos sanguinis travessen els septes testiculars (Làm. XIII – Fig. B; Là. XIV – Fig. A).

Les fibres nervioses del teixit intersticial són tan fines que no poden ser identificades mitjançant la impregnació argèntica de Holme. Només s'observen algunes fibres nervioses en els septes més gruixuts (Làm. X – Fig. B).

Les fibres conjuntives del teixit intersticial són majoritàriament fibres de reticulina, les quals es troben entre les cèl·lules de Leydig (Làm. XIII – Figs. A i B). També s'observen fibres de col·lagen i elàstiques disperses pel teixit intersticial, però, aquestes són especialment abundants en els septes que compartimenten el testicle en lòbuls (Làm. IX – Fig. A; Là. XIII – Figs. A i B; Là. XIV – Figs. B i C).

TAULA 3. Paràmetres morfomètrics del parènquima testicular en mascles porcins sans\*

Paràmetre morfomètric	Mascle 1	Mascle 2	Mascle 3	Mitjana $\pm$ SD
% túbuls seminífers	74,96 $\pm$ 1,80	70,77 $\pm$ 2,44	71,58 $\pm$ 1,79	72,44 $\pm$ 2,12
% teixit intersticial	25,04 $\pm$ 1,80 (n = 20)	29,23 $\pm$ 2,44 (n = 20)	28,42 $\pm$ 1,79 (n = 20)	27,56 $\pm$ 2,12 (n = 60)
Diàmetre túbuls seminífers ( $\mu$ m)	229,12 $\pm$ 0,89 (n = 250)	232,08 $\pm$ 0,26 (n = 250)	229,98 $\pm$ 0,42 (n = 250)	230,44 $\pm$ 1,49 (n = 750)
Alçada mitjana de l'epiteli seminífer ( $\mu$ m)	62,47 $\pm$ 10,59 (n = 25)	68,40 $\pm$ 10,42 (n = 25)	67,86 $\pm$ 10,23 (n = 25)	66,11 $\pm$ 10,62 (n = 75)
Diàmetre vasos sanguinis ( $\mu$ m)				
venes	13,03 $\pm$ 4,81	19,95 $\pm$ 2,83	13,22 $\pm$ 3,78	12,40 $\pm$ 3,88
artèries	37,82 $\pm$ 5,26 (n = 20)	36,97 $\pm$ 5,26 (n = 20)	35,70 $\pm$ 5,72 (n = 20)	36,82 $\pm$ 4,99 (n = 60)

\*Els valors entre els mascles no són significativament diferents ( $P > 0,01$ )

## 1.2. ELS ESTADIS DEL CICLE DE L'EPITELI SEMINÍFER

El cicle de l'epiteli seminífer de *Sus domesticus* ha estat dividit en 8 estadis. El criteri en què s'ha basat aquesta classificació ha estat: la forma i posició del nucli de les espermatides, la presència de divisions meiòtiques i, sobretot, la composició cel·lular de l'epiteli seminífer.

Els 8 estadis del cicle espermatogènic de l'epiteli seminífer han estat agrupats en tres categories: (1) els estadis premeiòtics ocupen el 31,9 % del cicle espermatogènic i inclouen els estadis I, II i III, (2) els estadis meiòtics representen el 16,4 % del cicle i inclouen els estadis IV i V, i (3) els estadis postmeiòtics representen el 50,6 % del cicle i comprenen els estadis VI, VII i VIII.



A la secció transversal d'un túbul seminífer s'observa un únic estadi. La durada total del cicle espermatogènic es va estimar en uns 9,6 dies i la longitud total en uns 4.672,7  $\mu\text{m}$ .

Els tres mascles reproductors porcins sans no presenten diferències significatives ni en les característiques morfològiques ni en les característiques quantitatives ( $P > 0,01$ ) dels estadis del cicle espermatogènic. La Taula 4 (vegeu pàg. 59) resumeix les característiques morfològiques i quantitatives dels 8 estadis de l'epiteli seminífer.

A continuació es descriuen els principals trets que caracteritzen cada un dels 8 estadis identificats:

### **Estadi I**

En aquest estadi, l'epiteli seminífer té una alçada de  $73,8 \pm 12,6 \mu\text{m}$  i, es caracteritza per la presència d'espermàtides arrodonides distribuïdes en 4 a 6 línies cel·lulars; algunes espermàtides exhibeixen el grànul proacrosòmic que provoca una lleugera depressió en el nucli. La població d'espermatòcits està constituïda per una única línia cel·lular d'espermatòcits preleptotens i leptotens i, dues línies d'espermatòcits paquitens; la població d'espermatogònies està formada per espermatogònies A i B (Làm. XVI – Figs. A1 i A2).

La longitud total de l'estadi és de  $771,5 \pm 468,3 \mu\text{m}$ , i la freqüència relativa i la durada són de  $13,7 \pm 8,7 \%$  i d'1,19 dies, respectivament.

### **Estadi II**

L'estadi II, de  $61,4 \pm 8,8 \mu\text{m}$  d'alçada, conté espermàtides en una fase inicial d'elongació nuclear i condensació de la cromatina. Els espermatòcits preleptotens i leptotens presenten una notable regressió, mentre que, els espermatòcits paquitens mostren un desenvolupament elevat i es distribueixen en tres línies. El compartiment basal presenta espermatogònies A i un gran nombre d'espermatogònies B en comparació amb l'estadi I (Làm. XVII – Figs. A1 i A2).

La longitud d'aquest estadi és d'uns  $525,8 \pm 347,9 \mu\text{m}$ , i presenta una freqüència relativa d' $11,5 \pm 6,1 \%$  i una durada d'1,00 dies.

### **Estadi III**

L'epiteli seminífer, de  $67,0 \pm 10,9 \mu\text{m}$  d'alçada, es caracteritza per la presència d'espermàtides allargades agrupades en fascicles amb els seus caps orientats cap al compartiment basal, dues línies d'espermatòcits paquitens, dues línies d'espermatòcits zigotens. Al compartiment basal, les característiques de la línia d'espermatogònies són molt similars a les descrites per a l'estadi II (Làm. XVIII – Figs. A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>).

L'estadi III presenta una longitud de  $491,5 \pm 336,9 \mu\text{m}$ , una freqüència relativa de  $6,7 \pm 5,1 \%$  i una durada de 0,59 dies.

### **Estadi IV**

L'alçada de l'epiteli seminífer és de  $61,2 \pm 6,8 \mu\text{m}$ . La característica més important d'aquest estadi és la presència d'espermatòcits primaris en telofase i anafase i, d'espermatòcits secundaris distribuïts en tres línies diferents. Els fascicles d'espermàtides en fase d'elongació estan dins les criptes de les cèl·lules de Sertoli i localitzades profundament a l'epiteli seminífer. La població d'espermatogònies està constituïda per espermatogònies A i In, mentre que, les espermatogònies B són gairebé absents (Làm. XIX – Figs. A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>).

Aquest és l'estadi més curt del cicle espermatogènic, amb una longitud de  $248,9 \pm 150,4 \mu\text{m}$ , i una freqüència relativa de  $5,1 \pm 2,4 \%$  i una durada de 0,44 dies.

### **Estadi V**

Aquest estadi, de  $61,0 \pm 13,5 \mu\text{m}$  d'alçada, conté espermàtides en fase d'elongació situades dins les criptes de les cèl·lules de Sertoli i mostrant senyals de maduració avançada. La població d'espermatòcits està constituïda per una línia d'espermatòcits paquitens i tres línies d'espermatòcits secundaris. Al compartiment basal, les espermatogònies A i In són presents, mentre que, no s'observen espermatogònies B (Làm. XX – Figs. A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>).

Aquest estadi presenta una longitud total d'uns  $538,2 \pm 452,7 \mu\text{m}$ , una freqüència relativa de  $11,3 \pm 4,4 \%$ , i una durada de 0,97 dies.

### **Estadi VI**

L'estadi VI, de  $63,1 \pm 6,2 \mu\text{m}$  d'alçada, es caracteritza per la presència d'espermatòcits zigotens distribuïts en tres o quatre línies i pocs espermatòcits secundaris. A l'epiteli seminífer també hi són presents les espermatòides arrodonides, resultants dels espermatòcits secundaris, les quals es troben distribuïdes en dues o tres línies, i espermatòides en fase d'elongació en avançat estat de maduració agrupades en fascicles. La població d'espermatogònies està constituïda per cèl·lules del tipus A i del tipus In (Làm. XXI – Figs. A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>).

La longitud de l'estadi és de  $373,3 \pm 185,7 \mu\text{m}$ , i la freqüència relativa i la durada de  $9,0 \pm 1,9 \%$  i 0,77 dies, respectivament.

### **Estadi VII**

Aquest estadi, de  $71,2 \pm 9,7 \mu\text{m}$  d'alçada, es caracteritza per la presència d'espermàtides arrodonides distribuïdes en tres o quatre línies i, pel moviment de les espermatòides en fase d'elongació des de les criptes de les cèl·lules de Sertoli cap al lumen. La població d'espermatòcits està constituïda per una única línia que conté, principalment, cèl·lules en zigotè, però també unes poques cèl·lules en paquitè, mentre que, la població d'espermatogònies està formada per espermatogònies A i B (Làm. XXII – Figs. A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>).

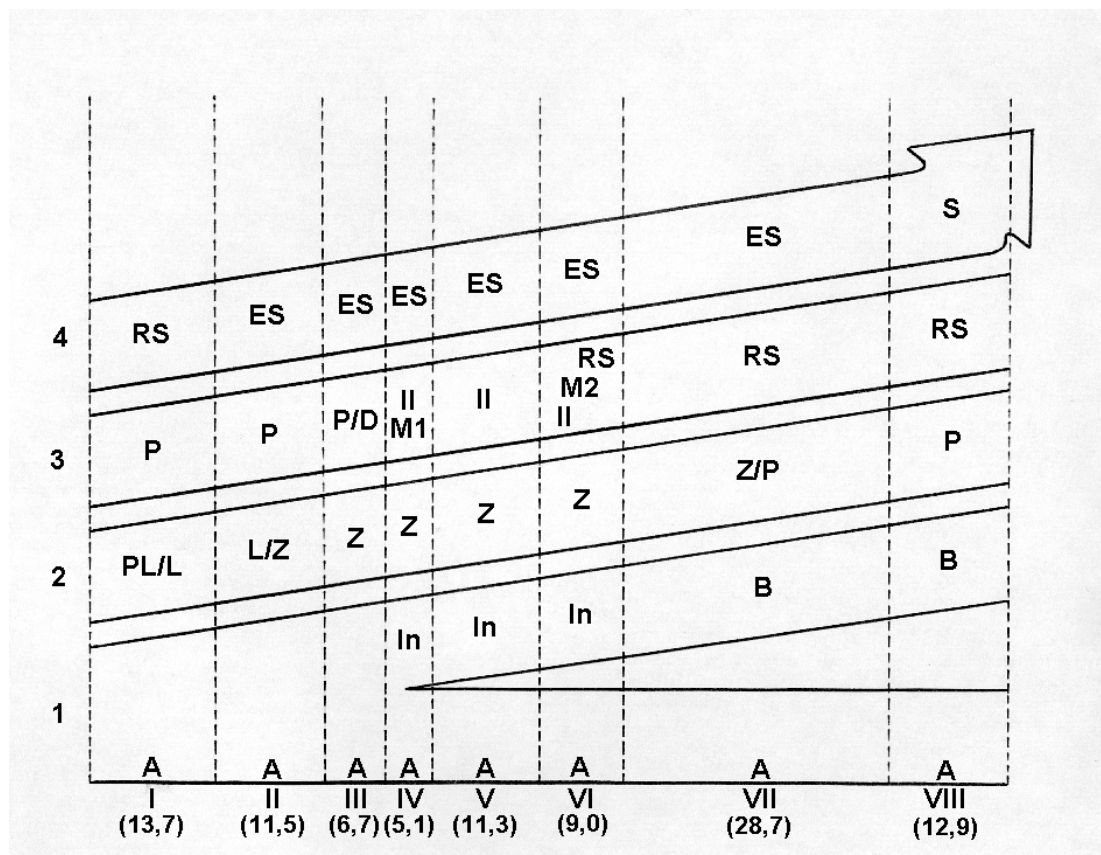
L'estadi VII és el més llarg del cicle espermatogènic, amb una longitud de  $880,4 \pm 458,2 \mu\text{m}$ , una freqüència relativa de  $28,7 \pm 13,1 \%$  i una durada de 2,48 dies.

### **Estadi VIII**

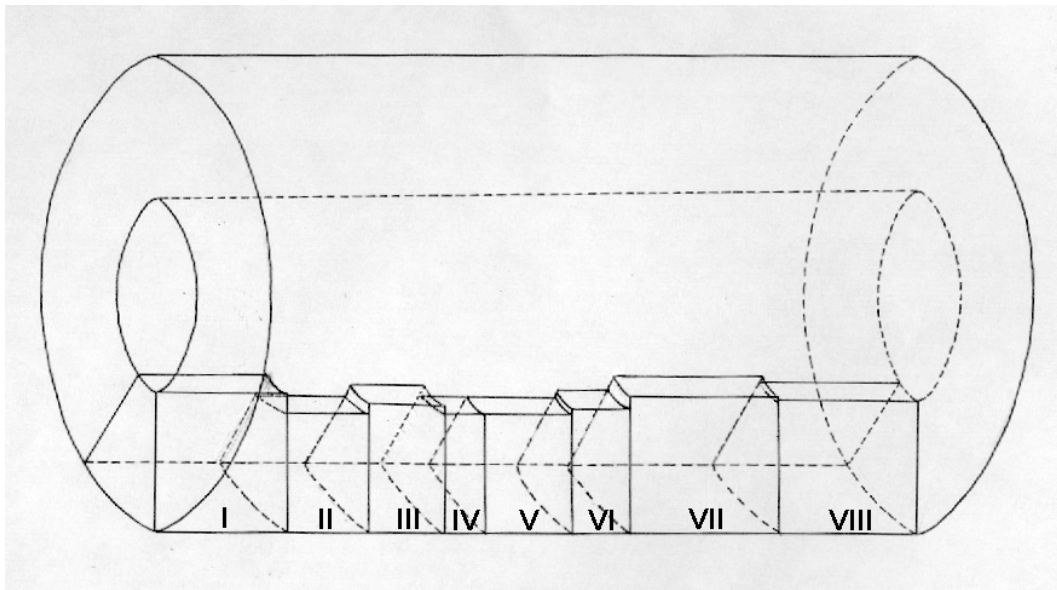
A l'estadi VIII del cicle espermatogènic, l'alçada de l'epiteli seminífer és de  $70,1 \pm 8,9 \mu\text{m}$  i, es caracteritza per l'espermiació de les espermatòides allargades; d'aquest procés en resulten abundants cossos residuals al citoplasma apical de les cèl·lules de Sertoli. Per sota

de les espermàtides en fase d'elongació, hi ha les espermàtides arrodonides distribuïdes en quatre línies. Els espermatoïcits es distribueixen en una o dues línies compostes per poques cèl·lules en zigotè i abundants espermatoïcits paquitens. El compartiment basal de l'epiteli seminífer conté espermatoïcits A i B (Làm. XXIII – Figs. A1 i A2).

Aquest estadi té una longitud de  $843,1 \pm 531,9 \mu\text{m}$ , i mostra una freqüència relativa de  $12,9 \pm 5,4 \%$  i una durada d'1,12 dies.



**Figura 5.** El diagrama mostra el procés d'espermatogènesi de forma esquematitzada. Amb números romans s'indiquen els estadis del cicle i amb números aràbics s'indiquen els cicles que comprèn el procés d'espermatogènesi en porcí. També es representen, entre parèntesi, les freqüències relatives d'aparició (%) de cada estadi. L'amplada de la columna és proporcional a la durada de cada estadi. Les lletres que apareixen dins de cada columna representen els tipus de cèl·lules germinals característics de cada estadi. A, espermatoïcits A; In, espermatoïcits intermedis; B, espermatoïcits B; PL, espermatoïcits preleptotens; L, espermatoïcits leptotens; Z, espermatoïcits zigotens; P, espermatoïcits paquitens; D, espermatoïcits diplotens; M1, espermatoïcits primaris en la primera divisió meiótica; II, espermatoïcits secundaris; M2, espermatoïcits secundaris en la segona divisió meiótica; RS, espermàtides arrodonides; ES, espermàtides en fase d'elongació; S, espermatoïcits.



**Figura 6.** L'esquema mostra l'ona espermatogènica de porcí. Cada porció representa un estadi; l'amplada i l'alçada de cada porció és proporcional a la longitud i a l'alçada de l'epiteli seminífer, respectivament.

Per tal de decidir si la freqüència d'aparició d'un estadi depèn de la seva longitud o del temps en què l'epiteli seminífer roman en aquell estadi, s'han comparat, mitjançant el test *t-Student* amb un nivell de significació de  $P < 0,01$ , les freqüències relatives d'aparició per cada un dels estadis del cicle espermatogènica amb les seves respectives longituds expressades com a freqüències relatives (Taula 5, vegeu pàg. 62). Els resultats indiquen

que no hi ha diferències significatives entre les freqüències relatives d'aparició i les freqüències relatives de la longitud.

**TAULA 5.** Freqüències relatives d'aparició (%) i freqüències relatives de la longitud (%) de cada un dels estadis del cicle de l'epiteli seminífer

Estadi	Freqüència d'aparició (%)	Freqüència de la longitud (%)	Nivell de significació*
Estadi I	13,7	16,4	0,2766
Estadi II	11,9	11,2	0,4105
Estadi III	6,7	10,4	0,1106
Estadi IV	5,1	5,3	0,4535
Estadi V	11,3	11,4	0,4925
Estadi VI	9,0	7,9	0,2313
Estadi VII	28,7	18,7	0,0418
Estadi VIII	12,9	17,9	0,1253

\* Es consideren resultats significatius  $P < 0,01$

La distribució i el nombre de cèl·lules de Sertoli a l'epiteli seminífer al llarg del cicle espermatogènic és força regular i constant.

Per tal de determinar l'evolució numèrica que experimenten els diferents tipus de cèl·lules germinals al llarg del cicle espermatogènic, s'ha calculat per a cada un dels estadis del cicle el número de cèl·lules de Sertoli respecte al número d'espermatogònies, d'espermatòcits primaris, d'espermatòcits secundaris, d'espermàtides arrodonides i, d'espermàtides en fase d'elongació (Taula 6, vegeu pàg. 63). Els resultats i llur anàlisi estadística indiquen que, les espermàtides arrodonides i les espermàtides en fase

d'elongació són els dos tipus cel·lulars que no varien en número al llarg del cicle espermatogènic.

**TAULA 6.** Núm. de cèl·lules de Sertoli (SC) respecte al núm. d'espermatogònies (SG), núm. d'espermatòcits primaris (SPI) i secundaris (SPII), núm. d'espermàtides arrodonides (RS) i espermàtides en fase d'elongació (ES) a cada un dels estadis del cicle de l'epiteli seminífer\*

Estadi	SC/SG	SC/ SPI	SC/SPII	SC/RS	SC/ES
Estadi I	$0,3133 \pm 2,975 \times 10^{-2}$	$0,1262 \pm 1,428 \times 10^{-2}$	-----	$5,930 \times 10^{-2} \pm 6,741 \times 10^{-3}$	-----
Estadi II	$0,3741 \pm 4,746 \times 10^{-2}$	$0,1442 \pm 1,510 \times 10^{-2}$	-----	-----	$6,700 \times 10^{-2} \pm 6,088 \times 10^{-3}$
Estadi III	$0,5464 \pm 6,570 \times 10^{-2}$	$0,1396 \pm 1,329 \times 10^{-2}$	-----	-----	$7,580 \times 10^{-2} \pm 7,614 \times 10^{-3}$
Estadi IV	$0,3830 \pm 4,145 \times 10^{-2}$	$0,1060 \pm 8,377 \times 10^{-3(2)}$	$2,0906 \pm 0,5627^{(1)}$	-----	$5,400 \times 10^{-2} \pm 2,201 \times 10^{-3}$
Estadi V	$0,4827 \pm 3,460 \times 10^{-2}$	$0,4692 \pm 8,140 \times 10^{-2(1)}$	$0,1096 \pm 1,003 \times 10^{-2(2)}$	-----	$7,400 \times 10^{-2} \pm 7,603 \times 10^{-3}$
Estadi VI	$0,4516 \pm 4,918 \times 10^{-2}$	$0,3714 \pm 5,546 \times 10^{-2(1)}$	$1,0743 \pm 0,3727$	$7,960 \times 10^{-2} \pm 9,013 \times 10^{-3}$	$8,140 \times 10^{-2} \pm 7,709 \times 10^{-3}$
Estadi VII	$0,6948 \pm 9,127 \times 10^{-2(1)}$	$0,3225 \pm 3,546 \times 10^{-2}$	-----	$7,460 \times 10^{-2} \pm 8,761 \times 10^{-3}$	$8,140 \times 10^{-2} \pm 7,709 \times 10^{-3}$
Estadi VIII	$0,4605 \pm 7,722 \times 10^{-2}$	$0,2302 \pm 1,988 \times 10^{-2}$	-----	$6,320 \times 10^{-2} \pm 4,057 \times 10^{-3}$	-----

\* Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD

Per cada paràmetre: el superíndex 1 agrupa els valors significativament més elevats, i el superíndex 2 agrupa els valors significativament més baixos. Es consideren resultats significatius  $P < 0,01$

A l'apartat de Material i Mètodes del present treball s'ha proposat un sistema d'equacions (Equació 2, vegeu apartat de Material i Mètodes pàg. 44) que permet calcular l'àrea que ocupa l'epiteli seminífer i/o el lumen a partir de l'àrea d'un túbul seminífer tallat en secció transversal. Per poder aplicar aquesta metodologia ha estat necessari primer establir el valor de la constant ( $\omega$ ) que relaciona l'epiteli seminífer i el lumen. El valor únic de  $\omega$  s'ha obtingut després d'establir aquest paràmetre per a cada un dels estadis del cicle, la qual

cosa ha implicat calcular les àrees tubular, luminal i de l'epiteli seminífer per a cada estadi del cicle espermatogènic (Taula 7, vegeu pàg. 64).

**TAULA 7.** Relació entre l'epiteli seminífer (ES) i el lumen (L) calculada a partir de les àrees ocupades per epiteli seminífer i lumen per a cada estadi del cicle espermatogènic

Estadi	Àrea tubular ( $\mu\text{m}^2$ )* (n = 750)	Àrea epiteli seminífer ( $\mu\text{m}^2$ )*	Àrea lumen ( $\mu\text{m}^2$ )*	ES/L = $\omega$
Estadi I	42.386,809 $\pm$ 235,823 (n = 104)	36.750,961 $\pm$ 149,66	5.635,848 $\pm$ 86,16	6,52
Estadi II	41.523,609 $\pm$ 432,411 (n = 87)	32.509,722 $\pm$ 229,94	9.013,887 $\pm$ 202,47	3,61
Estadi III	42.196,809 $\pm$ 281,109 (n = 52)	34.686,137 $\pm$ 163,30	7.510,672 $\pm$ 117,81	4,62
Estadi IV	42.322,409 $\pm$ 341,685 (n = 40)	32.865,687 $\pm$ 182,07	9.456,722 $\pm$ 159,62	3,47
Estadi V	41.644,409 $\pm$ 261,322 (n = 85)	32.437,663 $\pm$ 137,59	9.206,746 $\pm$ 123,73	3,52
Estadi VI	41.272,009 $\pm$ 291,461 (n = 68)	32.933,247 $\pm$ 159,27	8.338,762 $\pm$ 132,19	3,95
Estadi VII	41.434,009 $\pm$ 324,108 (n = 216)	35.451,004 $\pm$ 201,36	5.983,005 $\pm$ 122,75	5,92
Estadi VIII	40.893,608 $\pm$ 269,651 (n = 98)	34.814,258 $\pm$ 165,08	6.079,350 $\pm$ 104,57	5,73

\*Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD

D'acord amb els resultats obtinguts i mitjançant la fórmula (Equació 1, vegeu apartat de Material i Mètodes pàg. 43) presentada a l'apartat de Material i Mètodes del present treball, la relació mitjana entre l'epiteli i el lumen vàlida per a qualsevol estadi del cicle és de 5,04.



Tenint en compte que la secció transversal d'un túbul seminífer és circular i, que la seva àrea mitjana és de  $41.598,158 \pm 7.376,401 \mu\text{m}^2$ , el diàmetre d'un túbul seminífer és de  $230,44 \pm 1,49 \mu\text{m}$ .

## DISCUSSIÓ

En el present estudi, els testicles dret i esquerre dels mascles porcins sans i adults tenen un pes similar, essent la mitjana de 330,80 g. La manca de diferències en la grandària entre els testicles dret i esquerre coincideix amb el que s'ha publicat per diverses espècies de mamífers com l'home, toro, cavall, i rata (Suda i col., 1992; Zanella i col., 1999, Gottreich i col., 2000). En porcí, el pes del parell testicular es considera que està molt relacionat amb el pes corporal (Okwun i col., 1996). En aquest estudi hem trobat que constitueix al voltant del 0,46 % del pes corporal, aquest resultat coincideix amb altres publicats per diversos autors en porcs adults (Okwun i col., 1996; Ford i col., 1997; Zanella i col., 1999). En grans mamífers el pes del parell testicular varia d'acord amb l'espècie, però és també inferior a l'1 % del pes corporal (de Kretser i Kerr, 1994; Zanella i col., 1999); no obstant, en rosegadors constitueix més d'un 1 % del pes corporal (Sprando i col., 1999). Diverses patologies testiculars primàries i secundàries com la criptorquídia, el varicocele, la restricció alimentària, el fotoperíode, l'estrés, i l'edat resulten en una hipotrofia dels testicles (Mieusset i col., 1995; Pinart i col., 1999a, 2001c; Gottreich i col., 2000; Young i col., 2000). Tant en condicions patològiques com en condicions normals, s'ha trobat una correlació positiva entre el pes testicular i els nivells de testosterona en sang (Gottreich i col., 2000), i entre el pes testicular i la producció espermàtica (Suda i col., 1992; Ford i col., 1997). La inseminació artificial en porcí està experimentant una demanda creixent (Ford i col., 1997); en aquest sentit, la correlació positiva entre la producció espermàtica i el pes testicular, fa de la valoració de la grandària testicular una eina molt valuosa en la pràctica rutinària (Kliesch i col., 1994).

Existeixen poques dades sobre les característiques morfològiques i morfomètriques de la càpsula testicular de les espècies de mamífer. La càpsula es divideix, generalment, en tres capes que difereixen en gruix i composició (Setchell, 1978; Nakano, 1994; Arenas i col.,

1997; Wrobel i Moustafa, 2000): la túnica vaginalis, la túnica albugínia i la túnica vasculosa. En porcí, s'ha trobat que la túnica vasculosa és la capa més desenvolupada, ocupant prop del 65 % de la càpsula testicular; en rosegadors, Nakano (1994) va publicar que la túnica albugínia comprenia la part més gran de la càpsula, però no existeix cap dada sobre la seva proporció. La càpsula testicular dels porcs està formada per un teixit conjuntiu fibrós amb abundants fibres de col·lagen i elàstiques i, un contingut variable de fibroblasts, cèl·lules musculars llises, cèl·lules mastocitàries i vasos sanguinis. Un patró estructural similar s'ha descrit en humans (de Kretser i Kerr, 1994) i en cavalls (Wrobel i Moustafa, 2000).

La presència de cèl·lules musculars ha estat descrita a la càpsula testicular d'humans, conills, gats, gossos i cavalls (de Kretser i Kerr, 1994); en rosegadors, la càpsula conté miofibroblasts més que cèl·lules musculars llises (Sánchez i col., 1991; Dadoune i Demoulin, 1993). Les cèl·lules musculars llises són responsables de les contraccions rítmiques de la càpsula testicular, que exerceixen un important paper en el transport dels espermatozoides des del testicle cap a l'epidídim (Ellis i col., 1978; de Kretser i Kerr, 1994; Arenas i col., 1997) així com també, en el manteniment de la pressió intratesticular (Davis i Langford, 1970; Free i Jaffe, 1972; Rikimaru i col., 1972; Langford i Heller, 1973; Leeson i Cookson, 1974; Leeson, 1975; Ellis i col., 1978; Chacón-Arellano i Woolley, 1980; Sosnik, 1985; Trainer, 1987 i 1992). L'activitat contràctil de les cèl·lules musculars llises és probablement miogènica (Hargrove i Ellis, 1976), no d'origen nerviós, ja que hi ha pocs nervis terminals entre les cèl·lules musculars (Leeson i Cookson, 1974). La freqüència de contracció varia segons les espècies; en l'home es produeix una contracció cada 14 minuts (Davis i Langford, 1970; Firlit i col., 1975; Dadoune i Demoulin, 1993), en porcí, en canvi, la freqüència varia entre 5 i 30 contraccions cada 10 minuts (Ohanian i col., 1979). En conills les contraccions de la càpsula són màximes a 32 °C i s'inhibeixen a temperatures per sobre o per sota d'aquesta (Davis i Horowitz, 1979).

D'acord amb Nakano (1994), les fibres de col·lagen ajuden a la contracció de la càpsula testicular canviant la seva organització, mentre que, les fibres elàstiques ajuden a les fibres de col·lagen a retornar a la seva posició inicial durant la relaxació de la càpsula. L'edat (Arenas i col., 1997), la hipertèrmia (de Kretser i Kerr, 1994) i les drogues (Sánchez i col., 1991) estan associades a un increment del gruix i a una disminució de la contractibilitat de la càpsula.

Els vasos sanguinis de la càpsula estan implicats en la termoregulació de la sang testicular (Wrobel i Brandl, 1998), mentre que, les cèl·lules mastocitàries perivasculares secreten materials vasoactius que influeixen en els vasos sanguinis del testicle (de Kretser i Kerr, 1994). La presència de fibres adrenèrgiques i colinèrgiques a la càpsula també està descrita en humans i rates (Rauchenwald i col., 1995), mentre que, la neuroquímica de les fibres nervioses que innerven el testicle dels grans mamífers és poc coneguda (Lakomy i col., 1997). Les fibres adrenèrgiques i colinèrgiques intervenen en la resposta contràctil de les cèl·lules musculars llises (Rauchenwald i col., 1995) i regulen el to vascular (Wrobel i Moustafa, 2000); per tant, exerceixen un paper essencial en el control de la temperatura i la tensió capsular (Rauchenwald i col., 1995; Lakomy i col., 1997; Wrobel i Brandl, 1998).

A la cara posterior del testicle, en la regió de contacte amb l'epidídim, la túnica albugínia presenta un engruiximent que dóna origen al mediastí testicular, del qual en parteixen uns tabics fibrosos prims, anomenats *septula testis*. Aquests septes s'organitzen de forma radial i divideixen el testicle en compartiments piramidals que reben el nom de lòbuls testiculars. Cap a la regió perifèrica, els septes poden ser incomplets, de manera que, els lòbuls queden intercomunicats. El nombre de septes que es diferencien a partir del mediastí testicular varia segons les espècies; en humans, per exemple, el testicle es divideix en uns 300 lòbuls molt ben definits, cada un dels quals conté 3 o 4 túbuls seminífers. Aquesta divisió no és tan clara en els mamífers domèstics com, per exemple, en toro (Hees i col., 1990). En rosegadors, hi ha una absència total de septes testiculars (Dadoune i Demoulin, 1993) i, en el cas particular de les rates, els testicles tenen uns 30 túbuls seminífers (Dym, 1976). En el vèrtex de cada lòbul testicular, els túbuls seminífers esdevenen túbuls rectes, i constitueixen el primer segment de conductes excretors. Els túbuls rectes convergeixen a la *rete testis*, una xarxa de conductes dins del teixit conjuntiu del mediastí testicular. Els túbuls seminífers de la major part de les espècies de mamífers presenten un gran nombre de circumvolucions i tenen els dos extrems del tub units a la *rete testis*.

En el present estudi s'ha determinat que els túbuls seminífers dels mascles porcins sans ocupen un 72 % del parènquima testicular; aquest resultat és molt similar als descrits per altres autors en porcs adults (Kretser i Kerr 1994; Okwun i col., 1996; Pinart i col., 2001c). El fet que el resultat obtingut no sigui significativament diferent al dels altres autors, valida el mètode informàtic emprat per determinar el percentatge de parènquima testicular ocupat pels túbuls seminífers. El percentatge de túbuls seminífers és del 90 % en gossos, 85 % en

bens, 70-75 % en humans i, 70 % en cavalls (de Kretser i Kerr, 1994; Markey i col., 1994; Okwun i col., 1996). Els desordres testiculars primaris porten a un desenvolupament reduït dels túbuls seminífers i a un gran desenvolupament del teixit intersticial en els adults (Markey i col., 1994; Pinart i col., 1999a, 2001c). En rates, la longitud dels tubs és d'uns 12 metres per gram de parènquima testicular (m/g) i ocupen una àrea superficial d'uns 120 cm<sup>2</sup>/g (Setchell i col., 1994). En bens, la longitud total dels tubs és de 3.000 m, uns 11 m/g, amb una àrea basal d'uns 85 cm<sup>2</sup>/g (Langford i Heller, 1973) i, en humans varia entre 15 i 25 m/g (Langford i Silver, 1974). La longitud dels túbuls seminífers disminueix amb l'edat, alhora que disminueix també el pes testicular (Langford i Silver, 1974).

El diàmetre tubular varia en funció de les espècies, essent d'entre 200 i 250 µm en bens i d'entre 300 i 400 µm en humans (Dadoune i Demoulin, 1993); en rates adultes, el diàmetre tubular varia d'entre 50 i 100 µm (Wing i Christensen, 1982). En els mascles porcins sans i adults, el diàmetre mitjà dels túbuls seminífers és d'uns 230 µm. Aquest valor mitjà pel diàmetre tubular és molt similar al descrit per Okwun i col. (1996) en tres races porcines diferents. El fet que el resultat obtingut no sigui significativament diferent als resultats publicats, fa que el mètode informàtic presentat en aquest treball per determinar el diàmetre tubular sigui fiable.

Dins dels túbuls seminífers s'hi distingeix un epitel·li seminífer, d'uns 65 µm d'alçada, que està constituït per cèl·lules de Sertoli i tres generacions de cèl·lules germinals: les espermatogònies, els espermatòcits i les espermatides. Característiques morfològiques i morfomètriques similars han estat descrites en humans (de Kretser i Kerr, 1994), bens (Markey i col., 1994), i porcs (Okwun i col., 1996). Tant el diàmetre tubular (Sprando i col., 2000), com la composició de cèl·lules germinals (Yazawa i col., 1999), es consideren els marcadors més sensibles de l'activitat espermatogènica; així doncs, la concentració espermàtica es correlaciona positivament amb el diàmetre mitjà dels túbuls seminífers (Sprando i col., 2000) i amb el nombre d'espermàtides de l'epitel·li seminífer (Gottreich i col., 2000; Sprando i col., 2000).

L'estrés, l'excés i la manca de llum, les altes temperatures, l'estat sanitari o l'edat, normalment, es manifesten en una disminució de la producció espermàtica (Suda i col., 1992; Yazawa i col., 1999; Gottreich i col., 2000; Veeramachaneni, 2000). Sota aquestes condicions, la disminució de la concentració espermàtica s'atribueix, normalment, a l'aturada parcial de l'espermatogènesi a l'estat d'espermatòcit com a conseqüència

d'anomalies en la meiosi (Gottreich i col., 2000; Sprando i col., 2000). Els espermatòcits que no progressen, experimenten una mort cel·lular programada (Fujisawa i col., 1998) que té com a resultat un nombre reduït d'espermàtides a l'epiteli seminífer, una disminució de l'alçada epitelial i del diàmetre tubular i, una vacuolització de les cèl·lules de Sertoli com a conseqüència de la degeneració de les cèl·lules germinals (Pinart i col., 1999b; Sprando i col., 1999, 2000; Gottreich i col., 2000).

La làmina pròpia que envolta els túbuls seminífers, d'un gruix de 4-4,5  $\mu\text{m}$ , està constituïda per una línia no-cel·lular interna, la làmina basal, i dos línies de cèl·lules peritubulars; les cèl·lules peritubulars més internes són cèl·lules mioïdes i les cèl·lules peritubulars més externes són fibroblasts. Aquesta organització de la làmina pròpia és comú en tots els grans mamífers (Dadoune i Demoulin, 1993). Okwun i col. (1996) van descriure que, en porcí, el gruix de la làmina pròpia està entre 4 i 5  $\mu\text{m}$  d'acord amb la raça. La presència d'una única línia de cèl·lules mioïdes ha estat descrita en rates, ratolins, conills, gats i gossos (Christl, 1990). En cavalls, la làmina pròpia testicular conté dos línies de cèl·lules mioïdes (Christl, 1990), mentre que, en primats i humans aquest nombre està entre dos i cinc (Verhoeven i Hoeben, 1995). Tot i aquestes diferències en el nombre de capes, la morfologia i la funció de les cèl·lules mioïdes és similar en totes les espècies de mamífers (Christl, 1990; Verhoeven i Hoeben, 1995); aquestes cèl·lules són les responsables de la contracció tubular la qual facilita el transport dels espermatozoides cap als conductes eferents (Fawcett, 1987; Maekawa i col., 1995). La freqüència i la intensitat de la contracció no semblen estar associades a cap estadi particular del cicle de l'epiteli seminífer (Suvanto i Kormanó, 1970b), però incrementen quan s'eleva la temperatura (Suvanto i Kormanó, 1970a). Els fibroblasts intervien en la comunicació entre els túbuls seminífers i el teixit intersticial, mentre que, els components extracel·lulars mantenen la cohesió estructural de la làmina pròpia i, per tant, dels túbuls seminífers (Verhoeven i Hoeben, 1995). Una mala regulació de la temperatura testicular a causa d'estrés per calor, criptorquídia, o varicocele provoca una pèrdua de la contractibilitat de les cèl·lules mioïdes, un increment del gruix de la làmina pròpia i, una composició anormal dels components extracel·lulars (Maekawa i col., 1995; Pinart i col., 2001a).

El teixit intersticial omple els espais entre els túbuls seminífers. Es tracta d'un teixit conjuntiu lax que conté fibroblasts (Dadoune i Demoulin, 1993), macròfags (Christensen i Gillim, 1969; Christensen, 1975; Maseki i col., 1981; Miller i col., 1984; Niemi i col.,

1986), cèl·lules encebades o mastòcits (Hermo i Lalli, 1978; Nistal i col., 1984; Christensen i col., 1985; Gordons i col., 1990; Antón i col., 1998); i també conté les cèl·lules de Leydig que constitueixen la porció endocrina del testicle. Al teixit intersticial arriben petits vasos sanguinis i limfàtics i nervis tant del tipus adrenèrgic, que se situen en contacte amb els vasos sanguinis, com del tipus colinèrgic, responsables de la sensació de dolor després d'un trauma testicular (Dadoune i Demoulin, 1993). La quantitat de teixit intersticial varia entre espècies (Fawcett, 1973; Ross i Dobler, 1975). En bens i en la majoria de rosegadors, el teixit intersticial representa el 15 % de la massa testicular, en humans entre el 25 % i el 30 % i en cavalls el 25 %. En aquest treball s'ha determinat que el teixit intersticial en porcí ocupa el 28 % del parènquima testicular, front del 40 % que recull la bibliografia consultada (Johnson i Neaves, 1981; Sosnik, 1986). L'espai intertubular de porcins i d'equins està totalment ocupat per cèl·lules de Leydig, mentre que, en altres espècies s'observen escassos grups d'aquestes cèl·lules entre el teixit conjuntiu intersticial (Fawcett i col., 1973; Setchell i Cox, 1982; Setchell i col., 1983; Dadoune i Demoulin, 1993; Antón i col., 1998). Aquesta diferència, tant en el nombre com en el volum de les cèl·lules de Leydig, podria estar relacionada amb la gran quantitat d'estrògens que secreten tant porcins com equins (Setchell i col., 1973; Setchell i Cox, 1982).

Les cèl·lules de Leydig dels mascles porcins sans i adults presenten una forma poligonal (ca. 15 x 12 µm) i un nucli perifèric oval o arrodonit. Característiques estructurals similars han estat descrites en les cèl·lules de Leydig d'humans, mones, porcs, cavalls, gossos i rosegadors (de Kretser i Kerr, 1994; Ariyaratne i Mendis-Handagama, 2000; Pinart i col., 2001c). En els mascles porcins sans, les cèl·lules de Leydig estan implicades activament en la síntesi i secreció d'andrògens (Ariyaratne i Mendis-Handagama, 2000); però també secreten factors angiogènics que exerceixen un paper molt important en la regulació del flux sanguini, el creixement dels vasos sanguinis i la permeabilitat vascular (Haider i Servos, 1998) i, factors paracrins implicats en el control de la població de leucòcits (Meinhardt i col., 1998). L'esteroidogènesi es veu afectada negativament per l'edat avançada, les drogues, la calor i les toxines (Ettlin i col., 1992; Ariyaratne i Mendis-Handagama, 2000); sota aquestes condicions, les anomalies en la població de cèl·lules de Leydig es desenvolupen de forma secundària, com a conseqüència d'una reducció de l'espermatogènesi (Petersen i col., 1999). A més d'una disminució de la producció de testosterona, la funció anormal de les cèl·lules de Leydig comporta un increment en el nombre i la permeabilitat dels vasos sanguinis, extravassament de leucòcits i mastocitosi

(Meinhardt i col., 1998; Gottreich i col., 2000; Pinart i col., 2001c). Les cèl·lules de Leydig presenten dues afinitats tintorials diferents quan seccions semifines són tenyides amb Blau de Metilè. Les cèl·lules que queden colorejades d'un blau intens mostren, alhora, un nuclèol molt prominent la qual cosa podria indicar que aquestes cèl·lules tenen una intensa activitat esteroïdògena.

La població de fibroblasts és poc desenvolupada al teixit intersticial testicular dels mascles porcins sans. Existeixen molt poques dades sobre la funció dels fibroblasts al testicle en els mascles porcins adults sans; segons Schteingart i col. (1999), aquestes cèl·lules participen en la regulació de l'activitat de les cèl·lules de Sertoli. La morfologia i la funció dels fibroblasts està sota control de les cèl·lules de Sertoli, per tant, les anomalies en la funció de les cèl·lules de Sertoli es manifesten amb un increment del nombre de fibroblasts associats, que podria resultar en una fibrosi del teixit intersticial (Pinart i col., 2001c).

Els testicles dels mascles porcins sans contenen molt poques cèl·lules mastocitàries que, a més, es localitzen preferentment a les proximitats dels vasos sanguinis tant de la càpsula com del teixit intersticial. Antón i col. (1998) descriuen en porcs el mateix patró de distribució per a les cèl·lules mastocitàries, però observen abundants cèl·lules d'aquest tipus, sobretot, al teixit intersticial.

El contingut de cèl·lules mastocitàries difereix notablement entre les espècies de mamífers; en humans, gats, gossos i cavalls les cèl·lules mastocitàries són força abundants, mentre que són absents en rosegadors, toros, cérvols, i llebres (Antón i col., 1998; Meinhardt i col., 1998). En els mascles porcins sans, les cèl·lules mastocitàries testiculars participen en la regulació de la producció de testosterona i del flux vascular (Meinhardt i col., 1998). La infertilitat idiopàtica, l'atrofia dels túbuls seminífers, la transformació de les cèl·lules germinals en malignes i, la criptorquídia abdominal porten a una mastocitosi que provoca una fibrosi i una inflamació crònica dels testicles (Pinart i col., 2001c). Els grànuls citoplasmàtics de les cèl·lules mastocitàries són tan nombrosos que fan que el citoplasma d'aquestes cèl·lules aparegui fortament tenyit amb el Blau de Toluidina. Aquests grànuls contenen proteoglicans (heparina), proteases, hidrolases àcides, histamina i serotonina (Gordons i col., 1990). La presència de substàncies vasoactives, com la histamina i la serotonina, determina que les cèl·lules mastocitàries es localitzin de manera preferencial al voltant dels vasos sanguinis (Sowerbutts i col., 1986; Aguilar i col., 1995; Antón i col., 1998).



Segons Takeda (1989), la presència de cèl·lules mastocitàries està associada a la síntesi de col·lagen dels teixits conjuntius, tant en condicions fisiològiques com en condicions patològiques. No obstant, en el cas del testicle això no sembla ésser cert. En bens i toro hi ha un contingut molt elevat de teixit conjuntiu intersticial però, a cap de les dues espècies no s'observen cèl·lules mastocitàries en el testicle (Pöllänen i Maddocks, 1988; Antón i col., 1998). En canvi, en el testicle de cavall i de porc, tot i la presència de cèl·lules mastocitàries hi ha un contingut escàs de teixit conjuntiu intersticial (Antón i col., 1998). Actualment, es creu que l'elevat nombre de cèl·lules mastocitàries en el parènquima i la càpsula testiculars de porcí és indicatiu que aquestes cèl·lules tenen un paper molt important en la regulació local paracrina i autocrina de les funcions testiculars, a més de regular el flux vascular. Adashi (1990) i Schlatt i col. (1977) van demostrar que aquestes cèl·lules immunitàries alliberen citoquines i pèptids reguladors dels òrgans reproductors. La histamina estimula la producció de testosterona en hámster (Mayerhofer i col., 1989), mentre que, la serotonina inhibeix l'esteroidogènesi en rata (Xiong i Hales, 1993).

El present treball descriu les característiques testiculars dels mascles porcins madurs i sans amb els paràmetres espermàtics normals, aquests mascles sans no presenten diferències entre ells en relació als marcadors testiculars morfològics i morfomètrics. Seran necessaris altres estudis amb mascles porcins sans i subfèrtils per tal de correlacionar millor els paràmetres espermàtics i l'estructura testicular. A més, la determinació de diferències testiculars existents entre els mascles porcins sans i subfèrtils contribuirà a entendre millor com es veu afectada l'espermatogènesi sota condicions patològiques (Silber i col., 1997).

Les diferències en el nombre d'estadis del cicle de l'epiteli seminífer entre espècies de mamífers són, bàsicament, conseqüència de diferències en el criteri morfològic emprat per a la classificació (Sharpe, 1994; Paula i col., 1999). El mètode de la morfologia tubular proporciona 8 estadis en els mamífers domèstics, 6 estadis en humans i en primats, i de 12 a 14 estadis en rosegadors (Hess i col., 1990; Suswillo i Watson, 1990; van Haaster i de Rooij, 1993; Sharpe, 1994; Griswold, 1995; Onyango i col., 2000). No obstant, és molt important fer notar que els límits entre aquests estadis no són tan definits com en un principi sembla i, que l'inici i el final de la majoria d'esdeveniments d'un estadi es poden solapar amb un altre estadi (Suswillo i Watson, 1990; de Kretser i Kerr, 1994; Paula i col., 1999).

En el present estudi, s'ha observat que una secció d'un túbul seminífer conté un únic estadi. Aquests resultats són similars als que s'han publicat en rosegadors (Paula i col., 1999) i en mamífers domèstics (França i Cardoso, 1998; França i col., 1998, 1999). En primats i en humans, el cicle espermatogènic es distribueix asimètricament, el que fa que s'observin dos o més estadis per secció transversal (Sharpe, 1994; França i Cardoso, 1998).

Les cèl·lules germinals es desenvolupen com un sinciti, a causa que després de cada divisió no es produeix una citocinesi completa, com a resultat les cèl·lules es mantenen unides per ponts intercel·lulars. El fet que les cèl·lules germinals quedin connectades entre si, permet un desenvolupament sincronitzat i una ràpida comunicació entre elles (Guraya, 1987; Alastalo i col., 1998; Hess, 1999). Aquesta sincronia en el desenvolupament de les cèl·lules germinals fa que apareguin a l'epiteli seminífer un gran nombre de cèl·lules germinals en el mateix nivell de desenvolupament.

D'acord amb la bibliografia, el procés d'espermioogènesi es divideix en quatre fases: la fase Golgi (1), la fase caputxó (2), la fase acrosòmica (3) i la fase de maduració (4) (Guraya, 1987; Wrobel i Dellman, 1998). Cada una d'aquestes fases es caracteritza per una reorganització i modificació dels orgànuls citoplasmàtics que no són visibles al microscopi òptic, a excepció de la fase Golgi, atès que s'observa amb claredat la unió del grànul proacrosòmic a l'embolcall nuclear i la lleugera depressió que aquest provoca sobre el nucli. La impossibilitat de poder definir la resta de fases de l'espermioogènesi ens ha portat a anomenar, en aquest primer capítol, a les espermàtides en desenvolupament com a espermàtides en fase d'elongació.

L'associació cel·lular d'un determinat estadi es manté constant en els tres mascles reproductors porcins Landrace. En mascles porcins sans, aquesta constància en la composició cel·lular d'un estadi es pot atribuir a quatre mecanismes bàsics de regulació: (1) l'entrada de les cèl·lules mare o espermatogònies a l'espermioogènesi a intervals fixes i la durada constant dels passos espermatogènics (Ueno i col., 1991; Dym, 1994; de Kretser i Kerr, 1994), (2) els ponts citoplasmàtics entre les cèl·lules germinals en desenvolupament, que faciliten la sincronització dels esdeveniments espermatogènics (Sharpe, 1994; Grootegoed i col., 1995; Weinbauer i Wessels, 1999), (3) la comunicació entre les cèl·lules de Sertoli i les cèl·lules germinals mitjançant factors paracrins i mecanismes estructurals, que controlen la taxa de desenvolupament de les diferents generacions de cèl·lules germinals (Dym, 1994; Griswold, 1995; Okwun i col., 1996;

Weinbauer i Wessels, 1999), i (4) els cossos residuals dissociats de les espermàtides madures durant l'espermiació, que actuen com a reguladors de la funció de les cèl·lules de Sertoli (de Kretser i Kerr; 1994; Onyango i col., 2000).

El cicle de l'epiteli seminífer de *Sus domesticus* raça Landrace ha estat dividit en 8 estadis d'acord amb el mètode de la morfologia tubular, el qual es basa en la morfologia i en la localització del nucli de les espermàtides, en la presència de divisions meiòtiques i, sobretot, en la composició cel·lular de l'epiteli seminífer. Les associacions de les cèl·lules germinals observades en el cicle espermatogènic del mascle reproductor porcí Landrace són molt similars a les determinades en altres espècies tals com els porcs Piau (França i Cardoso, 1998), i porcs de les races West African, Whitecross i Meishan (Okwun i col., 1996), i de les races Yorkshire i Lacombe (Swierstra, 1968), així com també en altres espècies de mamífers tals com cabres (França i col., 1999; Onyango i col., 2000), bous (Wrobel i col., 1995), toros (Suswillo i Watson, 1990), cavalls (Swierstra i col., 1974), i gossos (Foote i col., 1992). Les petites diferències existents són conseqüència directa del criteri utilitzat per cada un dels observadors. A més, tot i que a dins d'una mateixa espècie els estadis del cicle es consideren relativament constants, s'han observat diferències en la composició cel·lular dels estadis en diferents races (Swierstra, 1968; Okwun i col., 1996; França i Russel, 1998).

En els mascles reproductors porcins Landrace, s'ha trobat que els estadis premeiòtics comprenen el 31,9 % del cicle espermatogènic, els estadis meiòtics el 16,4 % i els estadis postmeiòtics el 50,6 %. La freqüència dels estadis està directament correlacionada amb la vida mitjana de la generació de cèl·lules germinals predominant (França i col., 1999; Paula i col., 1999). Els espermatozoïts premeiòtics tenen una vida mitjana força llarga, per tant, són aquestes cèl·lules les que condueixen a estadis amb una elevada freqüència (França i Cardoso, 1998; Print i Loveland, 2000); per contra, els espermatozoïts secundaris tenen una vida mitjana curta i, per tant, els estadis en els que hi són presents presenten una baixa freqüència relativa (de Kretser i Kerr, 1994). L'esdeveniment més important dels estadis postmeiòtics és la fase de maduració de l'espermioïgenesis, la qual inclou una remodelació complexa del cap i de la cua de l'espermatozoïde, la migració de les espermàtides cap al lumen tubular i, l'alliberament dels espermatozoïdes al lumen tubular amb la formació dels cossos residuals (Gootegoed i col., 1995; Print i Loveland, 2000); la complexitat d'aquests processos està correlacionada amb la llarga durada d'aquests estadis (de Kretser i Kerr,

1994). El moviment de les espermatides cap al lumen està correlacionat amb l'increment de l'alçada de l'epiteli seminífer en aquests estadis (de Kretser i Kerr, 1994).

Les freqüències relatives dels estadis en els mascles reproductors porcins Landrace difereixen lleugerament respecte a les publicades per a altres espècies. En els porcs Piau, la freqüència dels estadis premeiòtics és del 31,4 %, la freqüència dels estadis meiòtics del 12,1 % i la freqüència dels estadis postmeiòtics del 48,6 %; i, en els mascles porcins Yorkshire i Lacombe els estadis premeiòtics ocupen el 25,2 %, els estadis meiòtics el 24,0 % i els estadis postmeiòtics el 50,8 % (Swierstra, 1968). Aquestes petites divergències en la freqüència relativa dels estadis espermatogènics es correlacionen amb les diferències en el nombre de cèl·lules germinals al testicle i amb la taxa de degeneració a diferents passos de l'espermatogènesi, els quals resulten en diferències en la producció espermàtica diària i en les característiques seminals entre races (Okwun i col., 1996). En rates (Hess i col., 1990; Paula i col., 1999) i en humans (Hikim i col., 1998), existeixen també petites variacions en la freqüència dels estadis espermatogènics entre races. En condicions patològiques, la freqüència relativa dels estadis premeiòtics, meiòtics i postmeiòtics s'utilitza com un indicador dels canvis en la cinètica de l'espermatogènesi (Hess i col., 1990) i, també dels canvis en la producció diària d'esperma (França i Cardoso, 1998).

Els resultats obtinguts en porcí difereixen dels publicats en rosegadors i altres espècies de mamífers. En rosegadors madurs, es descriuen dos patrons d'estadis pre- i postmeiòtics: (1) espècies en les quals la freqüència premeiòtica és aproximadament un quart del cicle sencer i, (2) espècies que presenten un equilibri entre la freqüència dels estadis pre- i postmeiòtics (Paula i col., 1999). En remugants, les freqüències dels estadis premeiòtics són més altes que les freqüències dels estadis postmeiòtics, mentre que, els estadis meiòtics representen aproximadament el 10 % del cicle (França i Russell, 1998; França i col., 1999). En toros, els estadis premeiòtics ocupen el 60-65 % i els estadis meiòtics i postmeiòtics el 9-13 % i el 26-27 %, respectivament (Cardoso i Godinho, 1983); en bous, la freqüència relativa és del 48-53 % pels estadis premeiòtics, del 7-8 % pels estadis meiòtics, i del 40-44 % pels estadis postmeiòtics (Cardoso i Queiroz, 1988); i, en cabres, els valors publicats són del 49-58 % pels estadis premeiòtics, del 9-11 % pels estadis meiòtics i, del 32-40 % pels estadis postmeiòtics (França i col., 1999). Les diferències entre espècies de mamífers en les freqüències relatives dels estadis espermatogènics s'atribueixen a diferències en el tipus i nombre de generacions d'espermatogònies (Okwun i col., 1996; França i col.,

1999), a la vida mitjana de les generacions d'espermatòcits i d'espermàtides presents a l'epiteli seminífer (França i Cardoso, 1998) i, a la taxa de degeneració de les cèl·lules germinals al llarg del cicle (Okwun i col., 1996).

No s'han trobat dades a la bibliografia consultada sobre la longitud espacial dels estadis del cicle espermatogènic en mamífers domèstics. En els mascles porcins Landrace s'ha trobat una correlació positiva entre la longitud d'un determinat estadi i la seva freqüència relativa, els valors mitjans han estat de 1.788,8 µm pels estadis premeiòtics, 787,1 µm pels estadis meiòtics i, 2.096,8 µm pels estadis postmeiòtics. Per contra, Hess i col. (1990) afirmen que en rates la longitud espacial i la freqüència relativa dels estadis són paràmetres que no tenen cap relació. La longitud espacial obtinguda pels mascles porcins Landrace presenta una desviació estàndard molt gran en tots els estadis; d'acord amb Swierstra (1968), la gran variació dels paràmetres quantitius entre túbuls seminífers s'explica pel fet que estan fortament enrotllats i empaquetats. Caldrien més estudis per determinar el nombre òptim de mascles porcins i de túbuls seminífers a tenir en compte per a l'adequada avaluació d'aquest paràmetre.

La freqüència relativa d'aparició d'un estadi no depèn exclusivament de la seva longitud, sinó que existeix també una correlació positiva amb el temps en què l'epiteli seminífer roman en aquell estadi en particular. En principi, la freqüència relativa d'un estadi (%) i la seva longitud expressada en percentatge han de tenir un valor similar; si els dos percentatges tenen valors significativament diferents, es pot considerar que la diferència és conseqüència de la durada relativa de l'estadi. En tots els casos, les diferències entre el percentatge de la freqüència relativa i el percentatge de la longitud no són significatives ( $P > 0,01$ ). Tot i això, el valor de  $P$  per a l'estadi VII (Taula 5, vegeu apartat de Resultats pàg. 62) s'acosta molt al nivell de significació establert ( $P < 0,01$ ), per tant, la freqüència relativa d'aparició d'aquest estadi seria en bona part conseqüència, encara que no significativament, de la durada d'aquest estadi. Aquesta durada es podria atribuir al fet que les espermàtides es troben en la fase final de l'espermioogènesi, la fase de maduració, la qual es caracteritza per ser extremadament complexa, ja que en ella es produeix: l'allargament del nucli i de l'acrosoma, la progressiva condensació de la cromatina, l'inici de l'ensamblatge de la beina mitocondrial, l'eliminació de l'excés de membrana plasmàtica que forma els complexos tubulobulbars i les últimes etapes de la formació del flagel i de la peça de connexió (Guraya, 1987).

En els mascles porcins Landrace, tot i el gran nombre de seccions transversals de túbuls seminífers examinats, la longitud i la freqüència relativa de cada estadi mostren una gran variabilitat. Les variacions en les freqüències relatives dels estadis no són un fenomen rar, i estan d'acord amb les dades obtingudes per Hess i col. (1990) en rates i per França i Cardoso (1998) en porcs Piau. La gran variabilitat dels paràmetres quantitius entre túbuls seminífers s'explica, parcialment, pel fet que aquests estan fortament enrotllats i empaquetats, tal i com ja s'ha esmentat anteriorment (Swierstra, 1968).

La durada del cicle de l'epiteli seminífer es considera constant i específica per a cada espècie; les diferències entre autors es correlacionen habitualment amb la metodologia emprada (van Haaster i de Rooij, 1993; de Kretser i Kerr, 1994; França i col., 1998). Els mètodes més sensibles són els de destrucció selectiva dels estadis espermatogènics i l'administració de  $^{32}\text{P}$  o  $^3\text{H}$ -llogat a timidina (França i Cardoso, 1998; França i col., 1999). La durada del cicle és de 12,5-13,3 dies en rates, 8,6 dies en ratolí, 8,7-9,0 dies en hámsters, 10,3 dies en conills, 13,6 dies en gossos, 10,4 dies en bens, 12,2 dies en cavalls, 13,5 dies en toros i, 16 dies en humans (Clermont, 1972; Swierstra i col., 1974; Sharpe, 1994; França i col., 1999; Paula i col., 1999). En porcí, utilitzant  $^3\text{H}$ -timidina, Swierstra (1968) va trobar una durada de 8,6 dies en les races Yorkshire i Lacombe, i França i Cardoso (1998) van trobar una durada total de 9,0 dies en la raça Piau. Coneixent la durada del cicle de l'epiteli seminífer en porcí i la freqüència relativa d'aparició per a cada un dels estadis del cicle espermatogènic, s'ha pogut calcular quant temps dura cada un dels estadis. Així s'ha estimat que l'estadi I dura 1,19 dies, l'estadi II 1,0 dia, l'estadi III 0,59 dies, l'estadi IV 0,44 dies, l'estadi V 0,97 dies, l'estadi VI 0,77 dies, l'estadi VII 2,48 dies i l'estadi VIII 1,12 dies. D'acord amb aquestes dades, el cicle de l'epiteli seminífer dels mascles porcins Landrace té una durada total de 9,6 dies. Les estimacions que s'han fet de la durada de cada estadi no són significativament diferents de les descrites en porcs per altres autors, per tant, això valida el mètode utilitzat per a determinar la durada relativa dels estadis. El nombre de cicles necessaris per completar l'espermatogènesi, així com també la durada del cicle, són trets característics de cada espècie (Clermont, 1972); en porcins, per exemple, l'espermatogènesi inclou un total de 4 cicles i dura, per tant, 34,4 dies (Swierstra, 1968). Tot i que l'espermatogènesi també inclou 4 cicles, en humans dura 64 dies (Heller i Clermont, 1963), en toros 54 dies i en bens 49 dies (Hochereau i col., 1964).

Per tant, a partir de les dades obtingudes podem concloure que les associacions de cèl·lules germinals dels estadis es mantenen constants entre mascles porcíns Landrace i, que la freqüència relativa, la longitud espacial i la durada dels estadis són directament dependents de les transformacions citològiques en els túbuls seminífers.

Hi ha nombrosos estudis sobre la topografia de les cèl·lules de Sertoli, la seva relació amb les cèl·lules germinals i els canvis de morfologia que experimenten tant en condicions fisiològiques com en condicions patològiques (Schulze, 1974; Tindall i col., 1985). En general, però, i al llarg de tot el cicle espermatogènic, les cèl·lules de Sertoli tenen una forma columnar irregular i posseeixen nombroses i fines expansions citoplasmàtiques laterals i, criptes en la seva superfície apical on es desenvolupen les espermàtides en fase d'elongació. Leblond i Clermont (1952) van observar, en rata, que les cèl·lules de Sertoli alteraven la seva forma en relació als 14 estadis del cicle espermatogènic. La determinació, però, al microscopi òptic de la forma exacta que adopten les cèl·lules de Sertoli en cada un dels estadis presenta considerables dificultats a causa de la intricada topografia d'aquestes cèl·lules i, pel fet que el poder de resolució del microscopi òptic no és suficient per detectar les ramificacions citoplasmàtiques de les cèl·lules de Sertoli. Tot i això, a partir de seccions semifines, s'ha determinat que en el testicle d'humà i de rata les cèl·lules de Sertoli ocupen un 36 % i un 11% de l'àrea de l'epiteli seminífer, respectivament (Johnson i col., 1980). Cavicchia i Dym (1977 i 1978) van demostrar en els seus treballs realitzats en ximpanzé, que les cèl·lules de Sertoli ocupen d'un 24 % a l'estadi I a un 32 % a l'estadi VII. En un estudi ultraestructural realitzat en rata per Kerr i col. (1984), es demostra que les cèl·lules de Sertoli als estadis II, VII, VIII, IX-XI i XIII-XIV del cicle espermatogènic experimenten variacions en la forma cel·lular i nuclear. Fouquet (1974) observa, també, en rosegadors que els nuclis solen ser triangulars o poligonals quan les espermàtides madures són alliberades, o bé allargats quan les espermàtides en fase d'elongació penetren profundament en l'epiteli seminífer. En humans i ximpanzés (Schulze, 1974; Dym 1973) sembla ser, en canvi, que els nuclis de les cèl·lules de Sertoli no experimenten variacions al llarg del cicle espermatogènic. El present treball demostra que el nucli de les cèl·lules de Sertoli en porcí varia de forma i de posició d'acord amb l'estadi del cicle espermatogènic.

Els canvis de forma i de volum que experimenten les cèl·lules de Sertoli en el cicle espermatogènic suggereixen que, aquestes cèl·lules tenen una contínua activitat i un elevat grau de plasticitat sincronitzada amb les poblacions mòbils de les cèl·lules germinals.

El nombre de cèl·lules de Sertoli varia segons les espècies, però aquestes cèl·lules semblen ser molt importants en la regulació de l'espermatogènesi (Johnson i col., 1999). En un principi, es pensava que el nombre de cèl·lules de Sertoli en el testicle d'un animal adult es mantenia constant (Steinberger i Steinberger, 1980), això s'ha posat en dubte en els últims anys, ja que fenòmens com la variació estacional de la producció espermàtica d'alguns animals i la reducció de la producció espermàtica diària relacionada amb l'edat, poden ser explicades teòricament per una variació en el nombre de cèl·lules de Sertoli i/o per canvis en el nombre de cèl·lules germinals associades a les cèl·lules de Sertoli. En el present treball, s'ha calculat la relació mitjana entre el número de cèl·lules de Sertoli i el número dels diferents tipus de cèl·lules germinals per a cada un dels estadis del cicle espermatogènic en porcí; aquest paràmetre, a més d'expressar de manera numèrica l'evolució dels diferents tipus de cèl·lules germinals al llarg del cicle espermatogènic, pot indicar, per exemple, si l'aturada parcial de l'espermatogènesi que es detecta en els mascles reproductors porcins afectats per diferents patologies (Pinart i col., 1998; 1999a i 1999b) es conseqüència d'una reducció en el nombre de cèl·lules de Sertoli i/o de les cèl·lules germinals en algun estadi del cicle espermatogènic.

El fotoperíode, la radiació i la quimioteràpia alteren els nivells de gonadotropines i testosterona i, fins i tot, la castració unilateral es manifesta en una disminució de la producció diària d'esperma, però sense alterar ni les característiques morfològiques ni les quantitatives del cicle espermatogènic (Meistrich, 1993; van Haaster i de Rooij, 1993; de Kretser i Kerr, 1994; Griswold, 1995). Els únics factors que s'ha demostrat que afecten la durada i les associacions de cèl·lules germinals del cicle són la temperatura i l'edat (van Haaster i de Rooij, 1993; Levy i col., 1999; Toyama i col., 1999; Pinart i col., 1999a, 2000). Estudis comparatius addicionals utilitzant mascles porcins en condicions normals i patològiques, proporcionaran més informació sobre els factors que afecten el cicle de l'epiteli seminífer en porcs.

A l'apartat de Material i Mètodes d'aquest treball es proposa un sistema d'equacions que permet calcular les àrees que ocupen el lumen i l'epiteli seminífer a partir de l'àrea tubular de qualsevol túbul seminífer tallat transversalment. Cal dir que, el model matemàtic només es pot aplicar a mascles reproductors porcins sans adults, ja que la relació de 5,04 entre l'epiteli seminífer i el lumen és característica dels mascles porcins adults. Amb aquest càlcul es poden detectar anomalies al parènquima seminífer induïdes per factors externs o



processos patològics. Per exemple, la detecció d'una variació de l'espai luminal podria indicar, d'acord amb la bibliografia, un dèficit en la formació i la integritat de les unions que s'estableixen entre les cèl·lules de Sertoli (Maddocks i col., 1992).

TAULA 4. Característiques morfològiques i morfomètriques del cicle de l'epiteli seminífer en mascles reproductors porcins sans de la raça Landrace\*

Estadi	Associació cel·lular	Alçada (µm)	Longitud (µm)	Freqüència (%)	Durada (dies)
Estadi I	Espermatogònies A i B Espermatòcits preleptotens, leptotens i paquitens Espermàtides arrodonides	73,8 ± 12,6 <sup>1</sup>	771,5 ± 468,3 <sup>1</sup>	13,7 ± 8,7	1,19
Estadi II	Espermatogònies A i B Espermatòcits leptotens, zigotens i paquitens Espermàtides en fase d'elongació	61,4 ± 8,8	525,8 ± 347,9	11,5 ± 6,1	1,00
Estadi III	Espermatogònies A i B Espermatòcits paquitens i diplotens Espermàtides en fase d'elongació	67,0 ± 10,9	491,5 ± 336,9	6,7 ± 5,1 <sup>2</sup>	0,59
Estadi IV	Espermatogònies A i In Espermatòcits primaris en telofase i anafase, i espermatòcits secundaris  Espermàtides en fase d'elongació	61,2 ± 6,8	248,9 ± 15,4 <sup>2</sup>	5,1 ± 2,4 <sup>2</sup>	0,44
Estadi V	Espermatogònies A i In Espermatòcits paquitens i espermatòcits secundaris Espermàtides en fase d'elongació	61,0 ± 13,5	538,2 ± 452,7	11,3 ± 4,4	0,97
Estadi VI	Espermatogònies A i In Espermatòcits zigotens Espermàtides arrodonides i en fase d'elongació	63,1 ± 6,2	373,3 ± 185,7	9,0 ± 1,9	0,77
Estadi VII	Espermatogònies A i B Espermatòcits zigotens i paquitens Espermàtides arrodonides i en fase d'elongació	71,2 ± 9,7 <sup>1</sup>	880,4 ± 458,2 <sup>1</sup>	28,7 ± 13,1 <sup>1</sup>	2,48
Estadi VIII	Espermatogònies A i B Espermatòcits paquitens Espermàtides arrodonides i espermatozoides	70,1 ± 8,9 <sup>1</sup>	843,1 ± 531,9 <sup>1</sup>	12,9 ± 5,4	1,12

\*Els resultats s'expressen com la mitjana ± SD.

Estadis premeiòtics: estadis I, II, i III. Estadis meiòtics: estadis IV i V. Estadis postmeiòtics: estadis VI, VII i VIII. Per cada paràmetre: el superíndex 1 agrupa els valors significativament més elevats, i el superíndex 2 agrupa els valors significativament més baixos

## *Capítol 2*

# *Ultraestructura testicular*

## RESULTATS

### 2.1. EL TEIXIT INTERSTICIAL

#### 2.1.1. Les cèl·lules de Leydig

Les cèl·lules de Leydig presenten un forma polièdrica irregular ( 15 x 12  $\mu\text{m}$ ) i un nucli rodó (de 5,5 a 6,5  $\mu\text{m}$  de diàmetre) o oval (d'uns 7 x 5  $\mu\text{m}$ ) en posició excèntrica (Làm. I – Fig. A; Là. II – Fig. A; Là. III – Fig. A). El nucli conté eucromatina i petites masses heterocromàtiques associades a l'embolcall nuclear i, un o dos nuclèols prominents (Làm. I – Fig. A; Là. II – Fig. A; Là. III – Fig. B). L'embolcall nuclear pot presentar un perfil irregular (Làm. III – Fig. B; Là. VI – Fig. A), amb una o diverses invaginacions profundes (Làm. VIII – Fig. A).

El citoplasma està ocupat per un aparell de Golgi i un reticle endoplasmàtic llis molt desenvolupats (Làm. I – Fig. A; Là. II – Figs. A-C; Là. VII – Fig. A). El reticle endoplasmàtic s'estén per tot el citoplasma formant un sistema ramificat complex (Làm. I – Fig. A; Là. II – Figs. A-C; Là. III – Figs. A i B). El reticle endoplasmàtic de les cèl·lules de Leydig pot adoptar una gran varietat de configuracions: túbuls orientats a l'atzar, cisternes, túbuls disposats en làmines, cisternes fenestrades, agregats i diferents combinacions d'aquestes configuracions (Làm. III – Figs. A i B; Là. X – Figs. A, C i D). Els túbuls disposats en làmines i les cisternes fenestrades estan molt relacionats estructuralment; els primers tenen una aparença anastomosada semiaplanada, mentre que en la segona configuració es poden reconèixer les cisternes fenestrades formant piles. Aquestes dues varietats de reticle endoplasmàtic sovint envolten gotes lipídiques o petites porcions de citoplasma (Làm. X – Figs. A, C i D). Els agregats sovint presenten al seu interior un grànul molt electrodens (Làm. XI – Figs. A i C). Les cisternes de reticle

endoplasmàtic llis que constitueixen els agregats poden fusionar-se, la qual cosa dóna un agregat de membranes amb aparença de cos multivesicular (Làm. XI – Figs. A, D i E).

Els mitocondris, esfèrics i de mida variable, són molt abundants i es troben dispersos per tot el citoplasma, excepte en la regió perinuclear (Làm. I – Fig. A; Là. II – Fig. A; Là. VII – Fig. B; Là. IX – Fig. A). Generalment, els mitocondris contenen grànuls electrodensos a la seva matriu (Làm. VII – Fig. B; Là. VIII – Fig. B; Là. IX – Fig. B). Les crestes mitocondrials són de tipus tubular, tot i que, de vegades, es poden observar crestes lamelars orientades longitudinalment o crestes tubulars agrupades i disposades en diverses direccions de la matriu mitocondrial (Làm. II – Figs. B i C; Là. IX – Fig. B). Existeix una associació espacial molt estreta entre els mitocondris i el reticle endoplasmàtic llis (Làm. XI – Fig. B); aquesta associació evidencia la relació funcional que existeix entre ambdós orgànuls, ja que el procés de síntesi de testosterona s’inicia als mitocondris i finalitza al reticle endoplasmàtic llis.

Les cèl·lules de Leydig presenten també al seu citoplasma: figures de mielina, gotes lipídiques, vesícules de mida i electrodensitat variable i, abundants lisosomes (Làm. I – Figs. A-C; Là. VII – Figs. A-C; Là. IX – Fig. B; Là. X – Figs. B i F; Là. XI – Fig. F). Els lisosomes tenen una mida molt gran i presenten inclusions al seu interior (Làm. V – Fig. B; Là. VI – Fig. B; Là. X – Fig. E).

En Microscòpia Electrònica de Transmissió, al igual que en Microscòpia Òptica, es distingeixen dos tipus de cèl·lules de Leydig: les clares i les fosques. El contingut d’orgànuls citoplasmàtics en ambdós tipus cel·lulars és similar, però difereixen en el seu contingut en ribosomes i grànuls de glicogen (Làm. III – Figs. A i B; Là. V – Fig. A; Là. VI – Fig. B; Là. VII – Fig. A; Là. VIII – Fig. A).

La membrana plasmàtica de les cèl·lules de Leydig pot presentar microvilli (Làm. IV – Figs. A i C; Là. VI – Fig. A). En les cèl·lules que exhibeixen una superfície llisa s’hi observa clarament la làmina basal (Làm. IV – Fig. B). A prop de la superfície cel·lular també es poden veure algunes vesícules de pinocitosi (Làm. V – Figs. A i C).

### 2.1.2. Els fibroblasts

Els fibroblasts són molt abundants al teixit intersticial i es disposen entre les cèl·lules de Leydig (Làm. XIII – Fig. B). Són cèl·lules fusiformes amb un citoplasma poc desenvolupat (Làm. XII – Fig. A; Là. XIII – Fig. A). El nucli presenta una forma afusada (7,5 x 1,5 µm) amb un gran nombre d'invaginacions, algunes de les quals poden ser força profundes (Làm. XII – Fig. A; Là. XIII – Fig. A; Là. XIV – Figs. A i B).

L'eucromatina és granular amb petites masses heterocromàtiques disperses pel nucleoplasma i associades a l'embolcall nuclear. El nuclèol es disposa en un extrem del nucli, sovint unit a l'embolcall nuclear (Làm. XII – Fig. A). En algunes cèl·lules, els perfils cel·lular i nuclear són molt irregulars (Làm. XII – Fig. A; Là. XIII – Fig. C), però, en general, aquestes cèl·lules presenten fins i llargs perllongaments citoplasmàtics (Làm. XII - Figs. C1 i C2; Là. XIII – Fig. B).

El citoplasma dels fibroblasts està poc desenvolupat i el contingut en orgànuls citoplasmàtics és escàs (Làm. XII – Fig. B; Là. XIII – Fig. A; Là. XIV – Fig. B). L'aparell de Golgi es disposa a prop del nucli, els mitocondris són escassos i els poliribosomes abundants i, s'observen algunes vesícules de mida variable.

La matriu extracel·lular que envolta els fibroblasts és rica en fibres elàstiques però, sobretot, en fibres de col·lagen (Làm. XII – Fig. A; Là. XIV – Fig. A-F).

### 2.1.3. Els mastòcits

Els mastòcits són molt escassos al teixit intersticial (Làm. XV – Fig. A). Són cèl·lules de forma arrodonida, d'uns 7 x 4,5 µm, amb un nucli rodó d'uns 3 µm de diàmetre, constituït per eucromatina granular i grans masses heterocromàtiques associades a l'embolcall nuclear.

El citoplasma conté un aparell de Golgi i un reticle endoplasmàtic llis i rugós poc desenvolupats, escassos mitocondris dispersos i, abundants grànuls de mida variable envoltats de membrana que presenten dues regions concèntriques amb diferent electrodensitat (Làm. XV – Fig. B).

#### 2.1.4. Els vasos sanguinis

Els capil·lars sanguinis apareixen, generalment, associats a la làmina pròpia que envolta els túbuls seminífers (Làm. XVI - Fig. A; Là. XVII – Figs. A i B; Là. XVIII – Fig. A1).

Els vasos sanguinis de major calibratge, vènules i arterioles, se situen a prop dels septes fibrosos que tabiquen el testicle (Làm. XIX – Figs. A i B; Là. XX – Figs. A i B).

Les parets dels vasos sanguinis estan revestides per una capa de cèl·lules endotelials (Làm. XVII – Fig. A). Les cèl·lules endotelials, d'uns 9 x 4,5 µm, presenten un nucli molt voluminós (7 x 4 µm) de perfil irregular, que conté eucromatina granular i algunes masses heterocromàtiques disperses pel nucleoplasma i associades a l'embolcall nuclear; el nucli fa prominència vers la llum del vas sanguini (Làm. XVII – Fig. A; Là. XVIII – Fig. A1; Là. XIX – Fig. B; Là. XX – Fig. B). La regió que ocupa el citoplasma és extremadament fina i, sovint s'hi observen petites digitacions vers la llum tubular (Làm. XVII – Fig. B; Là. XIX – Fig. B; Là. XX – Fig. B). Les superfícies luminal i basal de les cèl·lules endotelials presenten nombroses vesícules de pinocitosi (Làm. XVII – Fig. A; Là. XIX – Fig. B; Là. XX – Fig. B).

El citoplasma de les cèl·lules endotelials conté un aparell de Golgi poc desenvolupat, alguns mitocondris disposats normalment a prop del nucli, petites cisternes de reticle endoplasmàtic, algunes vesícules disperses i abundants ribosomes (Làm. XVII – Fig. B; Là. XIX – Fig. A; Là. XX – Fig. B).

A prop dels vasos sanguinis s'observen fibres nervioses (Làm. XVIII – Figs. A1 i A2). Els capil·lars sanguinis, normalment, apareixen associats a pericits; aquestes cèl·lules emeten uns llargs perllongaments citoplasmàtics que es disposen envoltant el capil·lar (Làm. XVI – Figs. A-C; Là. XVIII – Figs. A1 i B).

## 2.2. ELS TÚBULS SEMINÍFERS

### 2.2.1. La làmina pròpia

La làmina pròpia que envolta els túbuls seminífers té un gruix de 4-4,5  $\mu\text{m}$  i està constituïda per la làmina basal i les cèl·lules peritubulars (Làm. XXI – Figs. A i B; Làm. XXII – Figs. A i B).

La làmina basal és una capa fibrosa d'uns 0,7-0,9  $\mu\text{m}$  de gruix i de trajectòria sinuosa, que es troba separada de la membrana basal de les cèl·lules de Sertoli i de les espermatogònies per una àrea de baixa electrodensitat d'uns 12 nm de gruix; les fibres s'organitzen a l'atzar (Làm. XXI – Fig. A).

Les cèl·lules peritubulars s'organitzen en dues capes concèntriques separades entre si per una capa fibrosa. Aquesta capa fibrosa té un gruix d'entre 1 i 3  $\mu\text{m}$  i, està constituïda, fonamentalment, per fibres de col·lagen orientades a l'atzar (Làm. XXI – Fig. A). Les cèl·lules peritubulars en contacte amb la làmina basal són de tipus mioide, mentre que, la capa més externa de cèl·lules peritubulars està constituïda per fibroblasts (Làm. XXII – Fig. A).

Les cèl·lules mioïdes són allargades (10  $\mu\text{m}$  de longitud) i primes, poc electrodenses i amb un perfil molt irregular. El citoplasma conté pocs orgànuls cel·lulars i abundants filaments d'actina (Làm. XXI – Figs. A i B). Les cèl·lules mioïdes s'uneixen amb les dues capes fibroses mitjançant hemidesmosomes (Làm. XXI – Fig. B).

Els fibroblasts tenen forma afusada (10  $\mu\text{m}$  de longitud) i un perfil irregular. El nucli també és afusat i presenta una eucromatina granular amb masses heterocromàtiques associades a l'embolcall i, un nuclèol unit també a l'embolcall nuclear (Làm. XXI – Figs. A i B). El citoplasma conté un aparell de Golgi molt desenvolupat situat a prop del nucli i abundants vesícules.



## 2.2.2. L'epiteli seminífer

### 2.2.2.1. Les cèl·lules de Sertoli

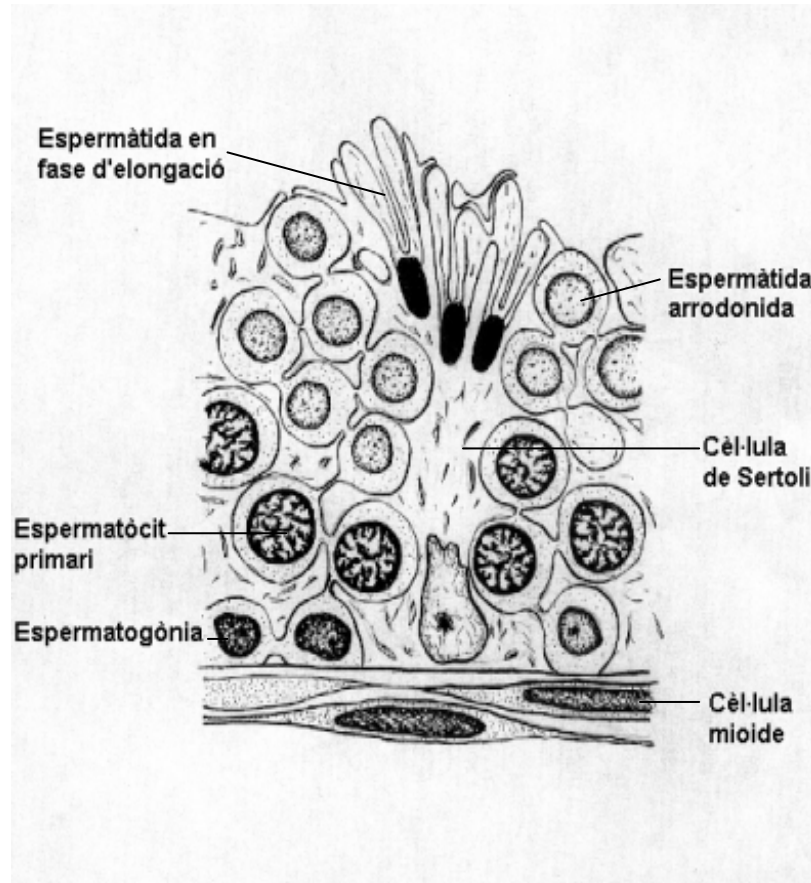
L'epiteli seminífer és un epiteli estratificat complex format per dos tipus cel·lulars: les cèl·lules de Sertoli i les cèl·lules germinals. El citoplasma de les cèl·lules de Sertoli s'estén per tota l'alçada de l'epiteli seminífer envoltant els diferents tipus de cèl·lules germinals (Fig. 1, vegeu pàg. 111). Les transformacions estructurals i la mobilització de les cèl·lules germinals del compartiment basal al compartiment adluminal fan que la forma de les cèl·lules de Sertoli canviï contínuament.

Al llarg del cicle espermatogènic, les cèl·lules de Sertoli experimenten alguns canvis en el contingut d'òrgànuls, però, les principals modificacions es produeixen, majoritàriament, en relació amb les espermàtides en desenvolupament (espermioènesi); per aquest motiu, la majoria de les transformacions estructurals seran descrites, més endavant, en l'apartat 2.2.2.3. (pàg. 118) titulat: "Les espermàtides i l'espermioènesi".

No s'han trobat diferències entre els tres mascles porcíns sans pel que fa a la ultraestructura de les cèl·lules de Sertoli.

Les cèl·lules de Sertoli són grans cèl·lules piramidals que s'estenen des de la membrana basal fins al lumen tubular. Aquestes cèl·lules presenten un gran nucli arrodonit o oval, d'uns 10 x 14 µm, que normalment es localitza al citoplasma basal al llarg de tot el cicle espermatogènic; tot i això, en els estadis postmeiòtics el nucli pot ocupar una posició medioapical (Làm. XXIII – Figs. A i B; Là. XXIV – Fig. A; Là. L – Fig. E). El nucli està constituït per eucromatina fina i distribuïda homogèniament; l'embolcall nuclear pot presentar una o diverses invaginacions profundes (Làm. XXIII – Figs. A i B). El nucli conté un nuclèol molt prominent amb petites masses heterocromàtiques associades (Làm. XXIII – Figs. A i B; Là. XXIV – Fig. B).

La membrana basal de les cèl·lules de Sertoli es troba en contacte amb la làmina basal, a la qual s'hi uneix mitjançant hemidesmosomes (Làm. XXIII – Fig. B).



**Figura 1.** Disposició de la cèl·lula de Sertoli dins l'epiteli seminífer. Les espermatogònies, els espermatòcits i les espermatòides estan en contacte amb les superfícies laterals de les cèl·lules de Sertoli. Les espermatòides en fase d'elongació es troben dins les criptes de la superfície apical de les cèl·lules de Sertoli.

Les superfícies laterals emeten un complex sistema de perllongaments que permeten el contacte amb les cèl·lules de Sertoli adjacents i, amb les diverses generacions de cèl·lules germinals que es diferencien en direcció basoapical. Les unions entre les cèl·lules de Sertoli es localitzen, bàsicament, al compartiment basal i, estan constituïdes per unions ocludens i desmosomes que configuren la barrera hematotesticular (Làm. XXIII – Fig. A; Là. XXIV – Fig. B; Là. XXV – Figs. A i B); en direcció apical desapareixen les unions ocludens i els desmosomes són cada vegada més espaiats. El contacte entre les cèl·lules de Sertoli i les cèl·lules germinals es manté mitjançant unions intercel·lulars especialitzades; el tipus i la freqüència d'aquestes unions varien en direcció basoapical. Les espermatogònies A i les espermatogònies intermèdies s'uneixen a les cèl·lules de Sertoli mitjançant desmosomes (Làm. XXIII – Fig. B; Là. XXVIII – Fig. B; Là. XXIX – Figs. A i B). El nombre de desmosomes disminueix progressivament quan les cèl·lules inicien el

pas del compartiment basal a l'adluminal, així doncs, les espermatogònies B i els espermatòcits preleptotens i leptotens presenten poques unions cel·lulars, normalment de tipus desmosomes (Làm. XXX – Figs. A i B; Là. XXXI – Fig. B; Là. XXXII – Figs. A i B; Là. XXXIII – Figs. A i B1). Quan les cèl·lules es troben al compartiment adluminal, el nombre i el tipus d'unions cel·lulars augmenten, de manera que, els espermatòcits zigotens, paquitens i secundaris i, les espermàtides arrodonides s'uneixen a les cèl·lules de Sertoli mitjançant desmosomes, unions adherents i unions estretes (Làm. XXXIII – Fig. B1; Là. XXXV – Figs. A i B).

El citoplasma de les cèl·lules de Sertoli, sobretot en la seva regió basal, és ric en orgànuls, essent molt desenvolupat el reticle endoplasmàtic llis, el qual tendeix a disposar-se en forma d'espiral englobant, sovint, petites porcions del citoplasma (Làm. XXV – Fig. E). El citoplasma també conté: un gran nombre de vesícules de mida variable, mitocondris, lisosomes primaris i secundaris, fagolisosomes, escasses gotes lipídiques i, aparell de Golgi (Làm. XXV – Fig. F; Là. XXVI – Figs. A-E). A l'estadi I i VIII, els lisosomes es fusionen amb el citoplasma residual que es desprèn de les espermàtides madures, amb la qual cosa apareixen nombrosos fagolisosomes que migren cap al citoplasma basal de les cèl·lules de Sertoli. Els mitocondris de les cèl·lules de Sertoli presenten, majoritàriament, forma de copa, tot i que també es poden observar formes lleugerament allargades i arrodonides (Làm. XXV – Figs. C i D). Les crestes mitocondrials són de tipus lamelar orientades transversalment, o bé, de tipus tubular; aquestes últimes s'observen, de manera particular, en els mitocondris arrodonits (Làm. XXV – Figs. C i D). El citoplasma conté nombrosos filaments intermediaris concentrats a la regió basal de la cèl·lula, al voltant del nucli, o bé, associats a les espermàtides en desenvolupament (Làm. XLIV – Fig. B).

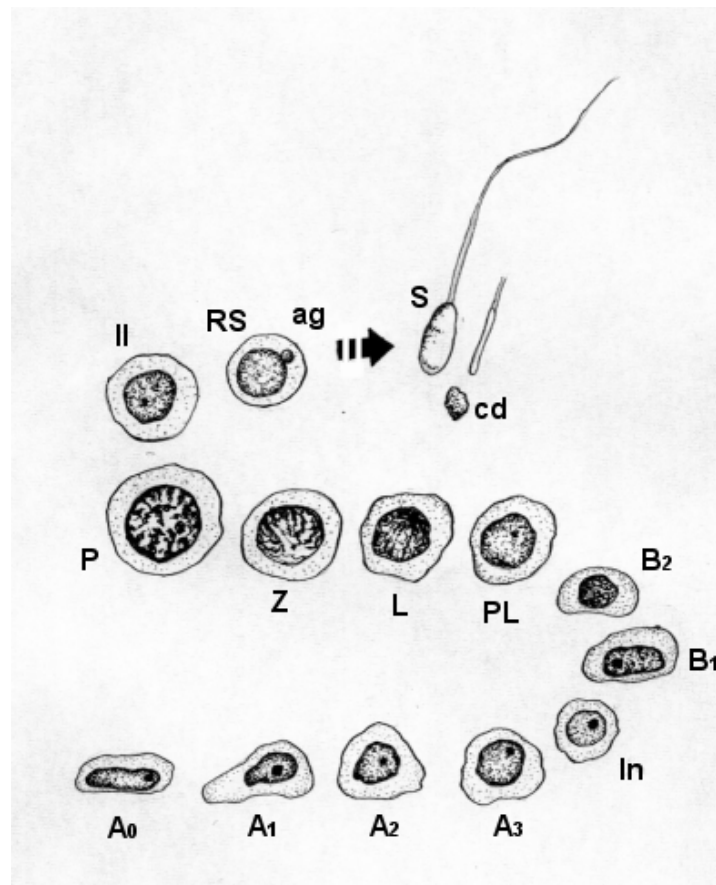
Als estadis VII i VIII s'observen algunes cèl·lules de Sertoli més fosques que presenten un contingut d'orgànuls molt similar al de les cèl·lules de Sertoli clares; el reticle endoplasmàtic d'aquestes cèl·lules més fosques, però, mostra unes cisternes molt dilatades i els mitocondris són lleugerament allargats o esfèrics (Làm. XXIV – Figs. A i B). La diferent electrodensitat entre ambdós tipus cel·lulars és conseqüència del contingut en ribosomes.

La presència de cèl·lules germinals, sobretot espermàtides madures, a l'interior del citoplasma de les cèl·lules de Sertoli revela la seva participació en l'eliminació de les cèl·lules germinals degeneratives (Làm. XXVI – Fig. F).

### 2.2.2.2. Les cèl·lules germinals

No es van trobar diferències entre els tres mascles porcins pel que fa a la ultraestructura dels diferents tipus de cèl·lules germinals al llarg dels diferents estadis del cicle espermatogènic.

Les cèl·lules germinals són bàsicament de tres tipus: les espermatogònies, els espermatòcits i les espermatides (Fig. 2, vegeu pàg. 113). A mesura que les cèl·lules germinals es divideixen i esdevenen diferents tipus cel·lulars, es desplacen des de la regió basal fins a la regió apical de l'epiteli seminífer.



**Figura 2.** Seqüència de diferenciació que té lloc durant l'espermatogènesi en porcí. No totes les etapes de l'espermiogènesi estan representades, sinó que queden resumides amb una fletxa discontinua. A<sub>0</sub>, espermatogònia A<sub>0</sub>; A<sub>1</sub>, espermatogònia A<sub>1</sub>; A<sub>2</sub>, espermatogònia A<sub>2</sub>; A<sub>3</sub>, espermatogònia A<sub>3</sub>; In, espermatogònia intermèdia; B<sub>1</sub>, espermatogònia B<sub>1</sub>; B<sub>2</sub>, espermatogònia B<sub>2</sub>; PL, espermatòcit preleptotè; L, espermatòcit leptotè; Z, espermatòcit zigotè; P, espermatòcit paquitè; II, espermatòcit secundari; RS, espermatida arrodonida; ag, grànul acrosòmic; S, espermatozoide; cd, gota citoplasmàtica.

Les diferents generacions de cèl·lules germinals es mantenen unides mitjançant ponts citoplasmàtics (Làm. XXXIII – Fig. B2; Làm. XXXIV – Fig. A; Làm. XXXVIII – Figs. A1-A3), el que fa que les cèl·lules germinals en el mateix grau de desenvolupament apareguin agrupades. Les cèl·lules germinals presenten nombrosos porus nuclears en la regió de l'embolcall nuclear propera al pont citoplasmàtic (Làm. XXXIII – Fig. B2). La membrana plasmàtica de la regió del pont citoplasmàtic presenta un engruiximent notable (Làm. XXXIII – Fig. B2).

### • **Les espermatogònies**

Les espermatogònies són cèl·lules immadures que es localitzen al compartiment basal de l'epiteli seminífer, unides a la làmina basal mitjançant hemidesmosomes. Les espermatogònies han estat classificades en quatre modalitats en funció de les característiques nuclears i citoplasmàtiques i, de la relació que mantenen amb la làmina basal: les espermatogònies de reserva, les espermatogònies A, les espermatogònies intermèdies i les espermatogònies B (Fig. 2, vegeu pàg. 113).

Les espermatogònies de reserva o A<sub>0</sub> són cèl·lules allargades, d'uns 17 x 5 µm, amb l'eix major orientat paral·lel a la làmina basal (Làm. XXVII – Fig. A). En aquestes cèl·lules, la superfície de contacte amb la làmina basal és molt gran. El nucli allargat (d'uns 15 x 4 µm) mostra un perímetre irregular. L'eucromatina és finament granular i distribuïda homogèniament, amb petites masses heterocromàtiques associades a l'embolcall nuclear. El nuclèol és poc visible i se situa a prop de l'embolcall nuclear. El citoplasma d'aquestes cèl·lules està poc desenvolupat i conté: mitocondris, generalment formant agregats juxtannuclears, abundants poliribosomes i algunes vesícules disperses de poca electrodensitat.

Les espermatogònies A es subdivideixen en tres tipus: les espermatogònies A<sub>1</sub>, les espermatogònies A<sub>2</sub> i les espermatogònies A<sub>3</sub> (Fig. 2, vegeu pàg. 113).

Les espermatogònies A<sub>1</sub> són cèl·lules molt electrodenses de forma allargada (d'uns 17 x 7 µm) i, amb l'eix major orientat paral·lel a la làmina basal, de manera que, la superfície de contacte amb la làmina basal és molt gran (Làm. XXVII – Fig. B). El nucli, d'uns 12 x 5 µm, també té forma allargada i un nuclèol prominent situat a prop del seu centre. L'eucromatina és granular amb petites masses heterocromàtiques disperses pel

nucleoplasma. El citoplasma d'aquestes cèl·lules està més desenvolupat que el de les espermatogònies  $A_0$  i, conté nombroses cisternes de reticle endoplasmàtic i abundants lisosomes, mitocondris disposats al citoplasma perinuclear formant petits agregats i, abundants ribosomes que confereixen al citoplasma una elevada electrodensitat.

Les espermatogònies  $A_2$  també es disposen sobre la làmina basal amb l'eix major orientat paral·lel respecte d'aquesta (Làm. XXVIII – Figs. A i B). Malgrat que la superfície de contacte amb la làmina basal és molt àmplia, s'observen diversos punts de separació (Làm. XXVIII – Fig. A). Aquestes cèl·lules presenten en les seves fases inicials forma allargada (d'uns  $17 \times 10 \mu\text{m}$ ), però, a mesura que es van diferenciant van prenent una forma més isodiamètrica (d'uns  $13 \times 12 \mu\text{m}$ ). El nucli, menys allargat que el de les espermatogònies  $A_1$  (d'uns  $12 \times 6,5 \mu\text{m}$ ) presenta escasses però profundes invaginacions que, fins i tot, poden donar lloc a petits lòbuls nuclears (Làm. XXVIII – Fig. B). L'eucromatina és finament granular, amb petites masses heterocromàtiques disperses pel nucleoplasma i, associades a l'embolcall nuclear. Aquestes cèl·lules presenten un nuclèol molt prominent. El citoplasma conté: mitocondris, generalment formant agregats, cisternes de reticle endoplasmàtic, algunes vesícules de poca electrodensitat i abundants poliribosomes.

Les espermatogònies  $A_3$  presenten forma d'oval a cònica, d'uns  $14 \times 7 \mu\text{m}$  i d'uns  $17 \times 8 \mu\text{m}$ , respectivament (Làm. XXIX – Figs. A i B). Aquestes cèl·lules encara mantenen el contacte amb la làmina basal. El nucli arrodonit, amb un diàmetre d'entre 6 i  $7 \mu\text{m}$ , presenta un nuclèol poc desenvolupat disposat a prop del perímetre nuclear. L'eucromatina és granular amb petites masses heterocromàtiques associades a l'embolcall nuclear i disperses pel nucleoplasma. El citoplasma conté: mitocondris dispersos o que formen petits agregats, cisternes de reticle endoplasmàtic, petites vesícules i abundants poliribosomes.

Les espermatogònies intermèdies o espermatogònies  $I_n$  són cèl·lules arrodonides, d'uns  $7,5 \mu\text{m}$  de diàmetre, unides a la làmina basal (Làm. XXX – Fig. A). El nucli rodó, amb un diàmetre d'uns  $5 \mu\text{m}$ , presenta eucromatina granular distribuïda homogèniament i, un nuclèol prominent situat a prop de l'embolcall nuclear. El citoplasma conté: mitocondris, algunes cisternes de reticle endoplasmàtic i ribosomes.

Les espermatogònies B han estat subdividides en dues tipologies: les espermatogònies  $B_1$  i les espermatogònies  $B_2$  (Fig. 2, vegeu pàg. 113).

Les espermatogònies  $B_1$  són cèl·lules petites i allargades (d'uns  $10 \times 7 \mu\text{m}$ ) unides a la làmina basal (Làm. XXX – Fig. B). El nucli allargat, d'uns  $7 \times 4 \mu\text{m}$ , és electrodens i conté

nombroses masses heterocromàtiques associades a l'embolcall i, també, disperses pel nucleoplasma i, un o dos nuclèols molt prominents. El citoplasma d'aquestes cèl·lules presenta: un reticle endoplasmàtic molt desenvolupat constituït per cisternes lleugerament dilatades, mitocondris dispersos, vesícules de mida variable i abundants poliribosomes que li confereixen una elevada electrodensitat.

Les espermatogònies B<sub>2</sub> (Làm. XXXI – Figs. A i B) són ultraestructuralment molt similars a les espermatogònies B<sub>1</sub>. Les dimensions cel·lulars també són semblants a les de les espermatogònies B<sub>1</sub> (d'uns 10 x 7 µm) però, el nucli adopta una forma esfèrica amb un diàmetre d'uns 6 x 5 µm i el nuclèol és molt poc visible. Aquestes cèl·lules perden progressivament el contacte amb la làmina basal (Làm. XXXI – Fig. B); en el moment en què la separació és total les espermatogònies B<sub>2</sub> entren en mitosi.

### • Els espermatòcits

Els espermatòcits són cèl·lules que intervenen en el procés de meiosi, en el qual s'hi distingeixen dues divisions anomenades meiosi I i meiosi II. En la meiosi I hi estan implicats els espermatòcits primaris, mentre que en la meiosi II hi intervenen els espermatòcits secundaris. De les dues divisions que experimenta un espermatòcit en resulten quatre cèl·lules haploides, les espermàtides.

*Meiosi I:* espermatòcit primari preleptotè → leptotè → zigotè → paquitè → diplotè → diacinesi (final de l'etapa profase I) → 1a metafase → 1a anafase → 1a telofase → 2 espermatòcits secundaris.

*Meiosi II:* 2 espermatòcits secundaris → 2a metafase → 2a anafase → 2a telofase → 4 espermàtides.

Abans que els espermatòcits primaris entrin en la profase reben el nom de preleptotens. Els espermatòcits preleptotens han perdut completament el contacte amb la làmina basal (Làm. XXXII – Figs. A i B) i es localitzen en el compartiment basal de l'epiteli seminífer o en trànsit cap al compartiment adluminal. Aquestes cèl·lules presenten una forma oval (d'uns 12 x 7 µm) amb un nucli arrodonit o oval (d'uns 7 x 5 µm) constituït per eucromatina granular. El citoplasma conté: un aparell de Golgi perinuclear, un reticle endoplasmàtic

molt desenvolupat, alguns mitocondris dispersos, vesícules de mida i electrodensitat variable i abundants poliribosomes. A mesura que els espermatòcits preleptotens es van diferenciant, incrementa l'electrodensitat del nucli i la del citoplasma (Làm. XXXII – Figs. A i B). El nucli, més gran i arrodonit (d'uns 7-8  $\mu\text{m}$  de diàmetre) o oval (d'uns 9 x 5  $\mu\text{m}$ ), presenta petites masses heterocromàtiques associades a l'embolcall nuclear i un nuclèol. El citoplasma conté: un aparell de Golgi molt desenvolupat que es disposa a prop del nucli, cisternes de reticle endoplasmàtic, vesícules de mida variable i baixa electrodensitat, alguns mitocondris dispersos i poliribosomes.

La profase I es divideix en 4 fases successives, anomenades: leptotè, zigotè, paquitè i diplotè (Fig. 2, vegeu pàg. 113).

Els espermatòcits leptotens són cèl·lules en trànsit cap al compartiment adluminal de l'epiteli seminífer (Làm. XXXIII – Fig. B1). En un estadi inicial, aquestes cèl·lules presenten un nucli molt electrodens, constituït per una eucromatina granular i algunes masses heterocromàtiques associades a l'embolcall i un nuclèol prominent unit al perímetre nuclear (Làm. XXXIII – Fig. A). En un estat més avançat, augmenta el volum cel·lular (d'uns 15 x 9  $\mu\text{m}$ ) i nuclear (d'uns 8 x 7  $\mu\text{m}$ ) i, els cromosomes apareixen com a fibres unides a l'embolcall nuclear mitjançant plaques (Làm. XXXIII – Fig. B1; Là. XXXIV – Fig. A). El citoplasma conté: un reticle endoplasmàtic rugós molt desenvolupat format per cisternes primes disposades a prop del nucli, algunes cisternes de reticle endoplasmàtic llis, vesícules de poca electrodensitat, poliribosomes i mitocondris formant grans agregats.

Els espermatòcits zigotens són cèl·lules rodones, d'uns 16  $\mu\text{m}$  de diàmetre, situades al compartiment adluminal de l'epiteli seminífer (Làm. XXXIV – Fig. B; Là. XXXV – Fig. A). El nucli rodó, d'uns 10-11  $\mu\text{m}$  de diàmetre, està constituït per fibres cromosòmiques unides a l'embolcall nuclear i un nuclèol disposat a la perifèria. El citoplasma és poc electrodens i presenta un reticle endoplasmàtic molt desenvolupat constituït per cisternes molt primes, petits mitocondris i algunes vesícules disperses.

Els espermatòcits paquitens són les cèl·lules més grans de la línia germinal (20 x 13  $\mu\text{m}$ ) (Làm. XXXV – Fig. B; Là. XXXVI – Fig. A). El nucli rodó (d'uns 8,5  $\mu\text{m}$  de diàmetre) es caracteritza per la presència dels complexos sinapteinemals (Làm. XXXVI – Fig. B1), el nuclèol és petit i es disposa al centre nuclear. El citoplasma conté: petits mitocondris i algunes vesícules, cisternes de reticle endoplasmàtic menys desenvolupades que en els



espermatòcits zigotens i homogèniament disperses pel citoplasma; sovint, les cisternes de reticle endoplasmàtic s'organitzen formant capes concèntriques (Làm. XXXVI – Fig. B2).

Els espermatòcits secundaris (Fig. 2, vegeu pàg. 113) són cèl·lules arrodonides molt més petites que els espermatòcits paquitens (Làm. XXXVII – Fig. A). Presenten un diàmetre cel·lular d'aproximadament 15 µm i un nucli rodó d'uns 10 µm de diàmetre, que conté una eucromatina finament granular amb petites masses heterocromàtiques associades a l'embolcall nuclear i també disperses pel nucleoplasma. El citoplasma presenta: un aparell de Golgi molt desenvolupat que es disposa a prop del nucli, cisternes de reticle endoplasmàtic rugós i llis, alguns mitocondris i un gran nombre de vesícules de mida i electrodensitat variable. Aquestes cèl·lules entren a la segona divisió meiótica sense duplicar el seu contingut genètic.

Entre les diverses generacions d'espermatòcits s'estableixen unions de tipus desmosomes i unions estretes (Làm. XXXII – Fig. B).

### **2.2.2.3. Les espermatides i l'espermioogènesi**

Les espermatides joves tenen una morfologia arrodonida amb un diàmetre d'entre 10 i 12 µm. El seu nucli esfèric, d'uns 5 µm de diàmetre, presenta una posició central (Làm. XXXVII – Fig. B). El contingut d'òrgans d'aquestes cèl·lules és molt similar al dels espermatòcits secundaris. Les espermatides experimenten una sèrie de transformacions complexes que donen com a resultat la formació dels espermatozoides.

En el Capítol 1 d'aquest treball s'ha dividit l'espermioogènesi de porcí en 8 estadis d'acord amb el mètode de la morfologia tubular, el qual es basa en els següents paràmetres: (1) la composició de cèl·lules germinals de l'epiteli seminífer, (2) la fase meiótica dels espermatòcits i, (3) els canvis nuclears i acrosòmics que experimenten les espermatides. La reorganització i modificació del nucli i de l'acrosoma de les espermatides no van poder ser estudiats al microscopi òptic, el que va fer que les espermatides fossin designades, en un principi, com a espermatides en fase d'elongació. L'estudi dels 8 estadis de l'epiteli seminífer al microscopi electrònic de transmissió ha permès analitzar i descriure amb detall els canvis morfològics que experimenten les espermatides al llarg del procés d'espermioogènesi.

Encara que, durant l'espermioquèsi tingui lloc una transformació morfològica gradual de les espermatides, és necessari establir una sèrie de distincions per tal de dividir en passos l'espermioquèsi. En porcí, l'espermioquèsi s'ha dividit en 9 passos que vénen determinats per 9 tipus diferents d'espermatides. Les característiques que defineixen aquests 9 tipus d'espermatides es descriuen a continuació.

*Espermatides en el pas 1* (Làm. XXXIX – Figs. A-F). Aquestes espermatides presenten un nucli esfèric i un sistema acrosòmic (grànul acrosòmic més vesícula acrosòmica) força visible.

*Espermatides en el pas 2* (Làm. XL – Figs. A-F; Là. XLI – Fig. A). Aquestes espermatides presenten un nucli esfèric, com en el pas 1, i un grànul acrosòmic clarament visible dins la vesícula acrosòmica en contacte amb el nucli.

*Espermatides en el pas 3* (Làm. XLI – Figs. B i E; Là. XLIII – Figs. A i F). Aquestes espermatides tenen un nucli esfèric, com en els passos 1 i 2, però, presenten un acrosoma en forma de caputxó que cobreix la meitat del nucli. En aquest pas de l'espermioquèsi les espermatides s'orienten a l'atzar.

*Espermatides en el pas 4* (Làm. XLI – Figs. C, D i F; Là. XLII – Figs. A-D; Là. XLIII – Figs. B-E; Là. XLIV – Fig. A). En aquest pas, les espermatides s'incorporen dins dels elements citoplasmàtics o criptes de les cèl·lules de Sertoli amb els acrosomes orientats cap a la làmina basal. Les espermatides es polaritzen i la major part del citoplasma es disposa al pol distal de les cèl·lules. Els nuclis presenten una forma oval i contenen una eucromatina granular distribuïda irregularment.

*Espermatides en el pas 5* (Làm. XLIV – Fig. B). Aquestes espermatides tenen un nucli cilíndric que presenta una cromatina amb un grau de condensació superior respecte del pas anterior. Els acrosomes, a més, presenten una projecció apical molt prominent.

*Espermatides en el pas 6* (Làm. XLIV – Figs. C-F; Là. XLV – Figs. A-C). Aquestes espermatides presenten un nucli cilíndric o en forma d'espàtula i pla i, una cromatina en un estat més avançat de condensació. Els acrosomes mostren una projecció apical molt prominent, com en el pas 5.

*Espermatides en el pas 7* (Làm. XLV – Figs. D-F; Là. XLVI – Figs. A i D). Aquestes espermatides presenten un nucli en forma d'espàtula i un acrosoma amb una projecció apical en forma de ganxo.

*Espermàtides en el pas 8* (Làm. XLVI – Figs. B, C, E i F; Làm. XLVII – Figs. A-C, E i F; Làm. XLVIII – Figs. A-F; Làm. XLIX - Figs. A, B i E). Aquestes espermàtides presenten un nucli i un acrosoma plenament diferenciats. La beina mitocondrial de la peça intermèdia es comença a acoblar en aquest pas.

*Espermàtides en el pas 9* (Làm. XLVII – Fig. D; Làm. XLIX – Figs. C, D, F i G). Aquestes espermàtides presenten un nucli i un acrosoma com en el pas 8. La beina mitocondrial de la peça intermèdia s’acaba d’acoblar en aquest pas i, les cues queden lliures al lumen dels túbuls seminífers.

La Taula 1 mostra la composició cel·lular, descrita en el Capítol 1 del present treball i, els diferents tipus d’espermàtides presents en cada un dels estadis del cicle de l’epiteli seminífer.

**TAULA 1.** Composició cel·lular dels diferents estadis del cicle espermatogènic en mascles porcins sans de la raça Landrace\*

Estadis							
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
A	A	A	A	A	A	A	A
			In	In	In	B	B
B	B	B					
PL							
L	L						
P	Z	Z	Z	Z	Z	Z	P
	P	P				P	
		D	Telofase I				
			Anafase I				
			II	II	II		
					Telofase II		
					Anafase II		
					RS		
					ES 1	ES 2	ES 3
ES 4	ES 5	ES 6	ES 6/7	ES 6/7	ES 7/8	ES 8	ES 9
							S

\*Les cèl·lules adjacents a la làmina basal se situen a la part superior de la Taula, mentre que, les cèl·lules més properes al lumen tubular se situen a la part inferior de la Taula. A, espermatogònies A; In, espermatogònies intermèdies; B, espermatogònies B; PL, espermatòcits preleptotens; L, espermatòcits leptotens; Z, espermatòcits zigotens; P, espermatòcits paquitens; D, espermatòcits diplotens; II, espermatòcits secundaris; RS, espermàtides arrodonides; ES, espermàtides en fase d’elongació; S, espermatozoides.

Al Capítol 1 d'aquest treball s'ha estimat la durada de cada un dels estadis del cicle espermatogènic, d'acord amb aquestes dades l'espermioogènesi dels mascles porcíns Landrace té una durada total d'uns 14 dies.

L'espermioogènesi comença a l'estadi VI, immediatament després que es formin les espermatides arrodonides. Aquestes cèl·lules presenten una forma esfèrica i un nucli també esfèric localitzat al centre de la cèl·lula. Les espermatides mantenen aquesta forma durant la fase Golgi (passos 1 i 2) i la fase caputxó (passos 3 i 4) (Làm. XXXIX – Figs. A, C, E i F; Là. XL – Figs B, C i E; Là. XLI – Fig. A). Durant aquestes dues fases, el centríol distal inicia el creixement de l'axonema. La migració del parell de centríols des de la perifèria cel·lular cap al nucli té lloc en aquestes fases (Làm. XXXIX – Fig. F), alhora que, també es produeix una invaginació de la membrana plasmàtica al llarg de l'axonema, amb la qual cosa es forma un estret compartiment citoplasmàtic al voltant d'aquest i l'anomenada fossa caudal (Làm. XLIV – Fig. A). Aquest compartiment citoplasmàtic es pot subdividir en dues regions: el compartiment periaxonemàtic proximal i el compartiment periaxonemàtic distal. El compartiment periaxonemàtic proximal és la porció envoltada pel lòbul citoplasmàtic, això fa que l'axonema estigui limitat per una doble membrana, la membrana pròpia del compartiment i la del lòbul citoplasmàtic (Làm. XLIV – Fig. A; Là. XLV – Fig. D; Là. XLVI – Figs. A, B i E). El compartiment periaxonemàtic distal és la porció de citoplasma periaxonemàtic lliure de lòbul citoplasmàtic i, per tant, està limitat simplement per una única membrana que correspon a la membrana del compartiment (Làm. XLVI – Fig. D; Là. XLVII – Fig. A).

A la fase acrosòmica (passos 5-7) el nucli s'allarga, es condensa i perd la seva posició central. Aquest canvi en la posició nuclear provoca que la major part del citoplasma flueixi cap al pol de la cèl·lula oposat al nucli, on adopta una forma de lòbul allargat que s'estén i envolta la cua en formació. Així, en les espermatides allargades, existeix únicament una petita porció de citoplasma al voltant del nucli, mentre que, la major part del citoplasma es troba dins el lòbul citoplasmàtic (Làm. XLIV – Fig. E; Là. XLV – Fig. A).

Al començament de la fase de maduració (passos 8 i 9), com a resultat de la migració de l'anell del flagel al llarg de l'axonema, el compartiment proximal periaxonemàtic perd la seva demarcació (Làm. XLVIII – Figs. C i D). En aquest moment, es produeix un ràpid augment del gruix de les fibres denses al llarg de l'axonema (Làm. XLVI – Fig. B; Là. XLVIII – Figs. C i D) i un contacte directe dels mitocondris amb les fibres denses al llarg

de l'esbós de la peça intermèdia de la cua, és a dir, entre la peça de connexió i l'anell del flagel (Làm. XLVIII – Figs. C i D; Là. XLIX – Figs. A i B). En el pas 9 de la fase de maduració, el lòbul citoplasmàtic migra cap a la regió del cap de l'espermàtida i, en una fase més tardana del pas 9 es desprèn, la qual cosa produeix el cos residual (Làm. XLVII – Fig. A; Là. L – Fig. F). Una petita porció romanent de citoplasma de l'espermàtida es queda unida a la regió de la peça de connexió, i constitueix la gota citoplasmàtica característica dels espermatozoides joves. Els ponts citoplasmàtics que connecten les espermàtides en desenvolupament es mantenen fins al pas 8 de l'espermioquèsi (Làm. XLVIII – Figs. A i C).

A continuació es descriu l'evolució dels diferents elements citoplasmàtics al llarg del procés espermioquèsi.

• **El nucli i l'embolcall nuclear**

El nucli de les espermàtides de nova formació presenta una eucromatina granular distribuïda homogèniament, amb escasses masses heterocromàtiques i un petit nuclèol situat a prop de l'embolcall nuclear (Làm. XXXVIII – Fig. A1). L'aparència de la cromatina no canvia gaire durant la fase Golgi i la fase caputxó (passos 1-4). Els primers signes de condensació de la cromatina es comencen a observar al final de la fase caputxó (pas 4), amb l'aparició d'escasses i petites masses heterocromàtiques disperses pel nucleoplasma (Làm. XLI – Figs. C i F; Là. XLII – Fig. A; Là. XLIII – Fig. D; Là. XLIV – Fig. A). En els passos successius (passos 5-7), l'eucromatina esdevé progressivament més granular amb abundants i petites masses heterocromàtiques disperses pel nucleoplasma (Làm. XLIV – Figs. B-F; Là. XLV – Fig. A). La condensació de la cromatina s'inicia a la part més apical del nucli, per sota de l'àrea ocupada pel sistema acrosòmic i, progressa en sentit distal i des de la perifèria cap al centre nuclear (Làm. XLV – Figs. A, C i E). La condensació de la cromatina fa que aquesta experimenti una reducció de volum i, com a conseqüència d'aquesta retracció nuclear, apareix en la regió postacrosòmica del nucli (passos 6 i 7) un espai entre la cromatina i l'embolcall nuclear (Làm. XLV – Figs. E i F; Là. XLVI – Figs. A i C). Les masses grolleres d'eucromatina granular es van condensant gradualment (Làm. XLVI – Figs. C i E) fins a constituir una massa densa amb petites cavitats o vacúols (Làm. XLVI – Fig. F; Là. XLVII – Fig. F). Aquests vacúols

desapareixen en el pas 9 de l'espermioquèsi i la cromatina esdevé una massa densa homogènia (Làm. XLVII – Fig. D). El nuclèol no desapareix fins al pas 3 de la fase caputxó (Làm. XLI – Fig. B).

Durant l'espermioquèsi, l'embolcall nuclear de les espermàtides experimenta una sèrie de modificacions en diferents regions, algunes d'aquestes modificacions són característiques estructurals permanents de l'espermatozoide.

Al domini subacrosòmic, al llarg dels passos 2-6, la membrana nuclear interna està associada a una fina línia de material dens (Làm. XL – Fig. F; Là. XLV – Fig. B; Là. XLVI – Fig. A). Al domini postacrosòmic, a la zona ocupada per la fossa d'implantació que envolta el *capitulum* en desenvolupament de la peça de connexió (pas 2), hi ha una línia de material dens adherida a la membrana externa de l'embolcall nuclear que rep el nom de placa basal (Làm. XLIII – Figs. D i F). La placa basal és l'estructura que uneix la peça de connexió amb el nucli.

Al llarg de les fases Golgi i caputxó, algunes zones de l'embolcall nuclear de la regió postacrosòmica exhibeixen un aspecte altament desorganitzat; aquestes zones corresponen a punts de dissolució i reabsorció de membranes (Làm. XXXVIII – Fig. A1; Là. XXXIX – Fig. F; Là. XL – Fig. A; Là. XLI – Fig. F; Là. XLIII – Fig. A).

El nucli de les espermàtides en fase acrosòmica i en fase de maduració presenta al seu extrem distal unes evaginacions molt pronunciades de l'embolcall nuclear que contenen un espai lliure de cromatina. Aquestes evaginacions reben el nom de cossos laminars i, presenten un gran nombre de porus nuclears que permeten l'intercanvi de substàncies entre el nucleoplasma i el citoplasma de l'espermàtida (Làm. XLV – Fig. F; Là. XLVI – Fig. C; Là. XLII – Fig. A). Els cossos laminars experimenten una forta regressió al final de l'espermioquèsi, tot i això, els espermatozoides madurs de porcí presenten petits excedents de membrana a la regió distal del nucli (Làm. XLIX – Fig. C).

#### • **L'aparell de Golgi i el sistema acrosòmic**

L'aparell de Golgi està altament relacionat amb el sistema acrosòmic en desenvolupament durant la fase Golgi (passos 1 i 2) i, en el primer pas de la fase caputxó (pas 3). A l'últim pas de la fase caputxó (pas 4) o al començament de la fase acrosòmica (pas 5), l'aparell de Golgi es dissocia del sistema acrosòmic i se situa al mig del lòbul citoplasmàtic (Làm. XLI – Figs. C i D).

L'aparell de Golgi mostra dues regions principals: el còrtex i la medul·la. El còrtex està constituït principalment per sàculs interconnectats i fortament empaquetats i, la medul·la està formada pel conjunt de vesícules recobertes i no recobertes presents a les proximitats del còrtex (Làm. XXXIX – Figs. B i D; Là. XL – Figs. B i F).

Els primers sàculs de la cara convexa (*cis*) de l'aparell de Golgi són més dilatats. Per sobre la cara *cis* s'observen diverses cisternes de reticle endoplasmàtic que es disposen envoltant l'aparell de Golgi (Làm. XXXIX – Figs. B i D; Là. XL – Fig. F).

Els últims sàculs de la cara còncava (*trans*) de l'aparell de Golgi mostren un lumen més dilatat, o bé, es troben més separats del còrtex (Làm. XXXIX – Figs. B i D; Là. XL – Fig. F). La cara *trans* de l'aparell de Golgi té una aparença més fragmentada que la cara *cis*, ja que, està formada per petits túbuls i vesícules.

A les regions entre els sàculs s'hi observen nombrosos túbuls de tipus anastomosats o ramificats que connecten els apilaments de sàculs entre si. En aquestes regions també es poden apreciar petites vesícules (Là. XL – Fig. B).

Durant l'espermioïgènesi, l'aparell de Golgi experimenta grans canvis. En el pas 1, els dictiosomes o sàculs són petits i les regions entre sàculs són predominants (Làm. XXXIX – Figs. A-D). Aquests sàculs apilats estan implicats en la formació de la vesícula proacrosòmica. En els passos 2 i 3, el còrtex de l'aparell de Golgi presenta uns sàculs més extensos i uns espais entre sàculs més reduïts (Là. XL – Fig. B). Durant tots aquests passos (passos 1-3), l'aparell de Golgi està activament involucrat en la formació del sistema acrosòmic. Al final de la fase caputxó o en les successives fases acrosòmica i de maduració, l'aparell de Golgi està format, gairebé exclusivament, per sàculs apilats i, la resta de vesícules i túbuls associats desapareixen o són molt poc prominents (Là. XLI – Figs. C i D).

A la fase Golgi i a l'inici de la fase caputxó és molt freqüent observar cossos multivesiculars (Là. XLI – Fig. F; Là. XLII – Figs. E i F). Aquestes estructures se situen sempre molt pròximes a l'aparell de Golgi (Làm. XXXIX – Fig. F; Là. XL – Fig. B). Al final de la fase caputxó, quan les espermàtides es polaritzen, els cossos multivesiculars se situen, com la resta d'òrgànuls, al pol distal de la cèl·lula (Là. XLI – Fig. F).

El sistema acrosòmic és un òrgànul limitat per membrana que es troba fortament adherit a la superfície del nucli de l'espermàtida i de l'espermatozoide. Des del punt de vista estructural, al sistema acrosòmic es poden diferenciar dues regions: el grànul acrosòmic i la vesícula acrosòmica (Là. XLI – Fig. A). Durant l'espermioïgènesi, es poden distingir tres

períodes de formació i evolució del sistema acrosòmic. A la fase Golgi hi ha la formació de nombroses vesícules proacrosòmiques en la cara *trans* de l'aparell de Golgi (Làm. XXXIX – Figs. E i F); aquestes vesícules presenten al seu interior un nucli de material dens que formarà el grànul acrosòmic. Les petites vesícules proacrosòmiques es van fusionant les unes amb les altres fins a formar una gran vesícula que estableix contacte amb l'embolcall nuclear (Làm. XXXIX – Figs. E i F; Là. XL – Figs. B-F). La vesícula acrosòmica s'engrandeix fins assolir el seu volum màxim al final de la fase caputxó; aquest fet és conseqüència de la fusió de vesícules addicionals procedents de la cara *trans* de l'aparell de Golgi amb la membrana acrosòmica externa (Làm. XL – Figs. C i F). Alhora que la vesícula acrosòmica creix, va adoptant una forma aplanada sobre la superfície del nucli. El grànul acrosòmic en la fase caputxó esdevé més dens i passa a tenir una forma hemisfèrica ja que s'adhereix fortament a la membrana acrosòmica interna, aquesta adhesió provoca, a més, una profunda depressió en l'embolcall nuclear (Làm. XLI – Figs. B, C i F). El grànul acrosòmic es manté al llarg de l'espermioïgenesis i constitueix l'acrosoma pròpiament dit; la resta del sistema acrosòmic conté un material de baixa densitat que constitueix el caputxó (Làm. XLI – Figs. A, B i E; Là. XLIV – Figs. B i C). El caputxó també es manté al llarg de l'espermioïgenesis i a l'espermatozoide. Durant la fase de maduració, el grànul acrosòmic i el caputxó experimenten una elevada condensació (Làm. XLVI – Fig. C; Là. XLVII – Figs. B i D).

L'aportació de material al sistema acrosòmic s'atura al final de la fase caputxó, quan l'aparell de Golgi se separa de l'acrosoma en desenvolupament (Làm. XLI – Figs. C i D).

### • El reticle endoplasmàtic

El reticle endoplasmàtic experimenta grans modificacions estructurals durant l'espermioïgenesis. A la fase Golgi (passos 1 i 2) i en el primer pas de la fase caputxó (pas 3), el reticle endoplasmàtic està format per petites cisternes que es distribueixen homogèniament per tot el citoplasma (Làm. XXXIX – Figs. A-F; Là. XLI – Figs. A i E). En algunes ocasions aquestes cisternes s'apilen intensament (Làm. XLII – Figs. C i D). La xarxa de cisternes de reticle endoplasmàtic s'estén a través dels ponts que uneixen les espermàtides de la mateixa generació (Làm. XXXVIII – Fig. A1). En aquests punts de connexió intercel·lular és freqüent observar cisternes de reticle endoplasmàtic o lamel·les anellades disposades transversalment (Làm. XXXVIII – Figs. A2 i A3).



En l'últim pas de la fase caputxó (pas 4) i durant la fase acrosòmica (passos 5-7), el citoplasma de les espermatides conté un reticle endoplasmàtic molt desenvolupat, que experimenta les següents modificacions: (1) per la banda interna del *manchette*, format per microtúbuls, les cisternes formen llargs túbuls o làmines amb unions laterals que corren adjacents i paral·leles a aquests microtúbuls (Làm. XLVI – Fig. A); (2) al llarg del compartiment periaxonemàtic proximal, el reticle endoplasmàtic forma un “revestiment” constituït per cisternes de tipus tubular (Làm. XLVI – Fig. B); (3) en la porció intermèdia del lòbul citoplasmàtic, a prop de la cua en formació, el reticle endoplasmàtic s'organitza en forma de roseta, aquesta disposició rep el nom de cos radial (Làm. XLI – Fig. F; Là. XLII - Figs. A i B; Là. XLIII – Fig. B).

A la fase de maduració, el reticle endoplasmàtic entra en regressió, de manera s'observen molt poques cisternes al citoplasma residual alliberat de les espermatides en el pas 9 (espermiació) (Làm. L – Fig. F; Là. XLII – Fig. A).

Algunes cisternes de reticle endoplasmàtic estan associades a ribosomes, però aquests també es troben lliures al citoplasma en forma de poliribosomes, els quals són particularment abundants en la fase acrosòmica.

Les espermatides en el pas 7 de la fase acrosòmica i en el pas 8 de la fase de maduració, presenten al citoplasma una estructura anomenada cos reticulat formada per un material electrodens que es disposa formant filaments gruixuts (Làm. XLVIII - Fig. A). El cos reticulat desapareix en el pas 9 de la fase de maduració.

#### • Els centríols i la formació de la peça de connexió

Al citoplasma de les espermatides arrodonides (Estadi VI) hi ha un parell de centríols disposats en angle recte un respecte de l'altre i, localitzats molt a prop de la membrana plasmàtica. A la fase Golgi, els centríols migren de la perifèria cel·lular cap al nucli i arrosseguen amb ells la membrana plasmàtica (Làm. XXXIX – Fig. F). Simultàniament, un dels dos centríols inicia la formació de l'axonema. A la fase caputxó, els centríols s'associen amb la fossa d'implantació que s'uneix a l'embolcall nuclear mitjançant la placa basal (Làm. XLIII – Fig. B). A la zona de la fossa d'implantació i del centríol proximal, s'observa un material electrodens que es disposa envoltant ambdues estructures (Làm. XLIII – Figs. E i F). A partir del centríol proximal es formen el *capitulum* i la peça de connexió i, a partir del centríol distal es forma l'axonema (Làm. XLIII – Figs. A, E i F;

Làm. XLVI – Figs. A i F). El creixement de l'axonema es completa al final de la fase caputxó (Làm. XLIII – Fig. F).

Al llarg de la fase acrosòmica, es produeix una acumulació progressiva de material electrodens entre els triplets microtubulars i la superfície externa d'ambdós centríols. Aquest material esdevé confluent i, juntament amb el *capitulum*, forma les columnes estriades (Làm. XLVI – Fig. F; Là. XLVII – Fig. E).

Durant la fase caputxó, una estructura coneguda com a adjunt centriolar sorgeix de l'extrem del centríol proximal i assoleix la seva longitud màxima en els últims passos de la fase acrosòmica (Làm. XLIII – Fig. E). Aquesta estructura és una extensió dels 9 triplets de microtúbuls centriolars. A l'extrem de l'adjunt centriolar s'observa un material lleugerament electrodens (Làm. XLIII – Fig. E). A la fase de maduració, l'adjunt es dissol, amb la qual cosa queda únicament el centríol proximal disposat en un angle de 45° respecte de l'eix longitudinal de l'espermàtida (Làm. XLVI – Fig. F). El material electrodens que forma les columnes estriades és continu amb les fibres denses que es desenvolupen al llarg de l'axonema (Làm. XLVI – Fig. F).

El *manchette* és una estructura formada per microtúbuls molt característica de la fase acrosòmica (Làm. XLIV – Figs. B-F), tot i que, en els últims passos de la fase caputxó ja és visible (Làm. XLIV – Fig. A). Aquesta estructura, considerada responsable de la forma nuclear, s'estén des de la part inferior del sistema acrosòmic fins al lòbul citoplasmàtic (Làm. XLIV – Figs. C i E). El *manchette* es disposa en forma de piràmide truncada aplanada i, està inserit en una estructura en forma d'anell anomenada anell nuclear. Aquesta estructura, situada a una petita distància de l'extrem distal de la vesícula acrosòmica, està associada a la membrana plasmàtica i es disposa envoltant el nucli (Làm. XLIV – Figs. E i F; Là. XLV – Fig. A; Là. XLVI – Figs. E i F; Là. XLVII – Fig. E). Així doncs, el *manchette* envolta la fossa d'implantació, la peça de connexió en desenvolupament i, una part de l'axonema del compartiment periaxonemàtic proximal (Làm. XLIV – Figs. C, E i F; Là. XLV – Figs. A, C, D i F; Là. XLVI – Figs. A-F). Les parets d'aquest *manchette* estan constituïdes per nombrosos microtúbuls que corren paral·lels els uns respecte dels altres i respecte a l'eix longitudinal de l'espermàtida. El microtúbuls estableixen entre ells ponts d'unió (Làm. XLVI – Figs. B i E). La dissolució del *manchette* es produeix durant el passos 8-9 de l'espermioogènesi, la qual cosa coincideix amb la ràpida migració de l'anell del flagel al llarg de l'axonema (Làm. XLVII – Fig. A; Là. XLVIII – Figs. C i D; Là. XLIX – Figs. A i B). L'anell nuclear persisteix fins al pas 9 on esdevé l'escotadura circular (Làm. XLVII – Fig. D).

El cos cromatoide i l'anell del flagel són dues estructures diferents des del punt de vista morfològic, però, al llarg de l'espermioquèsi s'associen momentàniament. El cos cromatoide s'observa en la fase Golgi, en la fase caputxó i en els passos inicials de la fase acrosòmica, habitualment, a les proximitats de l'aparell de Golgi (Làm. XL - Figs. A i F; Là. XLII - Figs. C i D). A l'inici de l'espermioquèsi el cos cromatoide és petit i irregular i, està constituït per un material electrodens granular (Làm. XL - Figs. A i F). Cap al final de la fase caputxó, el cos cromatoide es mou cap al pol distal del nucli i es disposa al voltant del centríol distal i de la part proximal de l'axonema (Làm. XLIII - Figs. B, C, E i F). L'anell del flagel és una estructura en forma d'anell constituïda per un material electrodens finament filamentós que està estretament associat amb la membrana plasmàtica (Làm. XLIV - Figs. A i E; Là. XLV - Fig. D; Là. XLVI - Figs. A i F; Là. XLVII - Fig. E). A l'espermatozoide madur, l'anell del flagel esdevé l'anell de Jensen, el qual marca el límit entre la peça intermèdia i la peça principal i, impedeix el pas dels mitocondris de la peça intermèdia a la peça principal (Làm. XLIX - Fig. G). La formació de l'anell del flagel s'inicia en el pas 1 de la fase Golgi, a les proximitats de la membrana plasmàtica que envolta el centríol distal a partir del qual deriva l'axonema (Làm. XLIV - Fig. A).

#### • **Les fibres denses**

Les fibres denses, considerades l'element citoesquelètic majoritari de la cua dels espermatozoides, es troben distribuïdes al llarg de la peça intermèdia i del primer terç de la peça principal, en nombre de 9, una per cada doblet de microtúbuls de l'axonema (Làm. XLIX - Fig. D). El gruix i el diàmetre de les fibres denses són màxims a la zona límit amb la peça de connexió i, es van reduint al llarg de les dues peces següents (Làm. XLVIII - Figs. A-F). Les fibres denses número 3 i 8 de la peça principal són substituïdes pels eixos longitudinals de la beina fibrosa. Les fibres denses comencen a formar-se en el pas 6 de la fase acrosòmica (Làm. XLIV - Fig. E). Durant els passos 7-9, les fibres denses augmenten de longitud i de diàmetre en direcció distal (Làm. XLV - Figs. A i D; Là. XLVI - Figs. A i E; Là. XLVII - Fig. A), malgrat tot, és en els passos 8 i 9 on les fibres denses de l'esbós de la peça intermèdia experimenten un major creixement de gruix (Làm. XLVI - Fig. B; Là. XLVIII - Figs. C i D).

• **La beina fibrosa**

La beina fibrosa és una estructura complexa constituïda per eixos longitudinals que corren paral·lels i adjacents als dobles microtubulars número 3 i 8 i, per nombroses costelles transversals que uneixen els eixos longitudinals (Làm. XLIX – Figs. F i G). El desenvolupament de la beina fibrosa té lloc en sentit distal-proximal, és a dir, que la formació d'aquesta part de la cua comença per la seva part més distal. El desenvolupament dels eixos longitudinals es produeix des del pas 2 al pas 8. La formació de les costelles es produeix en canvi al llarg de les fases acrosòmica i de maduració (passos 5-8). Així doncs, l'acoblament de la beina fibrosa és un procés que s'estén des del pas 2 al pas 8 de l'espermioogènesi.

A la fase caputxó, apareix una estructura tubular complexa i transitòria, anomenada cos fusiforme. Aquesta estructura ocupa part de l'esbós de la peça intermèdia i està constituïda per microtúbuls disposats ortogonalment respecte de l'axonema i formant múltiples capes (Làm. XLIX – Fig. E). La desaparició del cos fusiforme es produeix al mateix temps que es forma la beina mitocondrial i s'ha completat, també, el desenvolupament de la beina fibrosa (passos 8 i 9).

• **Els mitocondris**

Els mitocondris de les espermàtides arrodonides es caracteritzen perquè l'espai de dins les crestes és molt dilatat i conté un fluid transparent als electrons, mentre que, la matriu mitocondrial té un volum condensat i reduït (Làm. XXXVIII – Fig. A1; Là. XXXVII – Fig. B). Així doncs, l'espai de dins les crestes és volumètricament més important que l'espai que ocupa la matriu. A les fases Golgi i caputxó, els mitocondris de les espermàtides són esfèrics i es distribueixen, majoritàriament, a la perifèria del citoplasma (Làm. XXXIX – Figs. A-F; Là. XL – Fig. B; Là. XLI – Fig. E). A la fase acrosòmica, el citoplasma s'estén al llarg de l'axonema i els mitocondris no canvien massa la seva estructura, encara que, sembla que incrementen en nombre (Làm. XLIV – Fig. E). En el pas 8 de la fase de maduració, l'anell del flagel descendeix per l'axonema; i, com a conseqüència, el compartiment proximal periaxonemàtic desapareix i els mitocondris tenen accés directe a les fibres denses (Làm. XLVIII – Figs. C i D; Là. XLIX – Figs. A i B). Els mitocondris migren des del citoplasma perifèric, entren en contacte amb les fibres denses i, ràpidament, es disposen un al costat de l'altre de manera helicoidal al llarg de l'esbós de la

peça intermèdia. En els passos 8 i 9, els mitocondris s'allarguen i presenten forma de mitja lluna (Làm. XLIX – Figs. A i B). Aquest canvi de forma ve acompanyat per una pèrdua del fluid transparent als electrons de l'interior de les crestes, el volum de les quals ara s'aproxima al volum de la matriu (Làm. XLVIII – Figs. C i D; Là. XLIX – Figs. A i B). Molts mitocondris no intervenen en la formació de la peça intermèdia de la cua, tot i això, experimenten els mateixos canvis estructurals que els mitocondris que acaben formant part de la peça intermèdia. Aquests mitocondris sobrants són descartats dins el cos residual al final de l'espermioquèsi (Làm. L – Fig. F).

Una de les característiques histològiques de l'epiteli seminífer és l'agrupació de les espermàtides en desenvolupament dins del citoplasma apical de les cèl·lules de Sertoli. Aquesta relació tan íntima entre les espermàtides i les cèl·lules de Sertoli s'estableix en els passos 5–6 i es manté fins a l'espermioquèsi (Làm. XLIV – Figs. B-F; Là. XLV – Figs. B-F; Là. XLVII – Figs. B, C i D; Là. XLVIII – Figs. A, C i D). Durant les últimes dues fases de l'espermioquèsi, es produeix la invaginació cap al lòbul citoplasmàtic de perllongaments de la cèl·lula de Sertoli (Làm. XLVIII – Fig. B). Algunes d'aquestes invaginacions apareixen associades a una xarxa de cisternes de reticle endoplasmàtic de l'espermàtida subjacent a la membrana plasmàtica; aquesta xarxa es disposa resseguint el perllongament de la cèl·lula de Sertoli. Majoritàriament, però, els perllongaments de les cèl·lules de Sertoli, no apareixen associats al reticle endoplasmàtic.

Gairebé al final de l'espermioquèsi, la membrana plasmàtica del cap de les espermàtides madures emet estretes projeccions tubulars que són invaginades com una massa en forma de disc cap al citoplasma de les cèl·lules de Sertoli; a aquestes masses se les anomena complexos tubulobulbars i serveixen per retenir les espermàtides a la superfície de l'epiteli seminífer (Làm. L - Figs. A-D). La desaparició d'aquestes estructures es produeix just abans de l'alliberament de les espermàtides al lumen del túbul seminífer.

Al final de l'espermioquèsi es produeix un altre tipus d'interacció entre les cèl·lules de Sertoli i les espermàtides que permet a les espermàtides madures (pas 9) alliberar-se del citoplasma sobrant. La cèl·lules de Sertoli ancoren els lòbuls citoplasmàtics, mentre que, els caps de les espermàtides madures es mouen cap al lumen tubular. Aquest citoplasma residual conté mitocondris, gotes lipídiques, algunes vesícules, cossos granulats i ribosomes (Làm. XLVII – Fig. A; Là. L – Fig. F). El citoplasma residual s'allibera de la peça de connexió al final del pas 9, deixant una petita porció de citoplasma romanent unida

a la peça de connexió. El citoplasma residual és fagocitat per les cèl·lules de Sertoli i, després lisat per la fusió amb lisosomes.

A la superfície apical de les cèl·lules de Sertoli, es formen unes invaginacions anomenades criptes; cada cripta conté una espermatida en procés de maduració (Làm. XLV – Figs. C i E; Làm. XLVII – Figs. B-D). La unió de les espermatides a les criptes es manté mitjançant unions especialitzades, designades com a complexos ESER (Làm. XLVII – Fig. B; Làm. L – Fig. C). Els complexos ESER es desenvolupen al citoplasma apical de les cèl·lules de Sertoli i, estan constituïts per una cisterna de reticle endoplasmàtic disposada a prop i paral·lela a la membrana plasmàtica de l'espermatida; entre la cisterna de reticle i la membrana de la cèl·lula de Sertoli es localitza una capa de material electrodens.

A l'epiteli seminífer s'observen nombroses cèl·lules que presenten signes de degeneració. Aquestes cèl·lules són, majoritàriament, espermatogònies i espermatides en els primers passos de l'espermioogènesi (Làm. LI - Figs. A-E). Normalment, les cèl·lules germinals degeneratives són fagocitades per les cèl·lules de Sertoli (Làm. XXVI – Fig. F), però, en el cas que aquestes cèl·lules progressin, donaran lloc a espermatozoides amb algun tipus de malformació, la qual cosa pot provocar problemes de fertilitat. Les malformacions de les espermatides en desenvolupament, en la majoria de casos, es donen en el desenvolupament d'únicament un component cel·lular, tal com l'acrosoma, el nucli o la cua.

## DISCUSSIÓ

El present estudi posa novament de manifest l'extraordinària complexitat de l'espermioogènesi. Aquesta complexitat és conseqüència de les múltiples transformacions que experimenten el nucli i els orgànuls citoplasmàtics de les espermàtides fins a convertir-se en espermatozoides. Curiosament, a excepció dels mitocondris, cap dels orgànuls cel·lulars estàndards, com el reticle endoplasmàtic, l'aparell de Golgi o els centríols, formen part de l'espermatozoide madur; si bé, totes les estructures observades a l'espermatozoide deriven d'aquests orgànuls. El sistema acrosòmic és elaborat pel sistema reticle endoplasmàtic-aparell de Golgi; l'axonema deriva del centríol distal; els elements citoesquelètics de l'espermatozoide, com les fibres denses, la beina fibrosa i l'anell del flagel, són el resultat d'una elevada activitat de biosíntesi a nivell dels poliribosomes. L'elevat grau d'originalitat d'aquest procés de diferenciació cel·lular fa que no tingui equivalent en cap altre tipus cel·lular. El nucli de les espermàtides, com a resultat d'un mecanisme altament controlat de condensació de la cromatina i de disposició de l'embolcall nuclear, esdevé compacte alhora que adopta una determinada forma, la qual és específica d'espècie. Entre el nucli i el sistema acrosòmic s'estableix una associació molt estreta, similar a la que s'estableix entre el parell de centríols i l'embolcall nuclear en els primers passos de l'espermioogènesi. Ambdós casos constitueixen exemples excepcionals d'associació entre el nucli i els orgànuls cel·lulars. Les modificacions estructurals dels mitocondris, així com llur desplaçament cap a i al voltant de la peça intermèdia de la cua de l'espermatozoide en formació, no té cap equivalent en cap altre tipus cel·lular. Per últim, destacar que l'evolució i/o la formació dels components citoesquelètics com el *manchette*, els anells nuclear i del flagel, les fibres denses i la beina fibrosa són característiques específiques de les espermàtides.

Entre les espermatides en desenvolupament i les cèl·lules de Sertoli també s'estableix una estreta relació, aquesta relació es pot considerar com un cas excepcional d'interacció cel·lular. Tots els esdeveniments citològics que tenen lloc durant l'espermioquèsi pressuposen l'existència d'una multitud de mecanismes reguladors, tant de tipus bioquímic com físicoquímic. Aquest fet, ofereix un ampli camp d'investigació tant per a la biologia cel·lular com per a la biologia molecular.

En mamífers, l'espermioquèsi és un llarg procés de diferenciació cel·lular. L'ús d'elements traça radioactius i de tècniques d'autoradiografia van fer possible determinar que l'espermioquèsi dura aproximadament 20 dies en rata (Clermont i col., 1959) i 24 dies en humans (Heller i Clermont, 1964). Aquests temps són força representatius de la durada de l'espermioquèsi en la majoria d'espècies de mamífers (Clermont, 1972). En el present treball, s'ha estimat, a partir de la freqüència relativa dels estadis del cicle de l'epiteli seminífer, que l'espermioquèsi de porcí dura uns 14 dies; aquesta durada no és significativament diferent a les descrites per altres autors (Swierstra, 1968; França i Cardoso, 1998), per tant, això valida el mètode emprat per a determinar la durada de l'espermioquèsi.

Així doncs, l'espermioquèsi és un procés que té una durada limitada i, a on cada pas de diferenciació de les espermatides té una durada fixa específica d'espècie (Clermont i Harvey, 1965). Aquests temps, però, es poden veure afectats per factors extracel·lulars com l'estrès, la llum, la temperatura, l'estat sanitari, l'edat, les hormones o els factors de creixement (Suda i col., 1992; Dadoune i Demoulin, 1993; Gnessi i col., 1997; Yazawa i col., 1999; Gottreich i col., 2000; Mackay, 2000; Veeramachaneni, 2000; Mariani i col., 2002). Sota aquestes condicions, es produeixen anomalies en l'espermioquèsi i en el procés de meiosi que experimenten els espermatòcits (Gottreich i col., 2000; Sprando i col., 2000). Aquestes alteracions es manifesten en una reducció del nombre d'espermatides, la qual cosa provoca una disminució considerable de la producció espermàtica. El nombre d'espermatides de l'epiteli seminífer juntament amb el diàmetre tubular es consideren marcadors de l'activitat espermatoquènica (Yazawa i col., 1999; Gottreich i col., 2000; Sprando i col., 2000).

En la diferenciació de les espermatides hi estan involucrats, simultàniament, diversos sistemes cel·lulars. El reticle endoplasmàtic, l'aparell de Golgi, els mitocondris, el complex centriolar axonemàtic i el nucli experimenten transformacions estructurals i bioquímiques al mateix temps. Tots aquests processos s'integren i es coordinen a fi de produir



espermatozoides normals. En el present treball, es descriu l'evolució de cada orgànul citoplasmàtic al llarg de l'espermioquèsi de porcí, però, s'ha de tenir en compte que tots aquests processos haurien de ser visualitzats d'una manera integrada.

L'espermioquèsi és un fenomen que implica nombroses espermàtides, les quals es mantenen unides entre si mitjançant ponts citoplasmàtics. Aquesta característica no és pròpia únicament de les espermàtides, ja que, les espermatogònies i els espermatòcits també la presenten; això fa que el nombre d'espermàtides associades sigui molt gran (Fawcett i col., 1959; Dym i Fawcett, 1971; Weber i Russell, 1987). La unió de les espermàtides del mateix clon mitjançant els ponts citoplasmàtics contribueix a la sincronització de la seva evolució, la qual cosa fa que, en una determinada regió de l'epiteli seminífer aparegui un nombre molt elevat d'espermàtides en el mateix grau de desenvolupament.

La diferenciació de les espermàtides no és estructural o funcionalment independent del seu entorn. De fet, el desenvolupament d'aquestes cèl·lules està íntimament relacionat amb les cèl·lules de Sertoli (Bardin i col., 1994). En el present treball, s'han descrit les associacions estrictament estructurals que existeixen entre les espermàtides en desenvolupament i les cèl·lules de Sertoli, però, s'ha fet escassa referència a les interaccions funcionals que s'estableixen entre ambdós tipus cel·lulars.

Per tant, en aquest treball s'han examinat detalladament els canvis que experimenta cada orgànul o complex citoplasmàtic al llarg de l'espermioquèsi. Els resultats indiquen que els diferents passos de desenvolupament de les espermàtides al llarg de l'espermioquèsi es mantenen constants entre els tres mascles porcins Landrace estudiats.

Encara que, durant l'espermioquèsi tingui lloc una transformació morfològica gradual de les espermàtides és necessari establir una sèrie de distincions per tal de dividir en passos aquest procés. L'espermioquèsi de porcí s'ha dividit en 9 passos d'acord amb els canvis observats al nucli i al sistema acrosòmic en desenvolupament (Leblond i Clermont, 1952; Clermont, 1954; Clermont i Leblond, 1955; Suswillo i Watson, 1990; Dadoune i Demolin, 1993; Clermont i col., 1993). Tot i que s'utilitza el mateix criteri per a totes les espècies, el nombre de passos varia entre espècies i entre els investigadors d'una mateixa espècie. Així doncs, l'espermioquèsi s'ha dividit en 19 passos en rata, 17 en hámster, 14 en mones, 8 en humans, 15 en bous, 9 en porc i toro (Suswillo i Watson, 1990; Clermont i col., 1993; Dadoune i Demolin, 1993). Malgrat que el nombre de passos en què es divideix

l'espermioogènesi de les diferents espècies estudiades variï, les característiques pròpies de cada una de les fases de l'espermioogènesi són comunes.

Les característiques de l'espermioogènesi i dels espermatozoides de diferents espècies, sobretot en rata, han estat ben descrites (Okó i Clermont, 1990; Clermont i col., 1993; de Kretser i Kerr, 1994; Eddy i O'Brien, 1994), però, existeixen molts pocs estudis que analitzin l'espermioogènesi en porcí. Suswillo i Watson (1990) van realitzar un estudi comparatiu de l'espermioogènesi i de l'espermioogènesi en porcí i en boví utilitzant talls semifins de testicle tenyits amb blau de toluídina. Per tant, el present estudi aporta noves dades sobre les transformacions ultraestructurals que experimenten les espermàtides al llarg del procés espermioogènic de porcí.

El patró de condensació de la cromatina de les espermàtides en desenvolupament al llarg de l'espermioogènesi descrit en aquest treball, és molt similar al descrit en bens i en rates (Loir i Courtens, 1979; Loir i Lanneau, 1984; Okó i Clermont, 1990; Suswillo i Watson, 1990; Eddy i O'Brien, 1994; de Kretser i Kerr, 1994). A les espermàtides de rata (Meistrich i col., 1978) i be (Loir i Lanneau, 1984), al mateix temps que es produeix la condensació de la cromatina, tenen lloc dues modificacions en la composició de les nucleoproteïnes bàsiques. La primera modificació consisteix en la substitució de diverses histones específiques de testicle, les quals estan presents tant als espermatoòcits com a les espermàtides arrodonides, per dues (rata) o vuit (be) proteïnes bàsiques específiques de les espermàtides. Aquesta substitució té lloc gradualment durant el període d'allargament nuclear i condensació de la cromatina. La segona modificació és també gradual i, implica la substitució de les proteïnes bàsiques específiques de les espermàtides per una o més proteïnes bàsiques específiques dels espermatozoides (les protamines). Aquestes proteïnes són especialment riques en residus d'arginina i de cisteïna; els residus de cisteïna s'uneixen entre si mitjançant ponts disulfur, fet que contribueix a la condensació i estabilització de la cromatina. El procés de condensació de la cromatina i de les proteïnes que hi intervien ha estat àmpliament estudiat, però, encara queda resoldre quin o quins factors, probablement de tipus genètic, determinen la forma del nucli de cada espècie (Clermont i col., 1993).

Malgrat que les protamines se sintetitzen al final de l'espermioogènesi (Hecht, 1988, 1990), la síntesi dels RNA missatgers s'atura cap al final de la fase caputxó (Monesi, 1965; O'Brien i Bellvé, 1980). Aquest fet fa pensar que, els RNA missatgers que codifiquen per les protamines s'emmagatzemen en el citoplasma de les espermàtides abans de ser activats i traduïts. Aquesta situació es repeteix per a les proteïnes citoesquelètiques, ja que,

aquestes se sintetitzen a la fase acrosòmica i es dipositen a la fase de maduració (Oko i Clermont, 1989).

L'embolcall nuclear de les espermàtides de porcí a les fases acrosòmica i de maduració presenten en el seu extrem distal els anomenats cossos laminars. Aquests excedents de membrana també apareixen a les espermàtides de la majoria d'espècies de mamífers (Franklin, 1968; Fawcett i Phillips, 1969; Phillips, 1970). Aquest fragment d'embolcall nuclear experimenta una forta regressió al final de l'espermioquènesi, malgrat tot, una petita porció es manté en la majoria d'espermatozoides de diferents espècies de mamífers (Zamboni i Stefanini, 1970; Clermont i col., 1993; Bonet i col. 2000).

L'aparell de Golgi intervé activament en la formació del sistema acrosòmic durant les fases Golgi i caputxó. Quan es produeix la dissociació del sistema acrosòmic, al final de la fase caputxó, l'aparell de Golgi es localitza al lòbul citoplasmàtic com la resta d'òrgans de l'espermàtida. Diversos estudis han demostrat que, tot i la nova localització de l'aparell de Golgi, l'activitat estructural i funcional d'aquest òrganul es manté (Clermont i Rambourg, 1978; Clermont i Tang, 1985). Eddy i O'Brien (1994) van suggerir que, en aquesta situació un possible destí de les proteïnes sintetitzades per l'aparell de Golgi era la membrana plasmàtica, ja que, aquesta experimenta importants canvis bioquímics durant l'espermioquènesi.

Diversos estudis estructurals, citoquímics i funcionals han demostrat que l'aparell de Golgi glicosila i segrega les proteïnes que constitueixen el sistema acrosòmic (Bennett, 1984, 1988; Clermont i col., 1990; Smith, 1990), però, existeixen molt poques dades sobre el significat funcional de la relació de l'aparell de Golgi amb els cossos multivesiculars i amb el cos cromatoide.

Els cossos multivesiculars, els quals són especialment abundants a les espermàtides d'algunes espècies com el toro (Barth i Oko, 1989), es disposen molt a prop de l'aparell de Golgi durant els primers passos de l'espermioquènesi; més tard, es localitzen al pol distal del nucli, a prop del parell centriolar. La presència de fosfatases àcides dins els cossos multivesiculars indiquen el seu possible origen lisosomal (Tang i col., 1982), però, la seva funció encara és incerta.

L'aparell de Golgi també contribueix a la formació del cos cromatoide quan aquest es troba a les proximitats de l'aparell de Golgi durant la fase Golgi (Thorne-Tjomsland i col., 1988).

El sistema acrosòmic és ric en glicoproteïnes (Allison i Hartree, 1970; Clermont i col., 1981), i està composta majoritàriament per enzims hidrolítics i fosfatases àcides (Thorne-Tjomsland i col., 1988). Diversos estudis citoquímics realitzats amb lectines han demostrat que, la distribució d'aquests enzims hidrolítics no és homogènia, sinó que, a dins del sistema acrosòmic existeixen diferents compartiments quant a contingut (Bennett, 1988; Thorne-Tjomsland i col., 1988; Abou-Haila i Tulsiani, 2000).

Al llarg de l'espermioquèsi, el reticle endoplasmàtic de les espermàtides en desenvolupament experimenta grans canvis estructurals, la qual cosa suggereix que aquest òrganul contribueix de manera molt activa en la diferenciació de les espermàtides. La disposició del reticle endoplasmàtic al citoplasma de les espermàtides de porcí al llarg del cicle espermioquètic, és molt similar a la descrita per a altres espècies de mamífers (Dym i Cavicchia, 1978; Hermo i col., 1979; Clermont i col., 1990, 1993). Tot i això, a les espermàtides de porcí, el reticle endoplasmàtic no presenta algunes associacions típiques de les espermàtides de rata. En rata, el reticle endoplasmàtic apareix sovint associat a material citoplasmàtic electrodens, a aquest complex se'l coneix com a cos granulats (Clermont i col., 1990) i intervé en la formació de les fibres denses i la beina fibrosa. El cos radial, format per cisternes de reticle endoplasmàtic disposades en forma de roseta, està normalment associat a lamel·les anellades a les espermàtides de rata (Dym i Cavicchia, 1978). Clermont i col. (1990) van descriure que, a les espermàtides de rata, alhora que el reticle endoplasmàtic es dissol al final de la fase de maduració, apareix l'anomenat cos reticulat que desapareix al final de l'espermioquèsi. La naturalesa i la funció d'aquesta estructura són encara desconegudes.

Les etapes de formació de tots els elements que configuren la cua de l'espermatozoide de porcí són molt similars a les descrites en altres espècies de mamífers (Phillips, 1974; Oko i Clermont, 1990; Clermont i col., 1993). A les espermàtides de rata, el centríol proximal i el seu adjunt experimenten una regressió total a la fase de maduració, la qual cosa genera una cavitat buida en la porció proximal de la peça de connexió (Irons, 1983). En canvi, en porcí, el conjunt format pel centríol proximal i el seu adjunt presenten una regressió parcial, ja que, en l'espermatozoide madur s'observa el centríol proximal disposat en un angle de 45° respecte de l'eix longitudinal del gàmeta (Bonet i col., 2000).

Tant en rata com en porcí, el material electrodens que forma les columnes estriades és continu amb les fibres denses (Clermont i col., 1993; Bonet i col., 2000). Segons diversos estudis immunocitoquímics, les columnes estriades, la placa basal i el *capitulum* contenen

proteïnes que també formen part de les fibres denses, fet que suggereix un origen comú per a totes aquestes estructures (Oko, 1988; Clermont i col., 1990).

L'axonema de les espermàtides de rata, com de les espermàtides de porcí, es desenvolupa a partir del centriol distal per addició d' $\alpha$  i  $\beta$  tubulines a l'extrem distal dels dobles de microtúbuls. El creixement de l'axonema s'atura al final de la fase caputxó (Oko i Clermont, 1990).

El *manchette* és una estructura característica de la fase caputxó que està formada per microtúbuls disposats paral·lels els uns respecte dels altres i respecte de l'eix longitudinal de l'espermàtida (Hermo i col., 1991). Aquesta estructura és la responsable de la forma del cap de l'espermatozoide la qual és específica d'espècie (Cole i col., 1988; Abou-Haila i Tulsiani, 2000), però, a més, se li atribueixen altres funcions com la creació de corrents citoplasmàtics que ajuden a la redistribució i disposició dels orgànuls cel·lulars dins el lòbul citoplasmàtic de les espermàtides en desenvolupament. Aquesta hipòtesi es veu reforçada pel fet que, s'ha observat que els moviments citoplasmàtics són especialment importants en la fase acrosòmica, coincidint amb el màxim desenvolupament del *manchette* (Clermont, 1967).

La distribució i la morfologia del cos cromatoide de les espermàtides de porcí al llarg de l'espermiogenesis són molt semblants a les descrites en rata (Susi i Clermont, 1970; Parvinen i Jokelainen, 1974). La composició del cos cromatoide és encara poc coneguda, però, el seu contingut de RNA suggereix que podria actuar com a portador d'informació (Hecht, 1990). Es pensa que el cos cromatoide també contribueix a la formació de l'anell del flagel (Susi i Clermont, 1970; Thorne-Tjomsland i col., 1988).

L'anell del flagel presenta una gran variabilitat entre espècies pel que fa a la grandària i a l'estructura interna, però, per a una determinada espècie es manté constant (Fawcett i Phillips, 1970).

Les fibres denses són elements citoesquelètics presents a tots els espermatozoides de totes les espècies de mamífers, encara que, la mida i la forma són específiques d'espècie (Fawcett, 1970, 1975; Olson i Sammons, 1980; Bonet i col., 2000). En general, el gruix i el diàmetre de les fibres denses són màxims a la zona límit amb la peça de connexió i es va reduint al llarg de les dues peces següents. Al final de la fase acrosòmica i durant la fase de maduració, les fibres denses augmenten de longitud i, sobretot, de diàmetre en direcció distal. L'augment de gruix de les fibres denses es produeix simultàniament al

desplaçament, en direcció distal, de l'anell del flagel fins a la regió que limita les peces intermèdia i principal de la cua de l'espermatozoide. El desplaçament de l'anell del flagel provoca la desaparició del compartiment periaxonemàtic proximal i, permet que moltes proteïnes contingudes en el lòbul citoplasmàtic de les espermàtides tinguin accés directe a les fibres denses (Clermont i col., 1993).

L'aparença de la beina fibrosa varia entre espècies (Fawcett, 1975; Clermont i col., 1993), però, en general, està composta per dos eixos longitudinals que corren paral·lels al llarg dels doblets de microtúbuls números 3 i 8 i, per nombroses columnes transversals que uneixen els dos eixos longitudinals (Oko i Clermont, 1990). El desenvolupament de la beina fibrosa es produeix en sentit distal-proximal i s'estén des de la fase Golgi fins a la fase de maduració (Oko i Clermont, 1989; Clermont i col. 1990), tot i que, la màxima producció i acoblament de les proteïnes pròpies de la beina fibrosa té lloc, majoritàriament, a la fase de maduració (Clermont i col., 1990).

L'evolució que experimenten els mitocondris al llarg de l'espermioquèsi de porcí és comparable a la descrita per a diverses espècies de rosegadors (André, 1962; Otani i col., 1988). En rata, a diferència de porcí, els mitocondris de les espermàtides apareixen associats a un material electrodens finament granular durant la fase acrosòmica (Clermont i col., 1993). Al llarg del cicle de l'epiteli seminífer, els mitocondris de les cèl·lules germinals de rata experimenten grans canvis morfològics, de manera que, s'observen com a mínim tres tipus diferents de mitocondris (Seitz i col., 1995). Les espermatogònies i els espermatòcits preleptotens i leptotens presenten mitocondris amb crestes normals, mentre que, els espermatòcits paquitens i les espermàtides joves presenten mitocondris molt condensats i gairebé cap cresta; els mitocondris dels espermatòcits zigotens tenen un aspecte intermedi (Seitz i col., 1995).

Entre les cèl·lules de Sertoli i les espermàtides s'estableixen importants relacions estructurals que són de vital importància per al correcte desenvolupament de les espermàtides. Una d'aquestes interaccions és la disposició de les espermàtides en desenvolupament dins d'unes invaginacions en forma de cripta de les cèl·lules de Sertoli (Amlani i Vogl, 1988), la qual cosa permet un ràpid i eficient intercanvi de substàncies entre ambdós tipus cel·lulars. D'acord amb diversos estudis immunocitoquímics que utilitzen el microscopi electrònic, aquesta disposició de les espermàtides es podria veure afavorida per diversos elements citoesquelètics del citoplasma de les cèl·lules de Sertoli (Herms i col., 1991; de Kretser i Kerr, 1994). Un altre tipus d'interacció, observada en un

gran nombre d'espècies (Morales i Clermont, 1982; Vogl i col., 1985; Clermont i col., 1993), és l'emissió de perllongaments citoplasmàtics per part de les cèl·lules de Sertoli cap al lòbul citoplasmàtic de les espermatides subjacents. En rata i en porcí, algunes d'aquestes invaginacions apareixen associades a una xarxa de cisternes de reticle endoplasmàtic situada dins el citoplasma de l'espermàtida subjacent; aquesta xarxa es disposa a prop de la membrana plasmàtica de l'espermàtida i ressegueix els perllongaments citoplasmàtics que emet la cèl·lula de Sertoli. Aquestes invaginacions, després de la seva formació, experimenten una escissió, de manera que es generen vesícules de doble membrana que engloben porcions de citoplasma de la cèl·lula de Sertoli (Clermont i col., 1993). En una fase més avançada, es produeix una autolisi a l'interior de les vesícules i, aquestes passen a tenir una única membrana. Aquestes observacions suggereixen que, l'associació entre el reticle endoplasmàtic i els perllongaments citoplasmàtics de les cèl·lules de Sertoli són un mecanisme per alliberar petites molècules de les cèl·lules de Sertoli dins les espermatides (Morales i Clermont, 1982). Per contra, els perllongaments citoplasmàtics de la cèl·lula de Sertoli no associats al reticle endoplasmàtic no mostren ni escissió ni autolisi, la qual cosa suggereix que la seva funció és acomodar les espermatides en desenvolupament dins les cèl·lules de Sertoli (Clermont i col., 1993).

A les etapes finals de l'espermioïgènesi, la membrana plasmàtica del cap de les espermatides madures emet estretes projeccions tubulars que, són invaginades com una massa en forma de disc al citoplasma de les cèl·lules de Sertoli; aquestes masses reben el nom de complexos tubulobulbars. Aquests complexos retenen les espermatides fins al moment de ser alliberades al lumen del túbul seminífer; després de l'espermioïcació, els complexos tubulobulbars es dirigeixen cap a la base de la cèl·lula de Sertoli (Vogl i col., 1983; Wrobel i Schimmel, 1989; Pawar i Wrobel, 1991).

Les interaccions estructurals que s'estableixen entre les espermatides en desenvolupament i les cèl·lules de Sertoli, no només tenen una funció de suport, sinó que, a més, modulen l'expressió gènica i la funció secretora de les cèl·lules de Sertoli. En aquest sentit, les espermatides joves actuen secretant factors solubles, mentre que, les espermatides madures modulen la funció secretora de les cèl·lules de Sertoli mitjançant els canvis que experimenten durant l'espermioïgènesi i, mitjançant la fagocitosi dels cossos residuals per part de les cèl·lules de Sertoli (Jégou, 1991, 1992).

Les cèl·lules de Sertoli experimenten canvis de forma i de contingut d'orgànuls al llarg del cicle de l'epiteli seminífer. Les variacions en la forma cel·lular són conseqüència de les

transformacions estructurals i de la mobilització de les cèl·lules germinals del compartiment basal al compartiment adluminal. Aquesta capacitat d'adaptació és conseqüència, bàsicament, de la presència de nombrosos filaments intermedis distribuïts homogèniament pel citoplasma de les cèl·lules de Sertoli (Lacy, 1960; Diertert, 1966). En humans, la variació de la morfologia de les cèl·lules de Sertoli al llarg del cicle espermatogènic no és tan evident com en altres espècies de mamífers (Kerr i de Kretser, 1981). Les variacions en el contingut d'orgànuls es produeixen, majoritàriament, en relació amb les espermatides en desenvolupament (Ueno i Mori, 1990).

El reticle endoplasmàtic llis de les cèl·lules de Sertoli no es disposa seguint cap patró morfològic general, ja que, pot presentar forma vesicular, tubular i/o de cisternes fenestrades o lamelars (Lofts, 1972; Dym, 1973; Schulze, 1974, 1984; Kerr i de Kretser, 1981; Baccetti i col., 1983; Ploen i Ritzén, 1984; Jegóu, 1992). En porcí, boví i oví, el reticle endoplasmàtic llis forma grans masses compactes que apareixen al voltant de les espermatides en desenvolupament (Schulze, 1974; Schulze, 1984; Wrobel i Schimmel, 1989; Pawar i Wrobel, 1991). En les cèl·lules de Sertoli d'alguns remugants, s'han observat nombroses capes concèntriques de reticle endoplasmàtic llis que, es disposen englobant gotes lipídiques o porcions de citoplasma. En rata, s'ha demostrat que el reticle endoplasmàtic de les cèl·lules de Sertoli experimenta canvis cíclics de forma d'acord amb el cicle espermatogènic (Olvik i Dahl, 1981).

Pel que fa a les gotes lipídiques que s'observen al citoplasma de les cèl·lules de Sertoli, es creu que deriven del procés de fagocitosi, tant de les cèl·lules germinals degeneratives com del citoplasma residual de les espermatides madures. Per tant, el contingut de gotes lipídiques de les cèl·lules de Sertoli varia d'acord amb l'estadi del cicle de l'epiteli seminífer (Lacy, 1960; Schulze, 1974; Fawcett, 1975; Kerr i de Kretser, 1975; Kerr i col., 1984). Diversos estudis han demostrat que, en situacions d'aturada parcial de l'espermatogènesi o, sota condicions patològiques, es produeix un augment de les gotes lipídiques (Lofts, 1972; de Kretser i Kerr, 1983; Lincoln, 1989), però, quan es restableix l'espermatogènesi, les inclusions lipídiques desapareixen gradualment. Bergh (1981), va descriure que l'increment de gotes lipídiques al citoplasma de les cèl·lules de Sertoli de testicle ectòpic de rata precedia la fase de degeneració de les cèl·lules germinals.

A més de fagocitar les cèl·lules germinals degeneratives, les cèl·lules de Sertoli eliminen el citoplasma residual de les espermatides madures. Això explica que el nombre de fagolisosomes de les cèl·lules de Sertoli augmenti considerablement després que es



produeixi l'espermiació. Aquests fagolisosomes s'acaben desintegrant a la regió basal de les cèl·lules de Sertoli (de Kretser i Kerr, 1994).

Ueno i col. (1991) afirmen que, en rata, l'aparell de Golgi de les cèl·lules de Sertoli presenta diferents localitzacions intracel·lulars d'acord amb l'estadi del cicle de l'epiteli seminífer, però, sobretot, en funció de la presència d'espermàtides madures. Durant la fase de maduració, l'aparell de Golgi de les cèl·lules de Sertoli se situa al citoplasma apical a fi de proporcionar a les espermàtides algunes glicoproteïnes necessàries per al seu desenvolupament (Ueno i col. 1991). En porcí, no s'han observat diferències en la posició d'aquest orgànul al llarg del cicle espermatogènic.

Les cèl·lules de Leydig no presenten variacions estructurals al llarg del cicle espermatogènic, malgrat això, no es pot afirmar que aquestes cèl·lules no manifestin diferències funcionals en relació a l'espermatogènesi. Seran necessaris estudis addicionals per tal d'aclarir aquest aspecte. S'ha demostrat que, diverses condicions patològiques, com la criptorquídia (Lugg i col., 1996) o l'edat (Bara, 1969; Christensen i Fawcett, 1969; Lalli i Clermont, 1975; Hermo i col. 1985; Chiwataka i col. 1991), alteren la funció secretora de les cèl·lules de Leydig.

El condrioma i el reticle endoplasmàtic de les cèl·lules de Leydig presenten un aspecte molt desenvolupat, fet que es correlaciona amb la seva implicació en el procés d'esteroïdogènesi. Les crestes dels mitocondris de les cèl·lules productores d'esteroïdes presenten una gran variabilitat de formes (Prince, 1999). Aquesta diversitat, posa de manifest el desconeixement que es té sobre com es relacionen les estructures subcel·lulars i l'activitat esteroïdogènica.

## CONCLUSIONS

### • *De la morfologia i la morfometria del testicle*

1. Els testicles del mascle reproductor porcí raça Landrace (varietat anglesa), de  $330,80 \pm 19,99$  g de pes cada un, estan envoltats per una càpsula de  $2.375,13 \pm 246,68$   $\mu\text{m}$  de gruix.
2. La càpsula testicular es divideix en tres capes: la túnica vaginalis, la túnica albugínia i la túnica vasculosa. La túnica vaginalis constitueix l' $1,82 \pm 0,78$  % de la càpsula i està composta per una línia externa de cèl·lules mesotelials i una línia interna de teixit conjuntiu dens. La túnica albugínia representa el  $37,31 \pm 3,27$  % de la càpsula i està constituïda per un teixit conjuntiu dens. La túnica vasculosa ocupa el  $64,26 \pm 4,40$  % de la càpsula i és de teixit conjuntiu lax.
3. El percentatge de parènquima testicular ocupat pels túbuls seminífers i pel teixit intersticial en mascles reproductors porcins sans de la raça Landrace (varietat anglesa) és del  $72,44 \pm 2,12$  % i del  $27,46 \pm 2,12$  %, respectivament.
4. Els túbuls seminífers, de  $226,23 \pm 18,08$   $\mu\text{m}$  de diàmetre, estan intensament recargolats i compostos per la làmina pròpia i l'epiteli seminífer.
5. La làmina pròpia té un gruix mitjà de 4-4,5  $\mu\text{m}$  i està constituïda per la làmina basal i dues línies de cèl·lules peritubulars. La línia de cèl·lules en contacte amb la làmina

basal la formen cèl·lules de tipus mioide, mentre que, la línia més externa està formada per fibroblasts.

6. Els resultats obtinguts indiquen que les característiques morfològiques i morfomètriques dels testicles i, especialment, dels marcadors testiculars, no difereixen entre els mascles reproductors porcins estudiats, ni entre el testicle dret i esquerre. Per tant, la caracterització exhaustiva d'aquests paràmetres en els mascles porcins sans contribuirà a millorar la identificació de les alteracions testiculars sota condicions patològiques. Un profund coneixement de les característiques testiculars i, especialment, dels marcadors testiculars en mascles porcins sans, pot ser de gran utilitat per a la identificació de les alteracions testiculars sota condicions patològiques.

#### **• Del cicle de l'epiteli seminífer**

1. La secció transversal d'un túbul seminífer mostra un únic estadi.
2. La durada total del cicle espermatogènic en porcí s'ha estimat en uns 9,6 dies i la longitud total en uns 4.672,7  $\mu\text{m}$ .
3. El cicle de l'epiteli seminífer del mascle reproductor porcí de la raça Landrace (varietat anglesa) ha estat dividit en 8 estadis d'acord amb el mètode de la morfologia tubular. L'associació cel·lular, l'alçada de l'epiteli seminífer, la freqüència relativa i la durada de cada estadi són característiques que serveixen per a definir cada un dels estadis del cicle de l'epiteli seminífer.
4. La relació mitjana entre l'epiteli seminífer i el lumen vàlida per a qualsevol estadi del cicle espermatogènic dels mascles reproductors porcins de la raça Landrace (varietat anglesa) és de 5,04.

5. L'àrea mitjana d'un túbul seminífer tallat en secció transversal és de  $41.598,158 \pm 7.376,401 \mu\text{m}^2$ , si es considera que la secció és circular i, el diàmetre teòric d'un túbul seminífer és de  $230,44 \pm 1,49 \mu\text{m}$ .
6. Els estadis premeiòtics (Estadis I, II i III) representen el 31,9 % del cicle espermatogènic i es caracteritzen per la presència, principalment, de cèl·lules en les fases inicials de la meiosi I. Les primeres etapes de la meiosi no afecten els paràmetres morfomètrics de l'epiteli seminífer, ja que, els valors obtinguts per l'alçada de l'epiteli seminífer, la freqüència relativa, la longitud i la durada d'aquests estadis són molt variables.
7. Els estadis meiòtics (Estadis IV i V) representen el 16,4 % del cicle espermatogènic i estan constituïts, principalment, per cèl·lules en un estat avançat de la meiosi I i/o cèl·lules en meiosi II. Les últimes fases de la meiosi I i, també, de la meiosi II tenen lloc ràpidament, la qual cosa fa que les freqüències relatives dels estadis meiòtics i, conseqüentment llur durada, siguin més baixes.
8. Els estadis postmeiòtics (Estadis VI, VII i VIII) representen el 50,6 % del cicle espermatogènic. L'esdeveniment més important que té lloc en aquests estadis és la fase de maduració de l'espermioogènesi. A la fase de maduració les espermàtides experimenten diverses modificacions morfològiques i estructurals que donen lloc, finalment, als espermatozoides. La complexitat d'aquests processos fa que els estadis postmeiòtics presentin valors més grans de freqüència relativa, longitud i durada.

• *De l'espermioogènesi*

1. L'espermioogènesi del mascle reproductor porcí de la raça Landrace (varietat anglesa) s'ha dividit en 9 passos que vénen definits per 9 tipus diferents d'espermàtides. El criteri emprat per a la classificació es basa en les modificacions que experimenta el nucli i el sistema acrosòmic al llarg del cicle espermatogènic.

2. La fase Golgi inclou els passos 1 i 2 de l'espermioquèsi, la fase caputxó els passos 3 i 4, la fase acrosòmica els passos 5-7 i la fase de maduració els passos 8 i 9.
3. La durada de l'espermioquèsi en porcí s'ha estimat en uns 14 dies.
4. Les característiques pròpies de cada una de les fases de l'espermioquèsi són comunes a totes les espècies de mamífers estudiades fins al moment.
5. La diferenciació de les espermàtides implica, simultàniament, diversos sistemes cel·lulars. El reticle endoplasmàtic, l'aparell de Golgi, els mitocondris, el complex centriolar axonemàtic i el nucli experimenten transformacions estructurals i bioquímiques de manera simultània. Tots aquests processos s'integren i es coordinen a fi de produir espermatozoides normals.
6. A excepció dels mitocondris, cap dels orgànuls cel·lulars estàndards, com el reticle endoplasmàtic, l'aparell de Golgi o els centríols, formen part de l'espermatozoide madur. Però, totes les estructures observades a l'espermatozoide madur deriven d'aquests orgànuls.
7. El sistema acrosòmic és elaborat pel sistema reticle endoplasmàtic-aparell de Golgi; l'axonema deriva del centríol distal; els elements citoesquelètics de l'espermatozoide com les fibres denses, la beina fibrosa i l'anell del flagel són el resultat d'una elevada activitat de biosíntesi a nivell dels poliribosomes.
8. El nucli de les espermàtides, com a resultat d'un mecanisme altament controlat de condensació de la cromatina i de disposició de l'embolcall nuclear, esdevé compacte alhora que adopta una determinada forma que és específica d'espècie.
9. Entre el nucli i el sistema acrosòmic s'estableix una associació molt estreta, similar a la que s'estableix entre el parell de centríols i l'embolcall nuclear en els primers passos de

l'espermioquèsi. Ambdós casos constitueixen exemples excepcionals d'associació entre el nucli i els orgànuls cel·lulars.

10. L'evolució i/o la formació dels components citoesquelètics com el *manchette*, els anells nuclear i del flagel, les fibres denses i la beina fibrosa són característiques específiques de les espermàtides.

11. Entre les espermàtides en desenvolupament i les cèl·lules de Sertoli s'estableix una relació molt estreta, aquesta relació es pot considerar com un cas excepcional d'interacció cel·lular. Aquesta interacció no només serveix per ancorar les espermàtides en desenvolupament a l'epiteli seminífer, sinó que també actua com un mecanisme regulador de l'espermioquèsi.

## BIBLIOGRAFIA

- Abou-Haila, A.; Tulsiani, D.R.P. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000, 379 (2): 173-182.
- Adashi, E.Y. The potential relevance of cytokines to ovarian physiology. The emerging role of resident ovarian cells of the white blood cells series. *Endocrine Reviews* 1990, 11: 454-464.
- Aguilar, R.; Antón, F.; Bellido, C.; Aguilar, E.; Gaytán, F. Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat testis. *Journal of Endocrinology* 1995, 146: 15-21.
- Alastalo, T.P.; Lonnstrom, M.; Leppa, S.; Kaarniranta, K.; Peltö-Huikko, M.; Sistonen, L.; Parvinen, M. Stage-specific expression and cellular localization of the heat shock factor 2 isoforms in the rat seminiferous epithelium. *Experimental Cell Research* 1998, 240: 16-27.
- Aleandri, V.; Spina, V.; Morini, A. The pineal gland and reproduction. *Human Reproduction Update* 1996, 2 (3): 225-235.
- Allison, A.C.; Hartree, F. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility* 1970, 21: 501-515.
- Amlani, S.; Vogl, A.W. Changes in the distribution of microtubules and intermediate filaments in mammalian Sertoli cells during spermatogenesis. *Anatomical Records* 1988, 220: 143-160.
- André, J. Contribution à la connaissance du condriome: Étude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermiogénèse. *Journal of Ultrastructural and Research* 1962, 3: 1-185.
- Antón, F.; Morales, C.; Aguilar, R.; Bellido, C.; Aguilar, R.; Gaytán, F. A comparative study of mast cells and eosinophil leukocytes in the mammalian testis. *Journal of Veterinary Medicine - Berlin- Series A* 1998, 45: 209-218.
- Arenas, M.I.; Bethencourt, F.R.; Fraile, B.; Paniagua, R. Immunocytochemical and quantitative study of the tunica albuginea testis in young and ageing men. *Histochemistry and Cell Biology* 1997, 107: 469-477.
- Arendt, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction* 1998, 3: 13-22.
- Ariyaratne, H.B.; Mendis-Handagama, S.M.C. Changes in the testis interstitium of Sprague dawley rats from birth to sexual maturity. *Biology of Reproduction* 2000, 62: 680-690.
- Baccetti, B.; Bigliardi, E.; Vegni Talluri, M.; Burrini, A.G. The Sertoli cells in lizards. *Journal of Ultrastructural and Research* 1983, 85: 11-23.

- Bahamonde, R.D. Algunos factores de influencia en reproducción. Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura Científica 1987, 9: 315-325.
- Bara, G. Histochemical demonstration of 3 beta-, 3 alpha, 11 beta-, and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the testis of *Fundulus heteroclitus*. General and Comparative Endocrinology 1969, 13: 189-200.
- Bardin, C.W.; Cheng, C.Y.; Mustro, N.A.; Gunsalus, G.L. The Sertoli Cell. A: Knobil, E.; Neill, J.D. (Eds.) The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, 1994. 1291-1335 pp.
- Barth, A. D.; Oko, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa (Ames): Iowa State University Press, 1989. 1-285 pp.
- Bennett, G. Radioautographic and cytochemical studies and intracellular transport of glycoproteins. Acta Histochemica, Suppl.-B XXXVI 1988, S. 9-49.
- Bennett, G. Role of the Golgi Complex in the Secretory Process. A: Cantin, M. (Eds.) Cell Biology of the Secretory Process. Basel: Karger Press, 1984. 102-147 pp.
- Bergh, A. Morphological signs of a direct effect of experimental cryptorchidism on the Sertoli cells in rats irradiated as fetuses. Biology of Reproduction 1981, 24: 145-152.
- Berndtson, W.E.; Thompson, T.L. Age as a factor influencing the power and sensitivity of experiments for assessing body weight, testis size and, spermatogenesis in rats. Journal of Andrology 1990a, 11 (4): 325-335.
- Berndtson, W.E.; Thompson, T.L. Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague-Dawley rats. Journal of Andrology 1990b, 11 (4): 429-435.
- Bonet, S.; Briz, M.D.; Fradera, A. Ultrastructural abnormalities of boar spermatozoa. Theriogenology 1993, 40: 383-396.
- Bonet, S.; Briz, M.D.; Fradera, A.. Contrastación del esperma de ganado porcino al microscopio electrónico de transmisión. Tratado de Ganado Porcino 1994, 21: 21-28.
- Bonet, S.; Briz, M.D.; Fradera, A.; Egozcue, J. Origin, development and ultrastructure of boar spermatozoa with folded tails and with two tails. Human Reproduction 1992, 7: 523-528.
- Bonet, s.; Briz, M.D.; Pinart, E.; Sancho, S.; Garcia-Gil, N.; Badia, E. Morfologia Espermática en Porcí. Morfología Espermática en Porcino. Morphology of Boar Spermatozoa. Ed. Institut d'Estudis Catalans 2000.
- Brandt, K.E.; Diekman, M.A.; Green, M.L.; Malayer, J.R. Lack of circadian rhythm in serum concentrations of melatonin in prepubertal gilts. Jorunal of Animal Reproduction 1986, (Supl. 63): 356 (abstract).
- Briz, M.D.; Bonet, S.; Pinart, E.; Egozcue, J.; Camps, R. Comparative study of sperm coming from the caput, corpus and cauda regions of epididymis. Journal of Andrology 1995, 16: 175-188.
- Brzezinska-Slebodzinska, E.; Slebozinski, A.B.; Pietras, B. i Wieczorek, G. Antioxidant effect of vitamin E and fluthathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. Biological Trace Element Research 1995, 47: 69-74.
- Buergerlt, C.D. Color Atlas of Reproductive Pathology of Domestic Animals. Mosby-Year Book, Inc. St. Louis, 1997.



- Buxadé, C.C. Ganado Porcino. Mundi Prensa. Madrid 1984. 13-148 pp.
- Calvo, A.; Pastor, L.M.; Bonet, S.; Pinart, E.; Ventura, M. Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility* 2000, 120: 325-335.
- Cameron, R.D.A. Desarrollo sexual y producción de semen en verracos. *Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura Científica* 1990, 91: 30-38.
- Cameron, R.D.A. Factors influencing semen production and quality in boars in subtropical environment. Ph D. Thesis. 1982. University of Queensland, Brisbane.
- Cameron, R.D.A.; Blackshaw, A.W. The effect of elevated ambient temperature of spermatogenesis in the boar. *Journal of Reproduction and Fertility* 1980, 59: 173-179.
- Cardoso, F.M.; Godinho, H.P. Cycle of the seminiferous epithelium and its duration in the zebu, *Bos indicus*. *Animal Reproduction Science* 1983, 5: 231-245.
- Cardoso, F.M.; Queiroz, G.F. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of brazilian hairy rams. *Animal Reproduction Science* 1988, 17: 77-84.
- Cavicchia, J.C.; Dym, M. Functional morphology of the testis. *Biology of Reproduction* 1978, 18: 1-15.
- Cavicchia, J.C.; Dym, M. Relative volume of Sertoli cells in monkey seminiferous epithelium. *American Journal of Anatomy* 1977, 150: 501-503.
- Chacón-Arellano, J.T.; Wooley, D.M. Smooth muscle cells in the testicular capsule of the horse, pig and ship. *Journal of Anatomy* 1980, 131: 263-273.
- Chiwataka, C.; Brackmann, B.; Hunt, N.; Davidoff, M.; Schulze, W.; Ivell, R. Tachykinin (substance-P) gene expression in Leydig cells of the and mouse testis. *Endocrinology* 1991, 128: 2441-2448.
- Christensen, A.K. Leydig Cells. A: *Handbook of Physiology, Vol V*, ed. Hamilton Dw, Greep RO, (Eds.) Wshington DC, American Physiological Society, 1975. 57-94 pp.
- Christensen, A.K.; Fawcett, D.W. The normal fine structure of opossum testicular interstitial cells. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1961, 9: 633-670.
- Christensen, A.K.; Gillim, S.W. The Correlation of the Fine Structure and Function in Steroid-Secreting Cells, with Emphasis on those of the Gonads. A: *The Gonads*, ed. KW McKens, Appleton Century Crofts, New York, 1969. 415-488 pp.
- Christensen, A.K.; Komorowski, T.E.; Wilson, B.; Ma, S.F.; Stevens, R.W. The distribution of serum albumin in the rat testis, studied by electron microscope immunocytochemistry on ultrathin sections. *Endocrinology* 1985, 116: 1983-1996.
- Christenson, R.K., Pope, C.E.; Zimmerman-Pope, V.A.; Day, B.N. Synchronization of estrus and ovulation in superovulated gilts. *Journal of Animal Science* 1973, 36 (5): 914-918.
- Christl, H.W. The lamina propria of vertebrate seminiferous tubules: a comparative light and electron microscopic investigation. *Andrologia* 1990, 22: 85-94.
- Clermont, Y. Cinétique de la spermatogénèse chez les mammifères. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale* 1967, 56 (Suppl. 3-4): 7-60.

- Clermont, Y. Cycle de l'épithélium séminal et mode de renouvellement des spermatogenesis chez le hamster. *Revue Canadienne de Biologie* 1954, 208-245.
- Clermont, Y. Kinetics of Spermatogenesis in Mammals: Seminiferous Epithelium Cycle and Spermatogonial Renewal. *Physiological Reviews*. Vol 52, n°1, printed in USA, 1972. 198-236 pp.
- Clermont, Y. Tang, X.M. Glycoprotein synthesis in the Golgi apparatus of spermatids during spermiogenesis of the rat. *Anatomical Records* 1985, 213: 33-43.
- Clermont, Y.; Hermo, L.; Rambourg, A.; Thorne-Tjomslund, G. Structural and Cytochemical Characteristics of the Golgi Apparatus during Formation of the Acrosomic System in Rat Spermatids. A: Hamilton, D.; Waites, G.M.H. (Eds.) *Cellular and Molecular Events in Spermiogenesis*. New York: Cambridge University Press, 1990. 17-29 pp.
- Clermont, Y.; Lalli, M.F.; Rambourg, A. Ultrastructural localization of nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase (NADPase), thiamine pyrophosphatase (Tppase) and cytidine monophosphatase (CMPase) in the Golgi apparatus of early spermatids in the rat. *Anatomical Records* 1981, 201: 613-622.
- Clermont, Y.; Leblond, C.P. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the "periodic acid-Schiff" techniques. *American Journal of Anatomy* 1955, 96: 229-254.
- Clermont, Y.; Leblond, C.P.; Messier, B. Durée du cycle de l'épithélium séminal du rat. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale* 1959, 48 bis: 37-56.
- Clermont, Y.; Oko, R.; Hermo, L. Cell Biology of Mammalian Spermatogenesis. A: Desjardins, C.; Ewing, L.L. (Eds.) *Cell and Molecular Biology of the Testis*. New York: Oxford University Press, 1993. 332-376 pp.
- Clermont, Y.; Rambourg, A. Evolution of the endoplasmic reticulum during rat spermatogenesis. *American Journal of Anatomy* 1978, 151: 191-212.
- Clermont, Y; Harvey, S.C. The duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. *Endocrinology* 1965, 76: 80-89.
- Cole, A.; Meistrich, M.L.; Trostle-Weige, P.K. Nuclear and manchette development of normal and *azh/azh* mutant mice. *Biology of Reproduction* 1988, 38: 385-401.
- Colenbrander, B.; Kemp, B. Factors affecting semen quality in the boar. *Proc. Xth Symposium de la Asociación Nacional de Porcinocultura Científica Barcelona*, 1989. 58-66 pp.
- Colenbrander, B.; Kemp, B. Factors influencing semen quality in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility (suppl.)* 1990, 40: 105-115.
- Cooper, T.G.; Keek, C.; Oberdieck, U.; Nieschlag, E. Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Human Reproduction* 1993, 8: 1251-1258.
- Coromina, E.; Casacuberta, X.; Quintana, D. El Treball de recerca. Procés d'elaboració, memòria escrita, exposició oral i recursos. Vic: Eumo Editorial, 2000.

- Dadoune, J.P.; Demoulin, A. Structure and Functions of the Testis. A: Thibault, C.; Levasseur, M.C.; Hunter, R.H.F. (Eds.) *Reproduction in Mammals and Man*. Ed. Ellipses, Paris 1993. 27-255 pp.
- Davis, J.R.; Horowitz, A.M. Effect of various exposure times to hyperthermia and hypothermia on spontaneous contractions of the adult rabbit isolated testicular capsule. *Biology of Reproduction* 1979, 21: 413-417.
- Davis, J.R.; Langford, G.A. Pharmacological studies on the testicular capsule in relation to sperm transport. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1970, 10: 495-514.
- de Kretser, D.M.; Au, C.L.; Robertson, D.M. The Physiology of Inhibin in the Male. A: Burger, H.G.; de Kretser, D.M.; Findlay, J.K.; Igarashi, M. *Inhibin Non-Steroidal Regulation of Follicle Stimulating Hormone Secretion*. Sero Symposium, Raven Press, 1987. Pp 42-149.
- de Kretser, D.M.; Kerr, J.B. The Cytology of the Testis. A: Knobil, E.; Neill, J.D. (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994. 1177-1290 pp.
- de Kretser, D.M.; Kerr, J.B. The Effect of Testicular Damage on Sertoli and Leydig Cell Function. A: de Kretser, D.M.; Burger, H.G.; Hudson, B. (Eds.) *The Pituitary and Testis. Clinical and Experimental Studies*. Berlin: Springer Verlag, 1983. 133-154 pp.
- Demoulin, A.; Mathieu, A.; Pirson, F.; Franchimont, P. Regulations paracrines des fonctions testiculaires. In: Arvis, G. *Andrologie II*, Maloine, Paris, 1989. Pp 637-667.
- Desjardins, C.; Ewing, L.L. *Cell and Molecular Biology of the Testis*. Oxford University Press, 1993. Pp 332-376.
- Diekman, M.A.; Brandt, K.E.; Green, M.L.; Clapper, J.A.; Malayer, J.R. Lack of nocturnal rise of serum melatonin in prepubertal gilts. *Domestic Animal Endocrinology* 1992, 9: 161-167.
- Dietert, S.E. Fine structure of the formation and fate of the residual bodies and degenerating germ cells and the lipid cycle in Sertoli cells in the bandicoot *Perameles nasuta* Geoffrey (Marsupalia). *Australian Journal of Zoology* 1966, 120: 317-346.
- Dobson, H.; Smith, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction?. *Animal Reproduction Science* 2000, 60-61: 743-752.
- Dym, M. Spermatogonia are regulators of the Sertoli cell function. *Proceedings-National Academy of Science USA* 1994, 91: 11287-11289.
- Dym, M. The fine structure of the monkey (*Macaca*) Sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier. *Anatomical Records* 1973, 175: 639-656.
- Dym, M. The mammalian rete testis: a morphological examination. *Anatomical Records* 1976, 186: 493-524.
- Dym, M.; Cavicchia, J.C. Functional morphology of the testis. *Biology of Reproduction* 1978, 18: 1-15.
- Dym, M.; Fawcett, D.W. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biology of Reproduction* 1971, 4: 195-215.
- Eddy, E.M.; O'Brien, D.A. The Spermatozoon. A: Knobil, E.; Neill, J.D. (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994. 29-79 pp.

- Ellis, L.C.; Buhrey, L.E.; Hargrove, J.L. Species differences in contractility of seminiferous tubules and tunica albuginea as related to sperm transport through the testis. *Archives of Andrology* 1978, 1: 139-146.
- Etlin, R.A.; Qureshi, S.R.; Perentes, E.; Christen, H.; Gschwind, R.; Buser, M.W.; Oberholzer, M. Morphological, immunohistochemical, stereological and nuclear shape characteristics of proliferative Leydig cell alterations in rats. *Path Res Pract* 1992, 188: 643-648. *Pathology Research and Practice* 1992, 188: 643-648.
- Fawcett, D.W. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biology of Reproduction* 1970, 2 (Suppl. 2): 90-127.
- Fawcett, D.W. Observations on the organization of the interstitial tissue of the testis and on the occluding cell junctions in the seminiferous epithelium. *Advances in Bioscience* 1973, 10: 83-99.
- Fawcett, D.W. The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology* 1975, 44: 394-436.
- Fawcett, D.W. *Tratado de Histología*. (11a edición) Interamericana-McGraw-Hill. 1987.
- Fawcett, D.W. Ultrastructure and function of the Sertoli cell. A: Hamilton, D.W.; Greep, R.O. (Eds.) *Handbook of Physiology*. Washington: American Physiological Society, 1975. 21-55 pp.
- Fawcett, D.W.; Neaves, E.B.; Flores, N.M. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction* 1973, 9: 500-512.
- Fawcett, D.W.; Phillips, D.M. Recent Observations on the Ultrastructure and Development of the Mammalian Spermatozoon. A: Baccetti, B. (Eds.) *Comparative Spermatozoa*. New York: Academic Press, 1970. 13-28 pp.
- Fawcett, D.W.; Phillips, D.M. The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. *Anatomical Records* 1969, 165: 153-184.
- Fingscheidt, U.; Weinbauer, G.F.; Khan, S.A.; Nieschlag, E. Follicle-stimulating hormone stimulates inhibin in the serum of the male monkeys (*Macaca mulatta*). *Acta of Endocrinology* 1990, 122: 96-100.
- Firlit, C.F.; King, L.R.; Davis, I.R. Comparative responses of the isolated human testicular capsule to autonomic drugs. *Journal of Urology* 1975, 113: 500-504.
- Flowers, W.L. Management of boars for efficient semen production. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 1997, 52: 67-78.
- Foote, R.H.; Swierstra, E.E.; Hunt, W.L. Spermatogenesis in the dog. *Anatomical Records* 1992, 173: 341-354.
- Ford, J.J.; Wise, T.H.; Lunstra, D.D. Negative relationship between blood concentrations of follicle-stimulating hormone and testicular size in mature boars. *Journal of Animal Science* 1997, 75: 790-795.
- Fouquet, J.P. Le spermiation et la formation des corpus residuels chez la hamster: role des cellules de Sertoli. *Journal of Microscopy* 1974, 19: 161-168.
- França, L.R.; Becker-Silva, S.C.; Chiarini-Garcia, H. The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). *Tissue and Cell* 1999, 31(3): 274-280.

- França, L.R.; Cardoso, F.M. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau Boar. *Tissue and Cell* 1998, 30(5): 573-582.
- França, L.R.; Ogawa, T.; Avarbock, M.R.; Brinster, R.L.; Russell, L.D. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of Reproduction* 1998, 59: 1371-1377.
- França, L.R.; Russell, L.D. The Testis of Domestic Mammals. A: Regadera, J.; Martínez-García, F. (Eds.). *Male Reproduction*. Churchill Livingstone Madrid, 1998. 197-219 pp.
- Franklin, L.E. Formation of the redundant nuclear envelope in monkey spermatids. *Anatomical Records* 1968, 161: 149-162.
- Free, M.J.; Jaffe, R.A. Dynamics of circulation in the testis of the conscious rat. *American Journal of Physiology* 1972, 223: 241-248.
- Fuentes, P.A.R.; de Serrano, G.L.; de Manzo, M.R.; Rigueiro, C.; Valle, A. Effect of season on semen traits of boars in the tropics. *Zootecnia Tropical* 1993, 10 (1): 51-64.
- Fujisawa, M.; Tanaka, H.; Tatsumi, N.; Okada, H.; Arakawa, S.; Kamidono, S. Telomerase activity in the testis of infertile patients with selected causes. *Human Reproduction* 1998, 13: 1476-1479.
- Gnessi, L.; Fabbri, A.; Spera, G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocrine Reviews* 1997, 18 (4): 541-609.
- Gordon, I. *Reproducción controlada del cerdo*. Ed. Acribia. Zaragoza, 1997. 1-59 pp.
- Gordons, J.R.; Burd, P.R.; Galli, S.J. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunology Today* 1990, 11: 458-464.
- Gottreich, A.; Hammel, I.; Yogev, L.; Terket, J. Effect of photoperiodic variation on testes and accessory sex organs in the male blind mole rat *Spalax ebrenerbergi*. *Life Science* 2000, 67: 521-527.
- Griswold, M.D. Interaction between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biology of Reproduction* 1995, 52: 211-216.
- Grootegeod, J.A.; Baarends, W.M.; Hendriksen, P.J.M.; Hoogerbrugge, J.W.; Slegtenhorst-Eegdeman, K.E.; Thermen, A.P.N. Molecular and cellular events in spermatogenesis. *Human Reproduction* 1995, 10 (Suppl. 1): 10-14.
- Guraya, S.S. *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*. Springer-Verlag, Berlin, 1987. 181-185 pp.
- Hadley, M.E. *Endocrinología*. Prentice Hall, Madrid, 1997. pp 459-479
- Haider, S.G.; Servos, G. Ultracytochemistry of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in Leydig cell precursors and vascular endothelial cells of the postnatal rat testis. *Anatomy and Embryology* 1998, 198: 101-110.
- Harcourt, A.H.; Harvey, P.H.; Larson, S.G.; Short, R.V. Testis weight, body weight and breeding systems in primates. *Nature* 1981, 293: 55-57.

- Hargrove, J.L.; Ellis, L.C. Autonomic nerves versus prostaglandins in the control of the rat and rabbit testicular contractions *in vivo* and *in vitro*. *Biology of Reproduction* 1976, 14: 651-657.
- Hecht, N.B. Gene Expression during Spermiogenesis. In: Hamilton, D.W.; Waites, G.M.H. Cellular and Molecular Events in Spermiogenesis. Cambridge University Press, 1990. 265-283 pp.
- Hecht, N.B. Post-meiotic Gene Expression During Spermiogenesis. A: Hihc, F. (Eds.) Meiotic Inhibitions: Molecular Control of Meiosis. New York: Alan R. Liss, 1988. 291-313 pp.
- Hees, H.; Kohler, J.; Leiser, R.; Hees, I.; Lips, T. Gefass-Morphologie des Rinderhodeus. Licht- und rasterelektronen mikroskopische studien. *Anatomischer Anzeiger* 1990, 170: 119-132.
- Heller, C.G.; Clermont, Y. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Progress in Hormone Research* 1964, 20: 545-575.
- Heller, C.G.; Clermont, Y. Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science* 1963, 140: 184-186.
- Hermo, L.; Clermont, Y.; Lalli, M. Intracellular pathways of endocytosed tracers in Leydig cells of the rat. *Journal of Andrology* 1985, 6: 213-224.
- Hermo, L.; Lalli, M. Monocytes and mast cells in the limiting membrane of human seminiferous tubules. *Biology of Reproduction* 1978, 19: 92-100.
- Hermo, L.; Oko, R.; Hecht, N.B. Differential post-translational modifications of microtubules in cells of the seminiferous epithelium of the rat: a light and electron microscope immunocytochemical study. *Anatomical Records* 1991, 229: 31-50.
- Hess, R.A. Spermatogenesis, Overview. A: *Encyclopedia of Reproduction* vol. 4. Academic Press, 1999. 539-545 pp.
- Hess, R.A.; Schaeffer, D.J.; Eroschenko, V.P.; Keen, J.E. Frequency of the stages in the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Biology of Reproduction* 1990, 43: 517-524.
- Hikim, A.P.; Wang, C.; Lue, Y.; Johnson, L.; Wang, X.H.; Swerdloff, R.S. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in susceptibility of germ cells to programmed cell death. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998: 152-156.
- Hoagland, T.A.; Diekman, M.A. Influence of supplemental lighting during increasing daylength on libido and reproductive hormones in prepubertal boars on growth and puberty in boars. *Journal of Animal Science* 1982, 55: 1483-1489.
- Hochereau, M.T.; Courot, M.; Ortavant, R.T. Marquage des cellules germinales du bœuf et du taureau par injection de thymidine tritiée dans l'artère spermaticque. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* 1964, 2:157-161.
- Hughes, P.; Varley, M. *Reproduction in Pigs*. Butterworths, London, 1980.
- Irons, M.J. Synthesis and assembly of connecting piece proteins as revealed by radioautography. *Journal of Ultrastructural and Research* 1983, 82: 27-34.
- Jégou, B. Spermatids are Regulators of Sertoli Cell Function. A: *The Male Germ Cell: Spermatogonium to Fertilization*. Annals of the New York Academy of Sciences 1991, 637: 340-352.

- Jégou, B. The Sertoli Cell. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1992, 6 (2): 273-311.
- Johnson, L.; Falk, G.U.; Spoede, G.E. Male Reproductive System, Nonhumans Mammals. A: *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 3. Ed. Academic Press, 1999. 49-60 pp.
- Johnson, L.; Neaves W.B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallion. *Biology of Reproduction* 1981, 24: 703-712.
- Johnson, L.; Petty, C.S.; Neaves, W.B. A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats. *Biology of Reproduction* 1980, 22: 1233-1243.
- Kandeel, F.R.; Koussa, V.K.T.; Swerdloff, R.S. Male sexual function and its disorders: physiology, pathophysiology, clinical investigation and, treatment. *Endocrine Reviews* 2001, 22 (3): 342-388.
- Kemp, B. Nutritional strategy for optimal semen production in boars. *Pig News and Information* 1991, 12: 555-558.
- Kemp, B.; Hartog, L.A. Den. Influence of energy and protein intake on the fertility of the breeding boar. *Ubersichten zur Tierernahrung* 1990, 18: 77-90.
- Kerr, J.B.; Mayberry, R.A.; Irby, D.C. Morphometric studies on lipid inclusions in Sertoli cells during the spermatogenic cycle in the rat. *Cell and Tissue Research* 1984, 236: 699-709.
- Kerr, J.F.; de Kretser, D.M. The Citology of the Human Testis. A: Burger, H.; de Kretser, D.M. (Eds.) *The Testis*. New York: Raven Press, 1981. 141-170 pp.
- Kiernan, J.A. *Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice*. Pergamon Press, UK, 1990. 433pp.
- Kliesch, S.; Behre, H.; Nieschlag, E. High efficacy of gonadotropin or pulsatile gonadotropin-releasing hormone treatment in hypogonadotropic hypogonadal men. *European Journal of Endocrinology* 1994, 131: 347-354.
- Knap, P.W. Utilización de sistemas automáticos para el control de consumo de alimento en programas nacionales de mejora genética en ganado porcino. *Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura Científica* 1997, 164: 5-22.
- Lacy, D. Light and electron microscopy and its use in the study of factors influencing spermatogenesis in the rat. *Journal of the Royal Microscopical Society* 1960, 79: 290-225.
- Lakomy, M.; Kaleczyc, J.; Majewski, M. Noradrenergic and peptidergic innervation of the testis and epididymis in the male pig. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 1997, 35: 19-27.
- Lalli, M.F.; Clermont, Y. Leydig cells and their role in the synthesis and secretion of glycoproteins. *Anatomical Records* 1975, 181: 403-404.
- Langford, G.A.; Heller, C.G. Fine structure of muscle cells of the human testicular capsule: basis of testicular contractions. *Science* 1973, 179: 573-575.
- Langford, G.A.; Silver, A. Histochemical localization of acetylcholinesterase-containing nerve fibers in the testis. *Journal of Physiology* 1974, 242: 9-10.

- Le Dividich, J. Incidencia de las condiciones de alojamiento sobre las características de reproducción en porcino. *Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura Científica* 1996, 154: 73-81.
- LeBlanc, M. Stallion infertility. *Abstracts de la V Jornada Técnica sobre el Caballo* 1993, 366-371.
- Leblond, C.P.; Clermont, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1952, 55: 548-573.
- Leblond, C.P.; Clermont, Y. Spermiogenesis of the rat, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin sulfurous acid" technique. *American Journal of Anatomy* 1952, 90: 167-215.
- Leeson, T.S. Smooth muscle in the rat testicular capsule, a developmental study. *Journal of Morphology* 1975, 147: 171-186.
- Leeson, T.S.; Cookson, F.B. The mammalian testicular capsule and its muscle elements. *Journal of Morphology* 1974, 14: 171-186.
- Levy, S.; Serre, V.; Hermo, L.; Robaire, B. The effects of aging on the seminiferous epithelium and the blood testis barrier of the Brown Norway rat. *Journal of Andrology* 1999, 20: 356-365.
- Lincoln, G.A. Seasonal Aspects of Testicular Function. A: Burger, H.G.; de Kretser, D.M. (Eds.) *The Testis*. 2<sup>nd</sup> ed., New York: Raven Press, 1989. 329-385 pp.
- Lofts, B. The Sertoli cell. *General and Comparative Endocrinology* 1972 3: 636-648.
- Loir, M.; Courtens, J.L. Nuclear reorganization in ram spermatids. *Journal of Structural and Research* 1979, 67: 309-324.
- Loir, M.; Lanneau, M. Structural function of the basic nuclear proteins in ram spermatids. *Journal of Structural and Research* 1984, 86: 262-276.
- López, J.V. Erradicación de la enfermedad de Aujeszky: aspectos operativos. *Anaporc* 1999, 194: 136-141.
- Louis, G.F.; Lewis, A.J.; Ermer, P.M.; Stroup, W.W.; Weldon, W.C.; Miller, P.S. Effect of the energy and protein intake on boar libido and semen characteristics. *Journal of Animal Science* 1992, 70 (Suppl. 1): 68.
- Lugg, J.A.; Penson, D.F.; Sadeghi, F.; Petrie, B.; Freedman, A.L.; González-Cadavid, N.F.; Hikim, A.S.; Rajfer, J. Prevention of seminiferous tubular atrophy in a naturally cryptorchid rat model by early surgical intervention. *Journal of Andrology* 1996, 17 (6): 726-732.
- Mackay, S. Gonadal development in mammals at cellular and molecular levels, *International Review of Cytology* 2000, 200: 47-99.
- Maddocks, S.; Kerr, J.B.; Allenby, G.; Sharpe, R.M. Evaluation of the role of germ cell in regulating the route of secretion of immunoreactive inhibin from the rat testis. *Journal of Endocrinology* 1992, 132: 439-448.
- Maekawa, M.; Zakama, H.; Kamikura, K.; Nagano, T. Changes in the arrangement of actin filaments in myoid cells and Sertoli cells of the rat testes during postnatal development and after experimental cryptorchidism. *Anatomical Records* 1995, 241: 59-69.



- Malmgrem, L.; Larsson, K. Semen quality and fertility after heat estress in boars. *Acta Veterinaria Scandinavia* 1984, 25: 425-435.
- Mariani, S.; Basciani, S.; Arizzi, M.; Spera, G.; Gnassi, L. PDGF and the testis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2002, 13 (1): 11-17.
- Markey, C.M.; Jequier, A.M.; Meyer, G.T.; Martin, G.B. Testicular morphology and androgen profiles following testicular inchaemia in rams. *Journal of Reproduction and Fertility* 1994, 101: 643-650.
- Martín, R.S. Influencia del verraco en los problemas de infertilidad en explotaciones porcinas. *Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura Científica* 1990a, 91: 39-50
- Martín, R.S. Problemas reproductivos asociados con anomalías al semen de verraco. *Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura Científica* 1990b, 95: 35-46.
- Martín, R.S. *Reproducción e Inseminación Artificial Porcina*. Aedos, Barcelona, 1982. 98-114 pp.
- Maseki, Y.; Miyake, K.; Mitsuya, H.; Kitamura, H.; Yamada, K. Mastocytosis occurring in the testes from patients with idiopathic male infertility. *Fertility and Sterility* 1981, 36: 814-817.
- Matilsky, M.; Battino, S.H.; Ben-ami, M.; Geslevich, Y.; Eyali, V.; Shalev, E. The effect of the ejaculatory frequency on semen characteristics of normozoospermic and oligozoospermic men from an infertile population. *Human Reproduction* 1993, 8: 71-73.
- Mauget, R. *Reproductive Biology of the European Wild Boar. A: Definition the Summer Infertility Problem in the Pig*. Seren and Mattioli Eds. Commission of European Communities, Brussels, 1987. 107-119 pp.
- Mayerhofer, A.; Bartke, A.; Amador, A.G.; Began, T. Histamine affects testicular steroid production in the golden hamster. *Endocrinology* 1989, 125: 560-562.
- Meinhardt, A.; Bacher, B.; Metz, C.N.; Bucala, R.; Wreford, N.; Lan, H.; Atkins, R.; Hedger, M.P. Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biology of Reproduction* 1998, 59: 371-378
- Meistrich, M.L. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *European Urology* 1993, 23: 136-142.
- Meistrich, M.L.; Brock, W.A.; Grimes, S.R.; Platz, R.D.; Hnilica, L.S. Nuclear protein transitions during spermatogenesis. *Federation Proceedings* 1978, 37: 2522-2525.
- Mieusset, R.; Bujan, L.; Massat, G.; Mansat, A.; Pontonnier, F. Clinical and biological characteristics of infertile men with a history of cryptorchidism. *Human Reproduction* 1995, 10: 613-619.
- Miller, S.C.; Bowman, B.M.; Roberts, L.K. Identification and characterization of mononuclear phagocytes isolated from rat testicular interstitial tissues. *Journal of Leucocyte Biology* 1984, 36: 679-687.
- Minton, J.E.; Davis, D.L.; Stevenson, J.S. Contributions of the photoperiod to circadian variations in serum cortisol and melatonin in boars. *Domestic Animal Endocrinology* 1989, 6: 177-181.
- Monesi, V. Synthetic activity during spermatogenesis in the mouse. RNA and protein synthesis. *Experimental Cell Research*. 1965, 39: 197-224.

- Morales, C.; Clermont, Y. Evolution of Sertoli cell processes invading the cytoplasm of rats spermatids. *Anatomical Records* 1982, 203: 233-244.
- Nakano, T. Three-dimensional architecture of collagen fibrils in the mouse testicular capsules. *Okajimas Folia Anatomica Japonica* 1994, 71: 203-210.
- Niemi, M.; Sharpe, R.M.; Brown, W.R.A. Macrophages in the interstitial tissue of the rat. *Cell and Tissue Research* 1986, 243: 337-344.
- Nistal, M.; Santamaria, L.; Paniagua, R. Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood. *Acta Anatomica* 1984, 119: 155-160.
- O'Brien, D.A.; Bellvé, A.R. Protein constituents of the mouse spermatozoon. II. Temporal synthesis during spermiogenesis. *Development Biology* 1980, 39: 169-182.
- Ohanian, C.; Rodríguez, H.; Piriz, H.; Martino, I.; Rieppi, G.; Garafalo, E.G.; Roca, R.A. Studies on the contractile activity and ultrastructure of the boar testicular capsule. *Journal of Reproduction and Fertility* 1979, 57: 79-85.
- Oko, R. Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1988, 39: 169-182.
- Oko, R.; Clermont, Y. Immunocytochemical analysis of the formation of the fibrous sheath and outer dense fibers in the seminiferous epithelium of the rat. *Anatomical Records* 1989, 225: 46-55.
- Oko, R.; Clermont, Y. Mammalian Spermatozoa: Structure and Assembly of the Tail. A: Gagnon, C. (Eds.) *Controls of Sperm Motility*. Boca Raton: CRC Press, 1990. 3-29 pp.
- Okwun, O.E.; Igboeli, G.; Ford, J.J.; Lunstra, D.D.; Johnson, L. Number and function of Sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three breeds of boar. *Journal of Reproduction and Fertility* 1996, 107: 137-149.
- Olson, G.E.; Sammons, D.W. Structural chemistry of outer dense fibers of rat sperm. *Biology of Reproduction* 1980, 22: 319-332.
- Olvik, N.M.; Dahl, E.; Stage-dependent variation in volume density and size of Sertoli cell vesicles in the rat testis. *Cell and Tissue Research* 1981, 221: 311-320.
- Onyango, D.W.; Wango, E.O.; Otiang'a-Owiti, G.E.; Oduor-Okelo, D.; Werner, G. Morphological characterization of the seminiferous cycle in the goat (*Capra hircus*): a histological and ultrastructural study. *Annals of Anatomy* 2000, 182: 235-241.
- Osorio, F.A. Pathogenesis of PRRSV infections. Immunopathogenesis of PRRSV. First Global Virtual Conference on Swine Health, May 08 to June 19, 2001 (via internet).
- Otani, H.; Tanaka, O.; Kasai, K.-I.; Yoshioka, T. Development of mitochondrial helical sheath in the middle piece of the mouse spermatid tail: Regular dispositions and synchronized changes. *Anatomical Records* 1988, 222: 26-33.
- Parvinen, M.; Jokelainen, P.T. Rapid movements of the chromatoid body in living early spermatids of the rats. *Biology of Reproduction* 1974: 11: 85-92.
- Paula, T.A.R.; Chiarini-Garcia, H.; França, L.R. Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Tissue and Cell* 1999, 31(3): 327-334.

- Pawar, H.S.; Wrobel, K.H. The Sertoli cell of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) during spermatogenic cycle. *Cell and Tissue Research* 1991, 265: 45-30.
- Pérez, M.C. Producción espermática. *Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura Científica* 1991, 104: 4-11.
- Petersen, P.M.; Giwercman, A.; Hansen, S.W.; Berthelsen, J.G.; Daugaard, G.; Rorth, M.; Skakkebaek, N.E. Impaired testicular function in patients with carcinoma-in-situ of the testis. *Journal of Clinical Oncology* 1999, 17: 173-179.
- Phillips, D.M. Spermogenesis. London: New York Academic Pres, 1974.
- Phillips, D.M. Ultrastructure of the woolly opossum, *caluromys philander*. *Journal of Ultrastructure and Research* 1970, 33: 381-397.
- Pinart, E.; Bonet, S.; Briz, M.D.; Pastor, L.M.; Sancho, S.; Garcia, N.; Badia, E. Morphological and histochemical characteristics of the lamina propria of scrotal and abdominal testes from postpuberal boars: correlation with seminiferous epithelium appearance. *Journal of Anatomy* 2001a, 199:435-448.
- Pinart, E.; Bonet, S.; Briz, M.D.; Pastor, L.M.; Sancho, S.; Garcia, N.; Badia, E.; Bassols, J. Lectin affinity of the seminiferous epithelium in healthy and cryptorchid post-puberal boars. *International Journal of Anatomy* 2001b, 24: 153-164.
- Pinart, E.; Camps, R.; Briz, M.; Bonet, S.; Egozcue, J. Unilateral spontaneous abdominal cryptorchidism: structural and ultrastructural study of sperm morphology. *Animal Reproduction Science* 1998, 49: 247-268.
- Pinart, E.; Sancho, S.; Briz, M.; Bonet, S. Morphologic study of the testes from spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchid boars. *Journal of Morphology* 1999a, 239: 225-243.
- Pinart, E.; Sancho, S.; Briz, M.; Bonet, S.; Badia, E. Efficiency of the process of meiosis in scrotal testes of healthy boars and unilateral abdominal cryptorchid boars. *Teratology* 1999b, 60: 209-214.
- Pinart, E.; Sancho, S.; Briz, M.; Bonet, S.; Garcia, N.; Badia, E. Ultrastructural study of the boar seminiferous epithelium: changes in cryptorchidism. *Journal of Morphology* 2000, 244: 190-202.
- Pinart, E.; Sancho, S.; Briz, M.; Bonet, S.; Garcia, N.; Badia, E. Cytology of the interstitial tissue in scrotal and abdominal testes of postpuberal boars. *Tissue and Cell* 2001c, 33: 8-24.
- Plant, T.M.; Marshall, G.R. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in the male primates. *Endocrine Reviews* 2001, 22 (6): 764-786.
- Ploen, L.; Titzén, E.M. Fine Structural Features of Sertoli Cells. A: van Berkomp, J.; Motta, P.M. (Eds.) *Ultrastructure of Reproduction*. Boston: Martinus Nijhoff, 1984. 67-74 pp.
- Pöllänen, P.; Maddocks, S. Macrophages, lymphocytes and MHCII antigen in the ram and the rat testis. *Journal of Reproduction and Fertility* 1988, 82: 437-445.
- Prieto, C.; Castro, J.M. Síndrome reproductivo y respiratorio porcino: aspectos más importantes de la enfermedad. Parte II. *Anaporc* 1998, 176: 17-32.

- Prince, F.P. Mitochondrial cristae diversity in human Leydig cells: a revised look at cristae morphology in these steroid-producing cells. *The Anatomical Records* 1999, 254: 534-541.
- Print, C.G.; Loveland, K.T. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays* 2000, 22: 423-430.
- Puigvert, X.; Soler, J.; Tibau, J. Eficiència reproductiva en ganado porcino selecto: efecto del sistema de testaje i del tipo genético. *Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura Científica* 1997, 166: 30-45.
- Rauchenwald, M.; Steers, W.D.; Desjardins, C. Efferent innervation of the rat testis. *Biology of Reproduction* 1995, 52: 1136-1143.
- Rigo, A.; Genescà, G. Tesis i treballs. Aspectes formals. Vic: Eumo Editorial, 2000.
- Rikimaru, A.; Maruyama, T.; Shirai, M.; Dendo, I. Pressure recording of contraction of the dog testis. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 1972, 108: 305-306.
- Roser, J.F.; Hughes, J.P. Seasonal effect on seminal quality, plasma hormone concentrations, and GnRH-induced LH response in fertile and subfertile stallions. *Journal of Andrology* 1992, 13 (3): 214-223.
- Ross, M.R.; Dobler, J. The Sertoli cell junctional specialization and their relationship to the germinal epithelium as observed after efferent ductule ligation. *Anatomical Research* 1975, 183: 267-292.
- Russell; L.D.; Ettlin, R.A.; Sinha Hikim, A.P.; Clegg, E.D. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Clearwater, Florida, 1990.
- Sánchez, M.; Andrés-Trelles, F.; Hidalgo, A. Effects of vanadate in testicular capsule of the rat. *General Pharmacology* 1991, 22: 499-503.
- Sánchez, M; Cereza, J.M.; García, M. Influencia de las condiciones ambientales en la fertilidad del verraco. *Proc. Xth Sym. Asociación Nacional de Porcinocultura Científica* 1989. 67-73 pp.
- Sancho, S. Efectes del fotoperíode sobre la qualitat seminal de mascles reproductors porcíns de raça Landrace. Tesis. Girona, 2002.
- Schlatt, S.; Meinhardt, A.; Nieschlag, E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *European Journal of Endocrinology* 1977, 137: 107-117.
- Schteingart, H.F; Meroni, S.B.; Canepa, D.F.; Pellizzari, E.H.; Cigorraga, S.B. Effect of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor lactate production, gamma-glutamyl transpeptidase and aromatase activity in cultured Sertoli cells. *European Journal of Endocrinology* 1999, 141: 539-545.
- Schulze, C. On the morphology of the human Sertoli cell. *Cell and Tissue Research* 1974, 153: 339-355.
- Schulze, C. Sertoli cells and Leydig cells in man. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology* 1984, 88: 1-104.
- Séculi; J.; Perello, B.; Cordero, M.; Sánchez, C. *Patología y Clínica del Ganado Porcino*. Monografías Neosan, Barcelona, 1980.

- Seitz, J.; Möbius, J.; Bergmann, M.; Meinhardt, A. Mitochondrial differentiation during meiosis of male germ cells. *International Journal of Andrology* 1995, 18 (Suppl. 2): 7-11.
- Setchell, B.P. Male reproductive organs and semen. A: Cupps, P.T. (Eds) *Reproduction and Domestic Mammals*. Academic Press, Inc. San Diego, California, 1991. 221-249 pp.
- Setchell, B.P. *The Mammalian Testis*. London: Elek Books and Ithaca: Cornell University Press, 1978. 359-378 pp.
- Setchell, B.P.; Cox, J.E. Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood. *Journal of Reproduction and Fertility* 1982; Suppl. 32: 123-127.
- Setchell, B.P.; Laurie, M.S.; Flint, A.P.F.; Heap, R.B. Transport of free conjugated steroids from the boar testis in lymph, venous blood and rete testis fluid. *Journal of Endocrinology* 1983, 96: 127-136.
- Setchell, B.P.; Maddocks, S.; Brooks, D.E. Anatomy, Vasculature, Innervation and Fluids of the Male reproductive Tract. A: Knobil, E.; Neill, J.D. (Eds) *The Physiology of Reproduction*. Vol 1. New York: Raven Press, 1994. 1063-1291 pp.
- Sharpe, R.M. Regulation of Spermatogenesis. A: Knobil, E.; Neil, J.D. (Eds) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994. 1363-1434 pp.
- Silber, S.J.; Nagy, Z.; Devroey, P.; Tournaye, H.; Van Steirteghem, A.C. Distribution of spermatogenesis in the testes of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. *Human Reproduction* 1997, 12: 2422-2428.
- Skinner, M.K. Cell-cell interaction in the testis. *Endocrine Reviews* 1991, 12: 45-77.
- Smith, C.E.; Hermo, L.; Fazel, A.; Lalli, M.F.; Bergeron, J.J.M. Ultrastructural distribution of the NADPase within the Golgi apparatus and lysosomes of mammalian cells. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 1990, 21/3: 1-124.
- Sosnik, H. Quantitative investigations on the topography of twelve structural elements of the male gonad. *Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch* 1986, 132: 154-169.
- Sosnik, H. Studies on the participation of the tunica albuginea and the rete testis (TA and RT) in the quantitative structure of the human testis. *Gegenbaurs Morphogisches Jahrbuch* 1985, 131: 347-356.
- Sowerbutts, S.F.; Jarvis, L.G.; Setchell, B.P. The increase in testicular vascular permeability induced by human chorionic gonadotrophin involves 5-hydroxytryptamine and possibly oestrogens, but not testosterone, prostaglandins, histamine or bradykinin. *Australian Journal of Experimental Medicine Science* 1986, 64: 137-147.
- Spiteri-Grech, J.; Nieschlag, E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis-a review. *Journal of Reproduction and Fertility* 1993, 98: 1-14.
- Sprando, R.L.; Collins, T.F.X.; Black, T.N.; Olejnik, N.; Rorie, J.I.; Bowers, J.D.; Sass, N.; Robl, N. Light microscopic observations on the reproductive tract of the male sand rat, *Psammomys obesus*. *Tissue and Cell* 1999, 31: 99-115.
- Sprando, R.L.; Collins, T.F.X.; Wiesenfeld, P.; Babu, U.S.; Rees, C.; Black, T.; Olejnik, N.; Rorie, J. Testing of the potential of flaxseed to affect of spermatogenesis: morphometry. *Food and Chemical Toxicology* 2000, 38: 887-892.

- Steinberger, A.; Steinberger, E. Testicular Development, Structure and Function. New York: Raven Press 1980.
- Suda, Z.; Cerbito, W.A.; Oguri, N.; Matsuzawa, T.; Oka, H.; Sato, K. The principal component analysis on the histological observation in the testes of young colts. Bulletin Equine Research Institute Tokyo 1992, 29: 26-31.
- Susi, F.R.; Clermont, Y. Fine structural modifications of the rat chromatoid body during spermiogenesis. American Journal of Anatomy 1970, 129: 177-192.
- Suswillo, R.F.L.; Watson, P.F. A new light microscopy classification of spermatogenesis in the bull and the boar. Applicable to tissues processed for electron microscopy. Anatomia Histologia Embryologia 1990, 19: 326-339.
- Suvanto, O.; Kormano, M. Effect of experimental cryptorchidism and cadmium injury on the spontaneous contractions of the seminiferous tubules of the rat testis. Virchows Archiv Abteilung B Cell-pathology 1970a, 4: 217-224.
- Suvanto, O.; Kormano, M. The relation between *in vitro* contractions of the rat seminiferous tubules and the cyclic stage of the seminiferous epithelium. Journal of Reproduction and Fertility 1970b, 21: 227-232.
- Swierstra, E.E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar. Duration of the spermatozoon transit through the epididymis. Anatomical Records 1968, 161: 171-186.
- Swierstra, E.E.; Gebaner, M.R.; Pickett, B.W. Spermatogenesis in Mammals. Journal of Reproduction and Fertility 1974: 40: 113-120.
- Takeda, K.; Hatamochi, A.; Veki, H. Increased number of mast cells accompany enhanced collagen synthesis in linear localised scleroderma. Archives of Dermatological Research 1989, 281: 288-290.
- Tang, X.M.; Lalli, M.F.; Clermont, Y. Cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. American Journal of Anatomy 1982, 163: 283-294.
- Thorne-Tjomsland, G.; Clermont, Y.; Hermo, L. Contributions of the Golgi apparatus components to the formation of the acrosomic system and chromatoid body in rat spermatids. Anatomical Records 1988, 221: 591-598.
- Tindall, D.J.; Rowley, D.R.; Murthy, L.; Lipshultz, L.I.; Chang, C.H. Structure and biochemistry of the Sertoli cell. International Review of Cytology 1985, 94: 127-149.
- Toyama, Y.; Maekawa, M.; Kadomatzu, K.; Miyauchi, T.; Muramatsu, T.; Yuasa, S. Histological characterization of spermiogenesis in mice lacking the basigin gene. Anatomia Histologia Embriologia 1999, 28: 205-213.
- Trainer, T.D. Histology of the normal testis. American Journal of Surgery and Pathology 1987, 11: 797-809.
- Trainer, T.D. Testis and Excretory Duct System. A: Stenberg, S.S. (Eds) Histology of Pathologist. New York: Raven Press, 1992. 731-747 pp.
- Trudeau, V.; Sandford, L.M. Efecto de la estación y del entorno social sobre el tamaño del testículo y sobre la calidad del semen de verracos Landrace adultos. Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura Científica 1989, 79: 73-83.

- Ueno, H.; Mori, H. Morphological analysis of the Sertoli cell ultrastructure during the seminiferous epithelial cycle in rats. *Biology of Reproduction* 1990, 43: 769-776.
- Ueno, H.; Nishimune, Y.; Mori, H. Cyclic localization of Golgi apparatus in Sertoli cells induced by mature spermatids in rats. *Biology of Reproduction* 1991, 44: 656-662.
- van Haaster, L.H.; de Rooij, D.G. Spermatogenesis is accelerated in the immature Djungarian and chinese hamster and rat. *Biology of Reproduction* 1993, 49: 1229-1235.
- Veeramachaneni, D.N.R. Deteriorating trends in male reproduction: idiopathic or environmental?. *Animal Reproduction Science* 2000, 60-61: 121-130.
- Verhoeven, G.; Hoeben, E. Les cellules p ritubulaires. *M dicine/Sciences* 1995, 11: 601-611.
- Vogl, A.W.; Linck, R.W.; Dym, M. Colchicine-induced changes in the cytoskeleton of the golden mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) Sertoli cells. *American Journal of Anatomy* 1983, 168: 99-108.
- Vogl, A.W.; Soucy, L.J.; Foo, V. Ultrastructure of Sertoli cells penetrating processes found in germ cells of the golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*). *American Journal of Anatomy* 1985, 172: 75-86.
- Webb, A.J. Future challenges in pigs genetics. *Animal Breeding Abstracts* 1995, 63 (10): 731-736.
- Weber, J.E.; Russell, L.D. A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat. *American Journal of Anatomy* 1987, 180: 1-24.
- Weinbauer, G.F.; Behre, H.M.; Fingscheidt, U.; Nieschlag, E. Human follicle stimulating hormone exerts a stimulatory effect on spermatogenesis, testicular size and serum inhibin levels in the gonadotropin-releasing hormone antagonists-treated non-human primates (*macaca fascicularis*). *Endocrinology* 1991, 129: 1831-1839.
- Weinbauer, G.F.; Wessels, J. Paracrine control of spermatogenesis. *Andrologia* 1999, 31: 249-262.
- Wing, T.Y.; Christensen, A.K. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *American Journal of Anatomy* 1982, 165: 13-25.
- Wrobel, K.H.; Brandl, B. The autonomous innervation of the porcine testis in the period from birth to adulthood. *Annals of Anatomy* 1998, 180: 145-156.
- Wrobel, K.H.; Dellman, H.D. *Sistema Reprodutor Masculino. A: Dellman, H.D.; Eurel. Textbook of Veterinary-Histology 5<sup>th</sup>. Baltimore USA: Ed Williams and Wilkins, 1998. pp 245-267.*
- Wrobel, K.H.; Moustafa, M.N.K. On the innervation of the donkey testis. *Annals of Anatomy* 2000, 182: 13-22.
- Wrobel, K.H.; Reichold, J.; Schimmel, M. Quantitative morphology of the bovine seminiferous epithelium. *Annals of Anatomy* 1995, 177: 19-32.
- Wrobel, K.H.; Schimmel, M. Morphology of the bovine Sertoli cell during the spermatogenic cycle. *Cell and Tissue Research* 1989, 257: 93-103.
- Xiong, Y.; Hales, D.B. The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the regulation of mouse Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1993, 132: 2438-2444.

- Yazawa, E.; Lunstra, D.; Wise, T.; Kinder, J.; Ford, J. Testicular morphology and function in boars differing in concentrations of plasma follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction* 1999, 60: 115-118.
- Young, K.A.; Zirkin, B.R.; Nelson, R.J. Testicular regression in response to food restriction and short photoperiod in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) is mediated by apoptosis. *Biology of Reproduction* 2000, 62: 347-354.
- Zamboni, L.; Stefanini, M. The fine structure of the neck of mammal spermatozoa. *Anatomical Records* 1970, 169: 155-172.
- Zanella, E.; Lunstra, D.; Wise, T.; Kinder, J.; Ford, J. Testicular morphology and function in boars differing in concentrations of plasma follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction* 1999, 60: 115-118.