

# Determinación de la proliferación celular y caracterización de las células de Sertoli del testículo de dorada *Sparus auratus* Linnaeus, 1758

E. Chaves Pozo, V. Mulero, J. Meseguer y A. García Ayala

Departamento de Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. E-30100 Murcia, España. Correo electrónico: echaves@um.es

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

## RESUMEN

Se han caracterizado las células de Sertoli del testículo de dorada, *Sparus auratus* Linnaeus, 1758, utilizando anticuerpos monoclonales que previamente han sido obtenidos en nuestro laboratorio. Se han obtenido suspensiones celulares testiculares que han sido estudiadas mediante microscopía óptica y analizadas mediante citometría de flujo. Se ha determinado el estado de proliferación celular testicular mediante el tratamiento de los ejemplares con 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) y su posterior detección con una técnica inmunocitoquímica indirecta.

**Palabras clave:** BrdU, testículo, peces, cultivo celular.

## ABSTRACT

*Determination of testicular cell proliferation and characterization of Sertoli cells in testes of the gilthead seabream Sparus auratus Linnaeus, 1758*

*Testicular Sertoli cells in the gilthead seabream Sparus auratus Linnaeus, 1758 were characterized with antibodies previously obtained in our laboratory. Testicular cell suspensions were studied using light microscopy and flow cytometry. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) was used to analyse the proliferation of testicular cells, which were later detected with an indirect immunohistochemical technique.*

**Keywords:** BrdU, testes, fish, cell culture.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe un gran interés por conocer el proceso de regulación de la espermatogénesis en peces, más concretamente en teleósteos y, de modo especial, en las especies utilizadas en cultivo industrial. Para determinar los mecanismos que intervienen en esta regulación, se están desarrollando métodos de estudio in vitro mediante cultivo de órganos (Miura *et al.*, 1995; Nader *et al.*, 1999) y mediante cultivos celulares (Loir, 1989,

1994; Dubois y Callard, 1991, 1993; Miura *et al.*, 1991, 1996). La obtención de suspensiones celulares testiculares en las que se pueda inducir la espermatogénesis permitiría el estudio de los mecanismos reguladores de este proceso. Previamente, y con fines comparativos, es necesario caracterizar las células testiculares y determinar el estado de maduración o de desarrollo de los testículos.

La dorada, *Sparus auratus* Linnaeus, 1758, es una especie hermafrodita protándrica que alcanza su madurez sexual como macho normalmente duran-

te el segundo año de vida. La maduración sexual se realiza de septiembre a octubre, mientras que la puesta ocurre en los meses de noviembre a diciembre. La involución gonadal se realiza de enero a abril manteniéndose los ejemplares en reposo sexual hasta septiembre, cuando comienza una nueva etapa. El testículo de teleósteos está formado por túbulos rodeados por una capa muy fina de tejido conjuntivo que está constituido por fibroblastos, células de Leydig, vasos sanguíneos y nervios. La luz de estos túbulos se comunica con el conducto deferente de la gónada. Los túbulos están formados por quistes espermatogénicos que están constituidos por células de Sertoli y células germinales (Nagahama, 1983; Pudney, 1995).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales

Se han utilizado ejemplares de dorada con un peso comprendido entre 100 y 200 gramos procedentes de Culmarex S. A. (Águilas, Murcia) que se mantuvieron en acuarios provistos de un circuito cerrado de agua con un caudal de 1 500 l/h, una temperatura de  $20 \pm 1$  °C, una salinidad de 22 y fotoperiodo natural. Los peces se alimentaron con pienso comercial (ProAqua, Palencia).

### Microscopía óptica

Las gónadas se fijaron por inmersión en líquido de Bouin, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y se incluyeron en parafina (Paraplast Plus) utilizando acetato de amilo como líquido intermediario. Se obtuvieron secciones de 4-5  $\mu\text{m}$  de espesor que se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómico de Mallory.

### Suspensiones celulares

Las gónadas se lavaron en medio de cultivo RPMI con 0,35 % de NaCl y 1 % de albúmina de suero bovino (BSA) y se digirieron enzimáticamente con colagenasa (0,1 %) y tripsina (0,05 %) en medio de cultivo RPMI con 0,35 % de NaCl y 1 % de BSA.

### Obtención de anticuerpos monoclonales

Se utilizaron ratones Bal-C inmunizados con suspensiones celulares testiculares. Los ratones se inyectaron tres veces con  $7 \times 10^6$  células, siendo las inyecciones administradas cada 15 días. A continuación, los ratones se sacrificaron y se les extrajo el bazo, cuyas células se fusionaron con células de mieloma utilizando polietilenglicol (PEG) y los híbridos obtenidos se cultivaron en medio con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT).

### Citometría de flujo

Se obtuvieron suspensiones testiculares como anteriormente se ha descrito y se fijaron en formaldehído al 10 % en tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente se utilizaron para su análisis mediante citometría de flujo y para la selección de los anticuerpos monoclonales obtenidos. Para ello se incubaron con 100 ml de medio condicionado, procedente de los cultivos de los clones obtenidos, durante 30 minutos. Posteriormente, las suspensiones celulares se lavaron tres veces en PBS con 2 % de suero bovino fetal (SBF) y 0,05 % de azida sódica y se incubaron con un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína. A continuación, se lavaron tres veces y se resuspendieron en PBS con 2 % de SBF y 0,05 % de azida sódica.

### Inmunocitoquímica para microscopía óptica

Se utilizó para determinar la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos. Para ello se usaron secciones de gónada fijadas en Bouin, las cuales se incubaron con uno de los anticuerpos monoclonales obtenidos, como primer anticuerpo. Como segundo anticuerpo se utilizó una inmunoglobulina anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano. La actividad peroxidasa se visualizó utilizando 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorhídrico (DAB) diluida al 0,05 % en tampón tris-HCl con peróxido de hidrógeno al 0,01 % durante 15 minutos. Para una mejor localización de la inmunorreacción, las secciones se contrastaron ligeramente con hematoxilina. Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda.

## Proliferación celular

Los ejemplares objeto de estudio se inyectaron con 50 mg de BrdU/kg de peso corporal, dejando un tiempo de incubación de seis horas. Durante este tiempo, el BrdU es incorporado en el ADN de aquellas células que se encuentran en la fase S del ciclo celular. Posteriormente, se obtuvieron los testículos que se procesaron para microscopía óptica como ha sido descrito. La detección del BrdU se llevó a cabo mediante una técnica inmunocitoquímica indirecta. Para ello se incubaron secciones de gónada con un suero anti-BrdU, como primer anticuerpo, continuando la técnica como anteriormente se ha descrito.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las gónadas de los ejemplares utilizados en este estudio están formadas por una porción de ovario y otra de testículo. En el testículo presentan una espermatogénesis activa observándose quistes de distinto estado de desarrollo y, por tanto, formados por los distintos tipos celulares de la serie germinal: espermatogonias, espermatoцитos y espermátidas, distinguiéndose las células de Sertoli en sus paredes. Los espermatozoides ya liberados de los quistes se observan en la luz de los túbulos y en el

conducto deferente (figura 1). Esta estructura es similar a la descrita en otras especies de teleósteos (Nagahama, 1983; Pudney, 1995).

Las células del testículo de dorada que presentan una proliferación celular activa son: las células de Sertoli, las espermatogonias que se encuentran en mitosis y los espermatoцитos I que sufren la primera división meiótica (figura 2). Sin embargo, los espermatoцитos II no pueden ser detectados con la técnica utilizada en este estudio puesto que no entran en fase S antes de la segunda división meiótica. A diferencia de lo que ocurre en los mamíferos, en los condrictios y teleósteos las células de Sertoli mantienen la capacidad de dividirse en ejemplares adultos, permitiendo así el crecimiento de los quistes a lo largo del proceso espermatogénico (Billard, 1969; Callard *et al.*, 1989). La división de las células de Sertoli se produce de forma alternativa a la de las células germinales que albergan, por lo que nunca se encuentran quistes BrdU positivos para ambos tipos celulares (figura 2).

Las células de Sertoli de dorada que se encuentran en división sólo se localizan en quistes que contienen espermatoцитos I, o en aquellos que contienen células anteriores en el proceso de espermatogénesis (espermatogonias), como ha sido descrito en *Poecilia reticulata* Peters, 1859 (Billard, 1969), mientras que en *Squalus acanthias* Linnaeus, 1758 se ha descrito que las células de Sertoli sólo se

Figura 1. Vista general de una sección de testículo de dorada. Se observan quistes espermatogénicos en distinto estado de desarrollo. Hematoxilina - eosina. [× 40.]

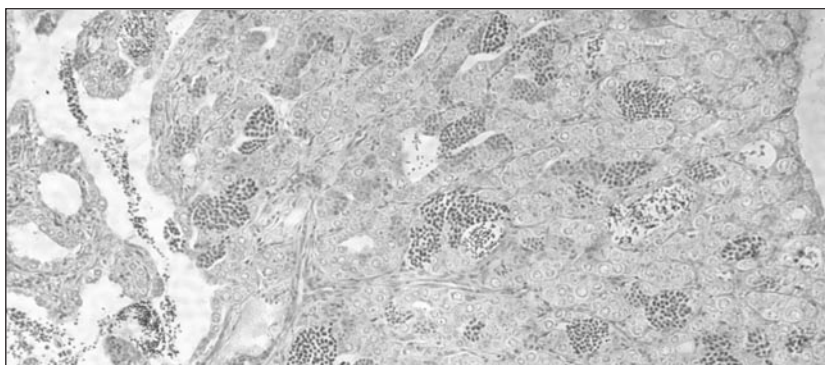
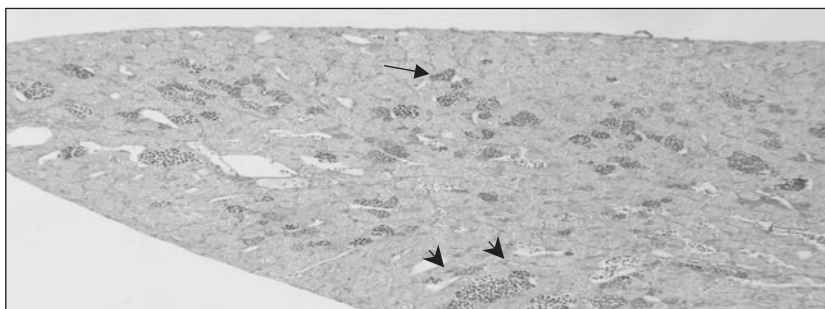


Figura 2. Vista general de una sección de testículo de dorada en la que se observan espermatogonias y espermatoцитos I BrdU positivos (flecha), no siendo reactivas las células de Sertoli que los albergan, y células de Sertoli BrdU positivas (punta de flecha) que rodean espermatogonias y espermatoцитos I BrdU negativos. Técnica inmunocitoquímica indirecta; anti-BrdU. [× 40.]



dividen durante las primeras nueve divisiones mitóticas de las espermatogonias (Callard *et al.*, 1989). Estos resultados sugieren que antes de que las células germinales entren en la primera división meiótica, el quiste ya ha alcanzado su tamaño máximo a pesar de que el número de células germinales dentro del quiste se incrementa posteriormente como consecuencia de la meiosis.

Las células testiculares en suspensión se diferencian por su tamaño cuando se observan con el microscopio de contraste de fase (Winkoop y Timmermans, 1990), ya que las células de la serie germinal disminuyen de tamaño a medida que progresa la espermatogénesis. El análisis mediante citometría de flujo de estas suspensiones celulares determinó la existencia de tres poblaciones celulares diferentes, en función de su tamaño y complejidad estructural o cantidad de orgánulos celulares. Se determinó la existencia de una población celular de gran tamaño y complejidad estructural intermedia (R1) y dos poblaciones celulares de pe-

queño tamaño, una de muy poca complejidad (R2) y otra de complejidad mayor (R3) (figura 3).

De los anticuerpos monoclonales obtenidos se seleccionaron, mediante citometría de flujo, aquellos que reaccionaban con alguna de las tres poblaciones celulares testiculares que se pueden separar dependiendo de la complejidad estructural y el tamaño celular. Uno de los anticuerpos seleccionados (TD7) reacciona específicamente con las células de Sertoli en las paredes de los quistes (figura 4).

## AGRADECIMIENTOS

Fundación Séneca (Murcia). Proyecto PB 98-0837. Ministerio de Educación y Cultura. Programa Sectorial de Promoción General del Conocimiento. Empresa Culmarex S. A.

## BIBLIOGRAFÍA

- Billard, R. 1969. La spermatogénèse de *Poecilia reticulata* I. Estimation du nombre de générations goniales et rendement de la spermatogénèse. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 9: 251-271.
- Dubois, W. y G. V. Callard. 1991. Culture of intact Sertoli/germ cell units and isolated Sertoli cells from *Squalus* testis. I. Evidences of stage-related functions *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 258: 359-372.
- Dubois, W. y G. V. Callard. 1993. Culture of intact Sertoli/germ cell unit and isolated Sertoli cells from *Squalus* testis. II. Stimulatory effects of insulin and IGF-I on DNA synthesis in premeiotic stages. *J. Exp. Zool.* 267: 233-244.
- Callard, G., P. Mak, W. DuBois y M. E. Cuevas. 1989. Regulation of spermatogenesis: the shark testis model. *J. Exp. Zool.* 2: 23-34.
- Loir, M. 1989. Trout Sertoli cells and germ cells in primary culture: I. Morphological and ultrastructural study. *Gamete Res.* 24: 151-169.
- Loir, M. 1994. *In vitro* approach to the control of spermatogonia proliferation in the trout. *Mol. Cell. Endo.* 102: 141-150.
- Miura, T., K. Yamauchi, H. Takahashi y Y. Nagahama. 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in*

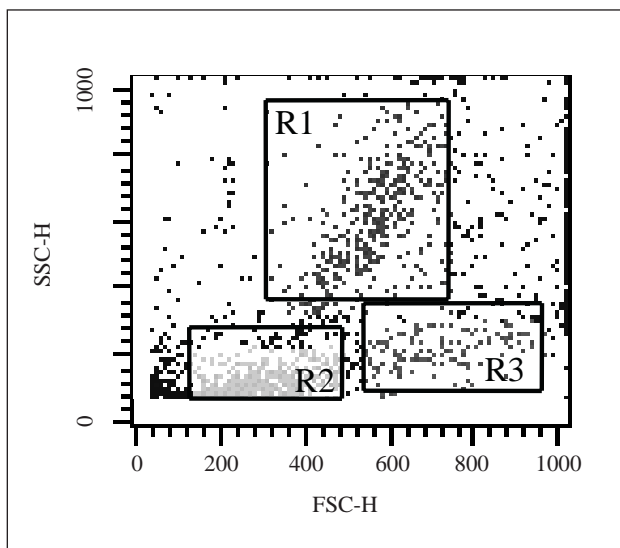


Figura 3. Análisis de una suspensión celular testicular mediante citometría de flujo donde se observan tres poblaciones celulares diferentes (R1, R2, R3) según el tamaño celular (FSC-H) y la complejidad estructural celular (SSC-H).

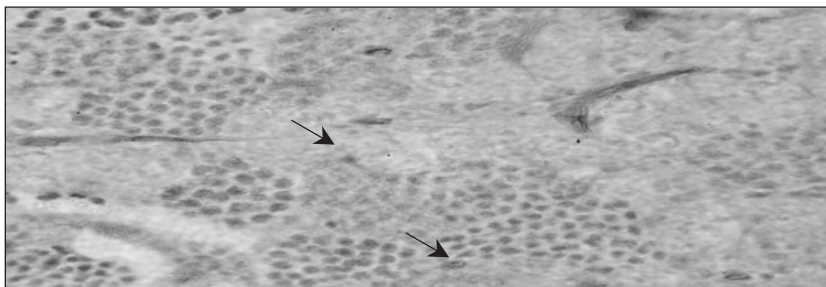


Figura 4. Detalle de una sección testicular en la que se observan células de Sertoli inmunomarcadas (flecha) en la pared de un quiste espermatogénico. Técnica inmunocitoquímica indirecta; suero TD7. [× 200.]

- in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5774-5778.
- Miura, T., C. Miura, K. Yamauchi y Y. Nagahama. 1995. Human recombinant activin induces proliferation of spermatogonia *in vitro* in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science* 61: 434-437.
- Miura, C., T. Miura, M. Yamashita, K. Yamauchi y Y. Nagahama. 1996. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in germ-somatic cell coculture from immature Japanese eel testis. *Develop. Growth Differ.* 38: 257-262.
- Nader, M. R., T. Miura, N. Ando, C. Miura y K. Yamauchi. 1999. Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates all stages of 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in the Japanese Eel, *Anguilla japonica*, *in vitro*. *Biol. Reprod.* 61: 944-947.
- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. En: *Fish Physiology*. W. S. Hoar, D. J. Randall y E. M. Donaldson (eds.) 4: 223-264. Academic Press, Inc. Londres.
- Pudney, J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Techniq.* 32: 459-497.
- Winkoop, A. y L. P. M. Timmermans. 1990. Surface location and stage-specificity of differentiation antigens on germ cells in the common carp (*Cyprinus carpio*), as revealed with monoclonal antibodies and immunogold staining. *Histochemistry* 95: 77-85.