



Tesis para obtener el Título de Doctor

**Dos capas independientes de
miofilamentos constituyen el
aparato contráctil de las células
mioides peritubulares del
testículo de rata**

**Presentada a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la
Universidad de Buenos Aires**

Lic. En Biología Molecular

Antonella @ Lacina

Diciembre 2014

Tesis dirigida por Luis Alberto López, PhD

Directora Adjunta:

Alfonsina Morales, PhD

Consejera de Estudios:

Ana María Puyó, PhD

Agradecimientos

A CONICET por darme la posibilidad de acceder a una beca que abrió caminos hacia un mayor crecimiento profesional.

Al Dr. Luis López, por darme el espacio en su laboratorio y el apoyo necesario para que pueda llevar a cabo estos 5 años de investigación, por las observaciones y sugerencias que guiaron este aprendizaje.

A la Dra. Alfonsina Morales, por inculcarme el amor y la pasión por el mundo microscópico, por alimentar mi espíritu crítico y por regalarme tantos años de amistad, mates y risas que le pusieron un condimento especial a este trabajo. Siempre es un placer planear cada experimento. Gracias por el apoyo incondicional y por darme el empujón para seguir avanzando profesionalmente.

A la Dra. Ana María Puyó, por su excelente predisposición para colaborar en la recta final de este doctorado a pesar de la distancia.

A los miembros del Instituto de Histología y Embriología, por transformar el lugar de trabajo en un segundo hogar, por los consejos de pasillo que fueron muy útiles en los experimentos aventureros. Gracias por confiar en mi trabajo y por darme el apoyo para que continúe formando parte de esta gran familia científica.

A mis antiguas compañeras de laboratorio que hoy son grandes amigas: Celina, Victoria y Valeria, por compartir tantos años juntas, por los miles de consejos y los hermosos momentos que se transformaron en un motivo más por el que daba gusto ir a trabajar.

Al grupo Chiru: Paula, Sergio B. y Stefania, por las risas cotidianas, las palabras de aliento y por ser el incentivo en este último tramo.

A Nadia, Laila, Mariana, Renata, Carolina, Anahí, Esteban, Sergio C. y Tirso, por ser más que compañeros de trabajo, por las palabras justas y el aguante incondicional en los momentos difíciles. Gracias por llenar mi mente de alegres y hermosos recuerdos.

A Guillermo, mi primer esclavito laboral, por compartir el aprendizaje del trabajo en equipo.

A mis padres, por el esfuerzo que hicieron para que hoy pudiera hacer lo que tanto amo. Gracias por el cariño que me brindan, los valores que me inculcaron y la confianza que depositan en mí aun cuando creo que la meta es lejana.

A toda mi familia, la que me tocó por naturaleza y también la que vida me regaló, por el apoyo y el amor infinito y por tolerar los cambios de humor propios de un momento culminante como éste. Gracias por incentivar-me a luchar por mis sueños.

A Sergio, mi amor y compañero de vida, por ser mi pilar y mi consejero. Gracias por cada noche que pasamos en vela, yo escribiendo esta tesis y vos acompañándome sin que nada más importe. Nuestros proyectos son el impulso para que siga creciendo.

A mis amigos de la vida: Daniela, Valeria, Gisella, Belén G., Belén M.e Inés, por llenar de anécdotas inolvidables y felicidad tantos años compartidos.

A Samira y Anita, por compartir 5 años maravillosos de facultad, por ser mi familia de corazón que me acompañó en los comienzos donde esto parecía un simple juego. Gracias por seguir siendo parte de mi vida.

En fin, gracias a todos porque con sus palabras de aliento, su cariño, sus elogios y consejos me ayudaron a alcanzar este gran sueño.

Tabla de Contenidos

Abreviaturas.....	8
Términos en inglés.....	9
Resumen.....	10
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN.....	12
1. Células de músculo liso.....	14
1.1. Aparato Contráctil	14
1.1.1. Filamentos Finos.....	15
1.1.2. Filamentos Gruesos.....	15
1.1.3. Placas y cuerpos densos.....	16
1.2. Disposiciones de las células musculares.....	18
1.3. Contracción muscular	19
1.4. Caveolas	20
1.5. Transportadores de calcio	22
2. El testículo	24
2.1. El epitelio seminífero.....	24
2.2. La pared del túbulo seminífero.....	27
2.2.1. Las células endoteliales	27
2.2.2. Las células mioides peritubulares.....	27
2.2.2.1. Propiedades de las células mioides peritubulares.....	28
2.2.2.2. Regulación de la contracción.....	29
2.3 Desarrollo del testículo.....	30
Capítulo 2: OBJETIVOS.....	34
Capítulo 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
Animales de experimentación.....	37
Aislamiento de cordones/túbulos seminíferos.....	37
Estandarización de la digestión enzimática de la capa de células endoteliales de la pared de los túbulos seminíferos.....	37
Filmación in vitro de TS inducidos a contraerse con endotelina-1.....	37
Contracción de los cordones/túbulos seminíferos con endotelina-1.....	38
Contracción de los túbulos seminíferos con endotelina-1 en presencia de sus análogos no funcionales	38
Microscopía Electrónica de Transmisión.....	38
Microscopía Electrónica de Barrido.....	39
Inmunofluorescencia.....	39
Captura de imágenes en el microscopio confocal.....	40
Parámetros morfológicos.....	40
Análisis cuantitativo de colocalización.....	41
Ensamblaje de la molécula de miosina de las células mioides peritubulares	42
Depleción de colesterol en las células mioides peritubulares.....	43
Capítulo 4: RESULTADOS.....	44

SECCIÓN 4.1: Características del túbulo seminífero de ratas adultas.....	45
4.1.1. Características de la pared tubular	46
4.1.1.1. Aspecto del túbulo seminífero por la lupa de transiluminación.....	46
4.1.1.2. Observación de la pared del túbulo seminífero por distintos tipos de microscopía.....	46
4.1.1.2.1. Microscopía óptica.....	46
4.1.1.2.2. Microscopía electrónica de barrido.....	47
4.1.1.2.2.1. Superficie de las células endoteliales.....	47
4.1.1.2.2.2. Desprendimiento enzimático de las células endoteliales.....	48
4.1.1.2.2.3. Superficie de las células mioides peritubulares	51
4.1.2. Efecto de la contracción con endotelina-1 en la pared del túbulo seminífero.....	51
4.1.2.1. Aspecto del túbulo seminífero por lupa de transiluminación.....	51
4.1.2.2. Observación de la pared del túbulo seminífero contraído por distintos tipos de microscopía.....	52
4.1.2.2.1. Microscopía óptica.....	52
4.1.2.2.2. Microscopía electrónica de barrido.....	53
4.1.2.2.2.1. Superficie de las células endoteliales.....	53
4.1.2.2.2.2. Superficie de las células mioides peritubulares	54
4.1.3. Características que definen a las células mioides peritubulares como células contráctiles.....	55
4.1.3.1. Dimensiones de la célula mioide peritubular.....	55
4.1.3.2. Citoesqueleto de actina y miosina.....	56
4.1.3.2.1. Distribución de los filamentos de actina por microscopía confocal.....	56
4.1.3.2.2. Distribución de los filamentos de miosina por microscopía confocal.....	57
4.1.3.2.3. Colocalización de los filamentos de actina y miosina en las células de músculo liso	58
4.1.3.2.4. Colocalización de los filamentos de actina y miosina en las células peritubulares.....	60
4.1.3.2.5. Distribución de los filamentos de actina por microscopía electrónica de transmisión.....	63
4.1.3.3. Localización de proteínas relacionadas con la vía de señalización de la contracción	64
4.1.3.3.1. Distribución de Caveolas.....	64
4.1.3.3.2. Localización de los receptores de endotelina-1.....	68
4.1.3.3.3. Distribución de los transportadores de calcio en el retículo endoplasmático.....	70
4.1.4. Respuesta de las células mioides endotelina-1.....	72
4.1.4.1. Morfología de la célula mioide peritubular	72
4.1.4.2. Citoesqueleto de actina y miosina	73
4.1.4.3. Modificaciones ultraestructurales por acción de endotelina-1.....	74
4.1.4.4. Impacto de la desintegración de las caveolas en la contracción.....	77
4.1.5. Respuesta de las células mioides peritubulares a endotelina-1 en presencia de antagonistas de los receptores de endotelina-1 tipo A y B	78
4.1.5.1. Aspecto del túbulo seminífero por lupa de transiluminación.....	78
4.1.5.2. Dimensiones de la célula mioide peritubular.....	78

<i>SECCIÓN 4.2: Características del cordón/ túbulo seminífero durante el desarrollo postnatal</i>	81
4.2.1. Cambios en el peso corporal, peso testicular y diámetro del cordón seminífero...	82
4.2.2. Aspectos de la pared del cordón por microscopía óptica.....	82
4.2.3. Morfología de la célula mioide peritubular	84
4.2.4. Disposición de los filamentos de actina.....	86
4.2.4.1. Microscopía confocal.....	86
4.2.4.2. Microscopía electrónica de transmisión.....	86
4.2.5. Distribución de caveolina-1.....	88
4.2.6. Respuesta de los cordones/ túbulos seminíferos a endotelina-1.....	90
4.2.6.1 Dimensiones de la célula mioide peritubular.....	90
4.2.6.2. Citoesqueleto de actina.....	92
Capítulo 5: DISCUSIÓN.....	95
5.1. Características de la pared del túbulo seminífero.....	96
5.1.1. Efectos que se producen en el túbulo seminífero por la contracción.....	96
5.2. Características de las células mioides peritubulares.....	99
5.2.1. Organización del aparato contráctil.....	100
5.2.2. Distribución de caveolas.....	102
5.2.3. Distribución de los receptores de endotelina-1.....	104
5.3. Contracción de la célula mioide peritubular	105
5.3.1. Efecto del bloqueo diferencial de los receptores de endotelina-1 en la contrac- ción.....	107
5.4. Cambios fenotípicos de la célula mioide peritubular en el desarrollo.....	110
5.5. Respuesta de la célula mioide peritubular a endotelina-1 durante el desarrollo testicu- lar.....	112
Capítulo 6: PERSPECTIVAS.....	114
Capítulo 7: BIBLIOGRAFÍA.....	116

Abreviaturas

ADP	Adenosin difosfato
ADPRc	Adenosina difosfato ribosa cíclico
ATP	Adenosin trifosfato
β -mCD	β - metil ciclodextrina
Ca^{+2}	Calcio iónico
Cav-1	Caveolina-1
Cav-2	Caveolina-2
Cav-3	Caveolina-3
CBD	Dominio de unión a caveolina
CCF	Función de correlación cruzada
CE	Células endoteliales
Célula MP	Célula mioide peritubular
CLM 17	Cadena liviana regulatoria de miosina de 17 kDa
CLM 20	Cadena liviana regulatoria de miosina de 20 kDa
CM	Calmodulina
C-MAD	Dominio de asociación a la membrana del extremo carboxilo terminal
Cy3	Colorante cianina 3
DAG	Diacilglicerol
DGC	Complejo distrofina-glicoproteína
DMEM	Medio de cultivo <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , con mezcla de nutrientes F-12
dpn	Día postnatal
∂x	Desplazamiento de píxeles
ESM	Error estándar medio
ET-1	Endotelina-1
ET _A R	Subtipo A del receptor de endotelina-1
ET _B R	Subtipo B del receptor de endotelina-1
FA	Filamentos de actina
FITC	Colorante fluoresceína isocianato
FM	Filamentos de miosina
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP ₃ R	Receptores de IP ₃
kDa	KiloDalton
MAD	Dominio de asociación a la membrana
MCC	Coefficiente de correlación de Mander
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MET	Microscopía electrónica de transmisión
Na ⁺	Sodio iónico
N-MAD	Dominio de asociación a la membrana del extremo amino terminal
P1	Precipitado 1
P2	Precipitado 2
PBS	Buffer fosfato salino

pc	Post coito
PCC	Coeficiente de correlación de Pearson
Pi	Fosfato inorgánico
PLC β 1	Fosfolipasa C activa
PMCA	Canal Ca ⁺² -ATPasa de la membrana plasmática
pn	Postnatal
QCLM	Quinasa de la CLM 20
RE	Retículo endoplasmático
RyR	Receptores de rianodina
S1	Sobrenadante 1
S2	Sobrenadante 2
SERCA	Bomba Ca ⁺² -ATPasa del retículo endoplasmático
SO	Sección óptica
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β
TS	Túbulo seminífero

Términos en inglés

Dominio caveolin-scaffolding (CSD): Dominio de caveolina-1 que sirve como un punto de anclaje para diversas proteínas de señalización

Western Blot Transferencia de proteínas a una membrana con la consiguiente detección mediante anticuerpos

Z-Stack Escaneo de una muestra a lo largo del eje Z que genera secciones ópticas con un grosor determinado

Resumen

En el testículo de los roedores adultos, la pared de los túbulos seminíferos (TS) está compuesta por una monocapa de células mioideas peritubulares (células MP) y una monocapa de células endoteliales (CE). Las células MP son un tipo de célula muscular lisa, ya que expresan las proteínas específicas de este linaje, como α -actina, desmina y miosina II muscular. La célula MP exhibe funciones contráctiles involucradas en el transporte de los espermatozoides y del fluido testicular a lo largo del TS. La endotelina-1 (ET-1), un péptido que en el testículo es sintetizado por las células de Sertoli, produce la contracción del TS al actuar sobre las células MP que expresan los receptores a esta hormona. De acuerdo a la clasificación de las células MP como células musculares lisas y al poco conocimiento que existe sobre su citoesqueleto y su modo de contracción, a lo largo de esta tesis se evaluó en animales adultos y en desarrollo, la organización no sólo del aparato contráctil sino también de otras estructuras celulares y proteínas que están implicadas en la respuesta de una célula muscular a estímulos constrictores. Además, se analizaron los efectos que ET-1 desencadena no sólo en la célula MP sino también en los otros componentes de la pared del TS, como las membranas basales, el colágeno y las CE. La descripción de estos cambios se realizó por medio del uso de diferentes microscopios: óptico, confocal y electrónicos de transmisión y barrido.

Así, se observó que dentro de las células MP los filamentos de actina (FA) y los filamentos de miosina (FM) se organizan en dos capas independientes. La capa interna (dirigida hacia el epitelio seminífero) y externa (dirigida hacia el intersticio) presentan filamentos distribuidos perpendiculares y paralelos al eje principal del TS, respectivamente. En cada capa, los FA y los FM presentan la misma orientación y, al igual que en el músculo liso, colocalizan de una manera casi completa. Además de un citoesqueleto altamente organizado no observado en otra célula muscular, la célula MP tiene abundantes caveolas en las membranas plasmáticas de la cara interna y externa que adoptan una disposición en fila que se complementa con la de los FA de la capa subyacente, por lo que aparecen filas dos direcciones, perpendiculares y paralelas al eje del TS. Por acción de metil- β -ciclodextrina, se desintegran las caveolas y caveolina-1 no forma filas sino que se distribuye en toda la célula. Respecto a los receptores de ET-1, se encontró que tanto el receptor de ET-1 tipo A ($ET_A R$) como el tipo B ($ET_B R$) están dispuestos en hileras que se orientan perpendiculares y paralelas al eje tubular, y que colocalizan de una manera casi completa con los FA de cada capa. ET-1 induce la contracción de los TSs: se reduce su diámetro y longitud, lo que desencadena en la expulsión del contenido tubular. En las secciones transversales de los TSs contraídos la célula MP aumen-

ta de grosor, cambia su forma de poligonal aplanada a cónica y su núcleo se pliega. Las membranas basales del epitelio y de la célula MP se ondulan mientras que el colágeno cambia su disposición ubicándose perpendicular a éstas. En las CE aparecen múltiples prolongaciones digitiformes pequeñas que cubren su superficie. Los FA y los FM mantienen la organización en dos capas independientes, aunque en cada capa aumenta el grado de entrecruzamiento entre ellos. El área tangencial celular se reduce como consecuencia de la contracción de la célula a lo largo del eje x (en dirección al eje del TS) y del eje y (perpendicular al eje tubular). Cuando se desestabilizan las caveolas con metil- β -ciclodextrina, las células MP dejan de responder a ET-1. Para determinar si ET-1 produce una contracción diferente en cada una de las capas de miofilamentos de la célula MP, los TSs se preincubaron con antagonistas que bloquean la actividad de ET_AR o de ET_BR. Así, se observó que la contracción celular a lo largo del eje x se desencadena principalmente por la activación de la vía del ET_AR, mientras que la del eje y se realiza principalmente a través de la vía del ET_BR. En conjunto, estos resultados demuestran que la célula MP, a pesar de tener 1,9 μm de espesor, dispone de una maquinaria contráctil altamente organizada y especializada, en la que estructuras implicadas en el control de la contracción (caveolas y receptores de ET-1) se orientan según las dos capas de miofilamentos que coexisten en la misma célula y que le permiten poder contraerse en dos direcciones diferentes.

Durante el desarrollo postnatal del testículo se observó que la célula MP cambia su forma y la organización de los filamentos a medida que se establece y progresa la espermatogénesis. Llamativamente, las dos capas de FA no aparecen simultáneamente: primero lo hace la capa interna y luego la capa externa. Con sólo una capa (día 13 a 23 postnatal) la célula MP es capaz de contraerse, al principio lo hace únicamente a lo largo del eje y , mientras que una vez que están establecidas las dos capas (día 30 postnatal) la célula se contrae en las dos direcciones en las que se disponen los FA. Existe una estrecha relación entre las células MP y las células de Sertoli que influye en los eventos que conducen a la maduración de la célula MP y que la convierten en una célula muscular altamente organizada, con un citoesqueleto particular y con un rol crucial en la contracción del TS.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

Este trabajo brinda conocimientos sobre las células que participan en la contracción del túbulo seminífero de rata. En la introducción se describirán las características que poseen las células musculares lisas que constituyen tejidos que experimentan contracción, dentro de las cuales se hará hincapié en el modo de organización no sólo del aparato contráctil sino también en el de otras estructuras que están implicadas en la contracción celular. Luego, se presentará información sobre la estructura y función de los túbulos seminíferos del testículo de rata y se describirán los conocimientos existentes sobre las células mioides peritubulares y sobre el desarrollo del testículo.

Esto temas aportarán los conceptos necesarios para comprender y discutir los resultados de esta tesis.

1. Células de músculo liso

Las células de músculo liso son células fusiformes, exhiben propiedades contráctiles y forman parte de varios órganos internos, donde la contracción muscular cumple funciones específicas. Por ejemplo, bajo el control de diversos mecanismos involuntarios, la contracción de las células de músculo liso de la pared de los vasos sanguíneos regula la presión del flujo de la sangre. En el tracto gastrointestinal, la contracción celular permite el movimiento del alimento a través del intestino y en el caso del sistema respiratorio, la contracción excesiva contribuye a distintas patologías entre las que se encuentran el asma y las reacciones alérgicas.

Las células musculares, a pesar de estar diferenciadas, retienen la capacidad de moldear su fenotipo entre uno *inmaduro* y uno *contráctil* por medio de cambios reversibles que son controlados por factores externos y/o por la regulación de la expresión de genes específicos. El fenotipo inmaduro se caracteriza por una tendencia a proliferar y/o sintetizar componentes de la matriz extracelular u otras proteínas biológicamente activas. Las células que exhiben una capacidad incrementada a proliferar tienen una gran cantidad de organelas para la síntesis de lípidos y proteínas (retículo endoplasmático y aparato de Golgi) y menor cantidad de caveolas y de proteínas del aparato contráctil. Además, las células con el fenotipo inmaduro tienen suprimida la respuesta a agonistas contráctiles. Por otro lado, el fenotipo contráctil se caracteriza por la escasa presencia de organelas sintéticas, por la acumulación de proteínas involucradas en el aparato contráctil y por la gran cantidad de caveolas en la membrana plasmática. Este fenotipo se induce ya sea por la acción del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), por insulina o por laminina (entre otros) que activan vías de señalización que están asociadas en el control transcripcional y traduccional de las proteínas específicas del músculo liso, tales como α -actina, caldesmona, desmina y la cadena pesada de la miosina de músculo liso (Halayko y col. 2008). (Figura 1).

1.1. Aparato Contráctil

El citoplasma de las células de músculo liso con fenotipo contráctil se observa homogéneo al microscopio óptico, ya que las proteínas que componen el aparato contráctil (actina y miosina) no están organizadas en sarcómeros como en el músculo esquelético y cardíaco. El aparato contráctil de las células del músculo liso está compuesto principalmente por filamentos finos o microfilamentos, filamentos gruesos y por cuerpos densos.

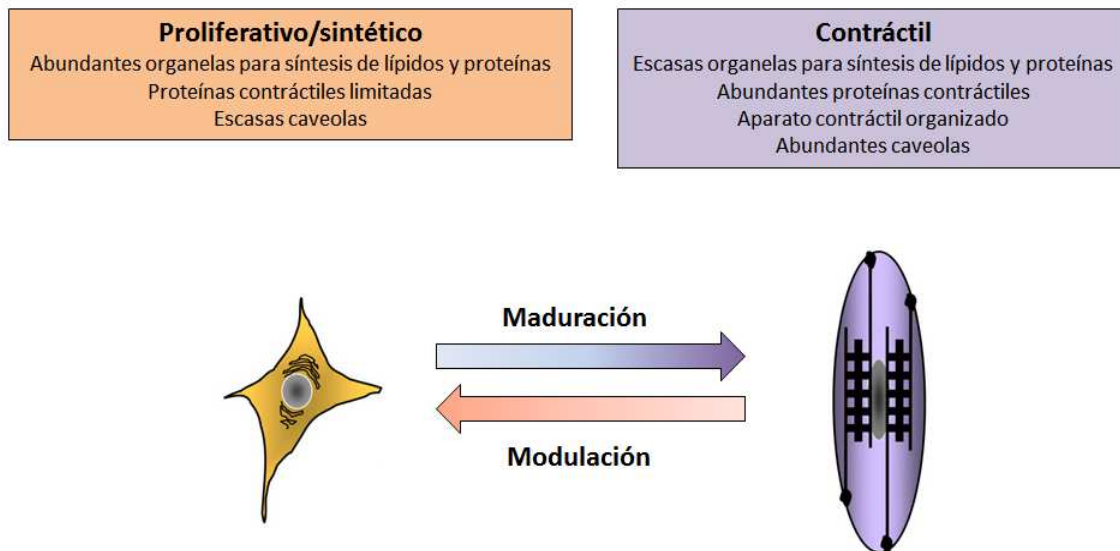


Figura 1. *Plasticidad fenotípica de las células musculares lisas*. *In vitro* el proceso de modulación en las células musculares se induce por una baja densidad celular en los cultivos primarios, por la exposición a mitógenos (suero fetal bovino y factor derivado de plaquetas (PDGF)) y por la adherencia a componentes de la matriz extracelular tales como fibronectina y colágeno tipo I. La *maduración* a un estado contráctil ocurre *in vitro* en los cultivos primarios con alta densidad de células, en respuesta a una privación de mitógenos y a la adherencia a una matriz extracelular con laminina. (Figura extraída de **Halayko y col. 2008**)

1.1.1. Filamentos Finos

La actina (isoforma α , específica de las células musculares) es una proteína globular que polimeriza para formar filamentos largos de 7-8 nm de espesor que se disponen longitudinales al eje principal de la célula. Los filamentos de actina son polarizados, es decir, poseen un extremo positivo y otro negativo como consecuencia de la disposición ordenada de las moléculas de actina que siempre se ensamblan con la misma orientación. El extremo positivo se denomina así porque en él predomina la polimerización (adición de nuevas moléculas de actina), mientras que en el extremo negativo predomina la despolimerización. Por medio de la interacción con proteínas moduladoras, los filamentos de actina regulan no sólo su formación y destrucción, sino también su capacidad de asociarse entre sí con el fin de establecer estructuras tridimensionales diferentes.

Los filamentos de actina junto a los filamentos gruesos adoptan un arreglo que influye en el modo en que la célula genera la fuerza responsable de la contracción muscular.

1.1.2. Filamentos Gruesos

La miosina es una proteína fibrosa, cuyos filamentos tienen un diámetro de 15 nm. Se conoce que esta proteína está implicada en la contracción muscular por medio de la interacción con la actina.

La miosina es una ATPasa, es decir, hidroliza el adenosin trifosfato (ATP) para formar adenosin difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi), reacción que proporciona la contracción muscular. La miosina II muscular es el isotipo de miosina responsable de producir la contracción; está compuesta de 2 cadenas pesadas, cada una de 250 kDa y 4 cadenas livianas. Las cadenas pesadas constituyen la cabeza y los dominios de la cola. Así, cada molécula de miosina tiene una región globular de doble cabeza unida a una larga cadena helicoidal de doble hebra. La porción globular de la miosina además de combinarse con la actina, tiene actividad ATPásica. Cada cabeza de miosina se une a su vez a dos cadenas ligeras diferentes, con un peso de 20 y 17 kDa. La cadena liviana de miosina II de 20 kDa (CLM 20) tiene función reguladora y participa activamente en la contracción muscular, mientras que la función de la cadena liviana de miosina II de 17 kDa (CLM 17) aún no es clara, aunque se cree que contribuye a la estabilidad estructural de la molécula.

En las células de músculo estriado y cardíaco, las largas colas de doble hebra de las moléculas individuales de miosina II muscular se unen para formar filamentos gruesos que se disponen a lo largo del eje longitudinal de la célula, y que junto a los filamentos de actina forman los sarcómeros que constituyen las unidades de contracción del músculo.

En las células de músculo liso, los filamentos de miosina II están intercalados entre los filamentos finos pero no de una manera tan regular como en el músculo estriado y cardíaco. Sin embargo, al igual que en ellos, el deslizamiento de los filamentos de miosina sobre los de actina produce la contracción celular. La relación entre los filamentos de actina y miosina en el músculo liso es de 12:1 a 14:1, en comparación con la que se observa en el músculo esquelético que es de 2:1 a 4:1, de tal manera que la fuerza generada por el músculo liso es mucho mayor que la del músculo estriado (Figura 2).

1.1.3. Placas y cuerpos densos

Como se mencionó previamente, el citoplasma de las células musculares lisas presenta un aspecto homogéneo, excepto por la presencia de unos grumos densos, espaciados y poco definidos que se denominan cuerpos densos citoplasmáticos. En la cara interna de la membrana celular se observan zonas densas de características similares, llamadas placas densas subplasmáticas. Los cuerpos densos citoplásmicos se tiñen selectivamente con anticuerpos fluorescentes específicos a la α -actinina (proteína de unión a actina), mientras que las placas densas de la superficie celular reaccionan con anticuerpos específicos a vinculina y a talina. Ambas estructuras sirven como sitios de anclaje para los filamentos de actina.

Cada unidad contráctil formada por un conjunto de filamentos de actina y miosina (denominados de aquí en más como miofilamentos) nace en los cuerpos densos citoplasmáticos, de manera tal que los filamentos de actina de las dos caras de un cuerpo denso presentan polaridades opuestas. Esta disposición sugiere que los cuerpos densos del músculo liso son los equivalentes funcionales de las bandas Z del músculo estriado. Al igual que ellas, los cuerpos densos anclan filamentos intermedios de desmina (de 10 nm de diámetro) que forman un “tendón” continuo que corre de extremo a extremo dentro de la célula y previenen así del exceso de estiramiento (Figura 2).

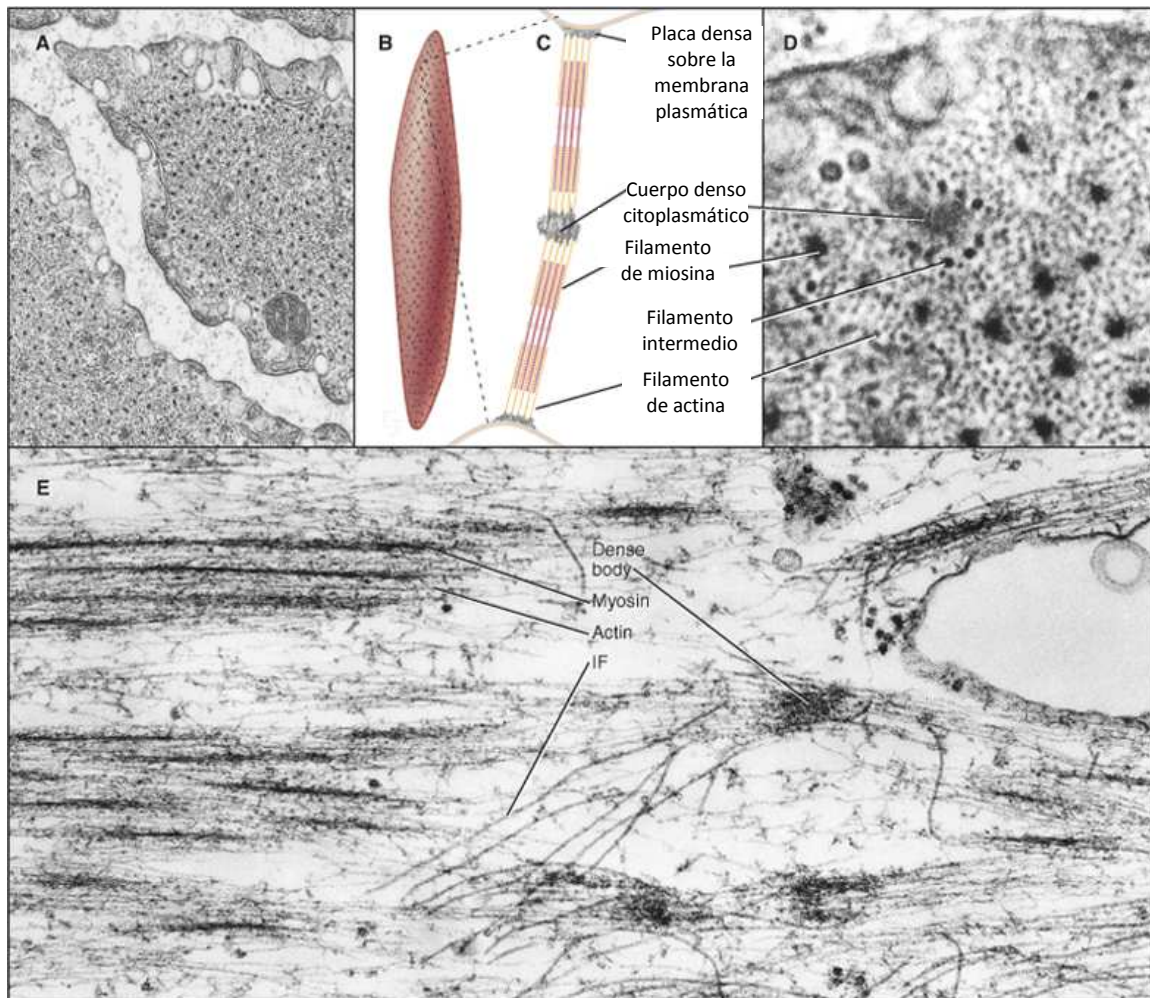


Figura 2. *Aparato contráctil del músculo liso*. Micrografía electrónica de una sección transversal (A y D) y de una sección longitudinal (E), Esquema de una célula de músculo liso (B) y de la disposición de filamentos de actina, filamentos de miosina y de los cuerpos densos (C). (Figura extraída de **Cell Biology** de T. Pollard, 2007).

1.2. Disposiciones de las células musculares

Las células musculares lisas se organizan en diferentes patrones de alineamiento que reflejan las acciones fisiológicas de los órganos en los que se encuentran (Kuo y Seow 2004; Longtine y col. 1985, Pollard y col. 2007). Por ejemplo, en los vasos sanguíneos se observan células dispuestas circunferencialmente al vaso, de manera que su contracción disminuye el calibre luminal y reduce, por tanto, el flujo de sangre. En las paredes intestinales, las células de músculo liso forman dos capas concéntricas dispuestas de manera que las células de la capa interna están orientadas circunferencialmente al tracto digestivo mientras que las células de la capa externa lo hacen longitudinalmente. Así, la contracción de la capa interna reduce el calibre luminal y la de la capa externa disminuye la longitud del intestino. La acción coordinada de ambas capas da lugar a las ondas peristálticas de contracción que se propagan a lo largo del intestino y que empujan su contenido (Figura 3).

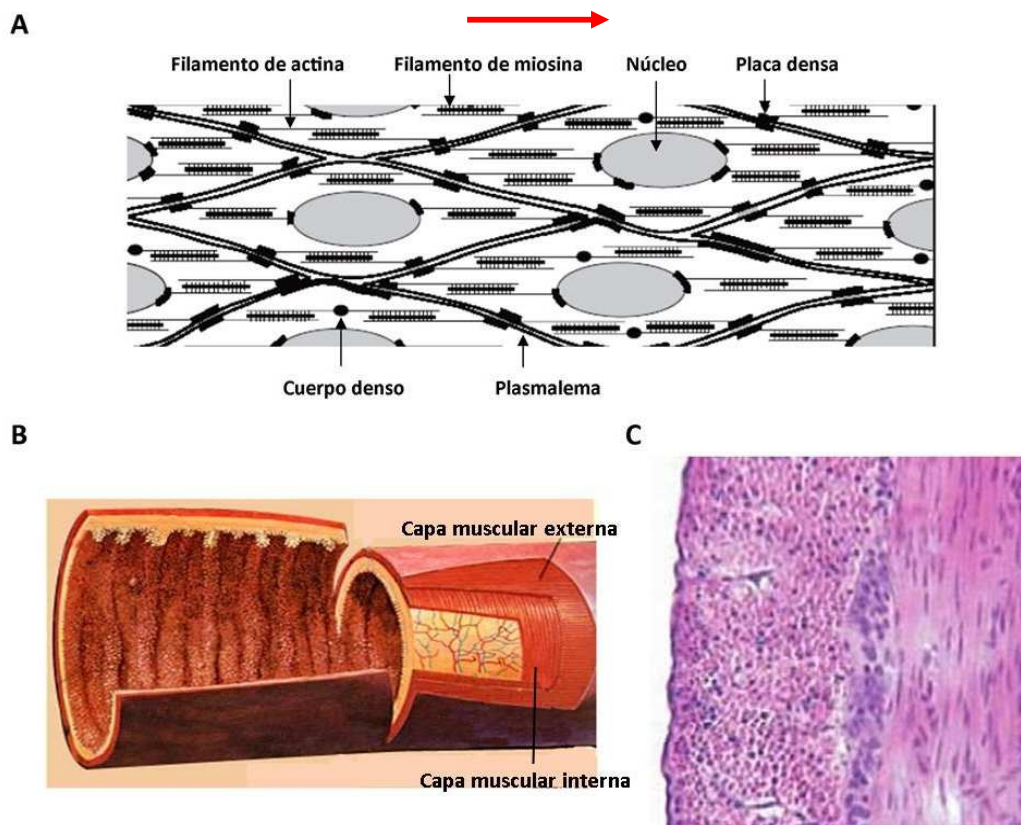


Figura 3. **A.** Esquema de la organización del aparato contráctil en las células musculares lisas de la tráquea. **B.** Esquema de la disposición de las capas de células musculares lisas en la pared del intestino. **C.** Corte transversal del intestino teñido con hematoxilina-eosina. **Flecha:** Eje longitudinal de la célula.

1.3. Contracción muscular

Para que se produzca la contracción muscular es necesario que se desencadene una secuencia de tres reacciones: la unión de calcio iónico (Ca^{+2}) a calmodulina, la activación de la proteína quinasa que fosforila la CLM 20 y finalmente la fosforilación de la cadena reguladora de miosina. Como resultado de este proceso, se activa el ciclo ATPasa de miosina que media la interacción de miosina con actina (Figura 4). El grado de fosforilación de la cadena liviana depende a su vez de una vía de señalización que inhibe a la proteína fosfatasa de miosina. La estimulación de los receptores asociados a proteínas G triméricas induce la activación de la proteína Rho A GTPasa, la cual estimula a su vez a una proteína quinasa que inhibe a la fosfatasa de la CLM 20, de tal manera que se incrementa el número de moléculas de miosinas fosforiladas y por lo tanto, de miosinas activas (Figura 4).

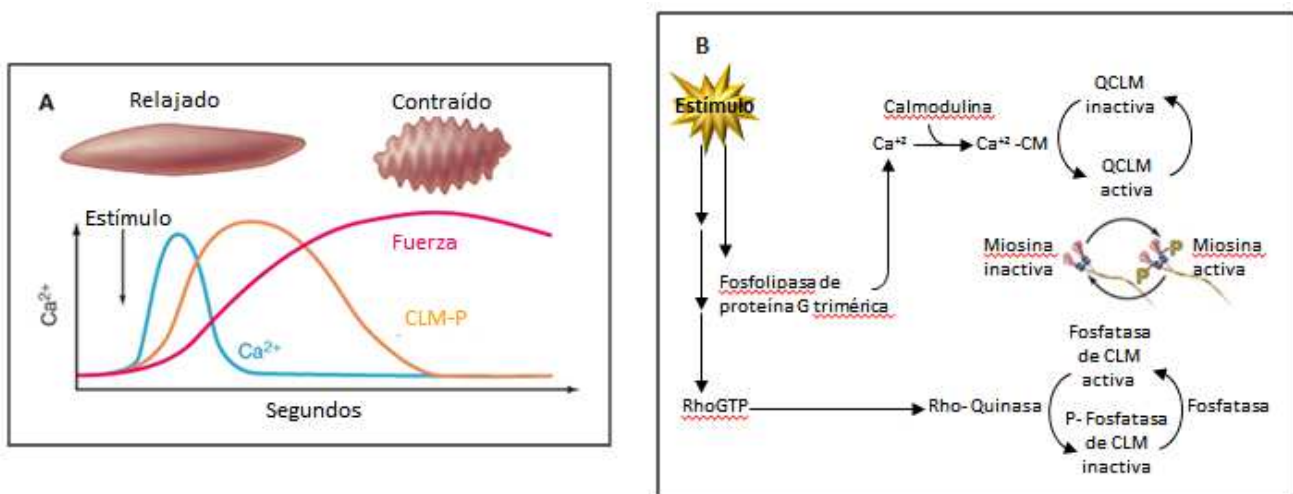


Figura 4. **Activación de la contracción del músculo liso.** **A.** A causa de la contracción la célula del músculo liso en forma de huso se convierte en una célula con pliegues. El gráfico muestra el proceso de la activación de la contracción a medida que transcurre el tiempo, el cual consiste en el incremento de los niveles de Ca^{+2} en el citoplasma, en la fosforilación de la cadena liviana reguladora de miosina (CLM 20) y en el desarrollo de la fuerza. La fosforilación de la CLM 20 es requerida para iniciar, pero no para prolongar la contracción del músculo liso. **B.** Vías de señalización que controlan la fosforilación de la CLM 20. La estimulación de los receptores asociados a proteína G conduce por un lado a la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) por acción de la fosfolipasa C y por el otro a la liberación de Ca^{+2} al citoplasma. El Ca^{+2} se une a la calmodulina (CM), lo cual activa a la quinasa de la CLM 20 (QCLM). La QCLM fosforila los sitios activos de la CLM 20, mientras que la fosfatasa de la CLM 20 revierte la fosforilación de la molécula de miosina. La activación de Rho GTPasa con GTP estimula a la Rho-Quinasa, la cual fosforila e inactiva a la fosfatasa de la CLM. Esto hace que el sistema sea más sensible a los niveles de Ca^{+2} , ya que la fosforilación de la CLM 20 se vuelve prolongada. (Figura extraída de **Cell Biology** de T. Pollard, 2007).

1.4. Caveolas

Las células musculares lisas con fenotipo contráctil poseen abundantes caveolas, unas invaginaciones de la membrana plasmática ricas en colesterol y esfingolípidos que son morfológicamente

distinguibles de las vesículas recubiertas de clatrina. El tamaño de las caveolas oscila entre 50 y 100 nm, presentan forma de botella y pueden encontrarse aisladas o agrupadas. Estas estructuras, que también están presentes en las células endoteliales (aunque en menor cantidad), generalmente internalizan y participan en el transporte de sustancias dentro de la célula. Sin embargo, en las células musculares lisas las caveolas son fijas (Taggart, 2001). La estructura lipídica de las caveolas se estabiliza por complejos oligoméricos de proteínas integrales de membrana denominadas caveolinas. Existen tres tipos de caveolinas que se expresan a partir de genes diferentes: caveolina-1 (Cav-1), caveolina-2 (Cav-2) y caveolina-3 (Cav-3), donde Cav-1 y Cav-3 tienen la capacidad de inducir independientemente la formación de las caveolas (Halayko y col.2008).

Numerosos receptores, proteínas de señalización y canales iónicos son secuestrados en las caveolas y, de esta manera, se crean focos para la regulación de diversas actividades celulares. La capacidad que tienen las caveolas de secuestrar diversas proteínas se debe a la estructura de las caveolinas. Cav-1 es una proteína de 22-kD que se integra a la membrana plasmática a través de dos dominios de asociación a membrana (MADS) que se encuentran en el extremo amino terminal (N-MAD) y en el extremo carboxilo terminal (C-MAD). En el extremo amino terminal hay una región denominada dominio *caveolin-scaffolding* (CSD) que tiene afinidad por aquellas moléculas de señalización que posean en su estructura el dominio de unión a caveolina (CBD). Se han identificado un gran número de proteínas asociadas a las caveolas que poseen este dominio (receptores tirosina quinasa, subunidades $G\alpha$, RhoA, proteína quinasa C, entre otras), muchas de las cuales tienen roles bien definidos en el control de la contracción del músculo liso y de la proliferación celular. Así, las caveolinas interactúan con proteínas de señalización pero no desencadenan señales intracelulares de por sí. Sin embargo, ajustan la actividad de las cascadas de transducción de señales que controlan toda la gama de fenotipos y funciones del músculo liso (Figura 5).

En la membrana plasmática de las células musculares lisas con un fenotipo contráctil, las caveolas se ordenan en hileras a lo largo del eje longitudinal de la célula y acompañan a los miofilamentos subyacentes. Las caveolas parecen unirse indirectamente con la red de actina a través de la interacción que se establece entre Cav-1 y β -dístroglicano (subunidad transmembrana del complejo dístrofina-glicoproteína (DGC)). A través del β -dístroglicano, el DGC está unido a la actina por medio de la dístrofina, mientras que la subunidad α -dístroglicano se une a la laminina de la matriz extracelular. Dístrofina es una proteína que posee un dominio de unión a actina en el extremo amino terminal (Figura 5). Uno de los roles claves del DGC en el músculo liso es estabilizar la membrana plasmática para protegerla del daño provocado por la fuerza mecánica. Se sugiere que la interacción entre β -dístroglicano y Cav-1, la cual es críticamente importante para el mantenimiento de las in-

vaginaciones de las caveolas, es la que determina la distribución típica de las caveolas. Este modo de organización de Cav-1 está altamente relacionado con el secuestro y función de las proteínas de señalización que se encuentran próximas, cuya función entre otras es mediar la liberación de Ca^{+2} intracelular (Sharma y col. 2010).

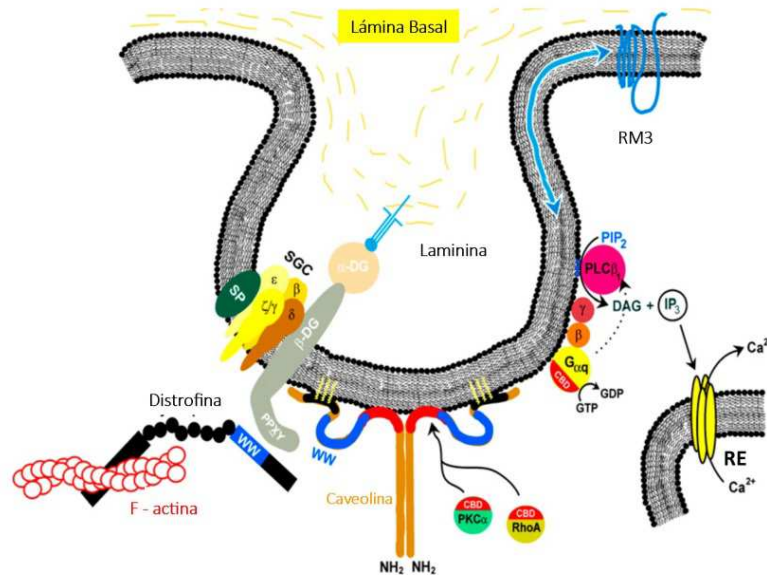


Figura 5. **Relación entre Cav-1 y el complejo distrofina-glicoproteína (DGC) y su asociación con la vía de señalización mediada por el receptor asociado a proteína G.** Para simplificación, se detalla un homodímero de Cav-1. La Cav-1 está anclada a la cara citosólica de la membrana plasmática a través de los dominios N-MAD (rojo) y C-MAD (negro). Los dominios WW (azul) de ambas Cav-1 y de la distrofina tienen afinidad por los dominios de unión a WW que tienen el motivo consenso PPXY, presentes en β-distroglicano (β-DG). Distrofina actúa como un puente entre el DGC y el citoesqueleto de filamentos de actina. El DGC está unido también a la lámina basal por medio de la subunidad α-distroglicano (α-DG). El dominio caveolin scaffolding (CSD, mostrado en rojo) de Cav-1 se superpone con el dominio N-MAD y sirve como un punto de anclaje para diversas proteínas de señalización (subunidad Gα, proteína quinasa C (PKC) y RhoA, entre otras) que tengan el dominio de unión a Cav-1 (CBD). Luego del intercambio de GDP por GTP, las subunidades Gαq se asocian con la fosfolipasa C activa (PLCβ1), la cual cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5- bifosfato (PIP2) para producir el segundo mensajero diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). IP3 se une a su receptor presente en la membrana del retículo endoplasmático (RE) y media la liberación rápida del Ca⁺² contenido en su interior hacia el citoplasma. La movilización de Ca⁺² citosólico es requerida para iniciar la contracción de las células musculares lisas. (Figura extraída de Halayko y col. 2008)

1.5. Transportadores de calcio

En las células musculares lisas los transportadores de Ca^{+2} controlan el mantenimiento de los niveles bajos de Ca^{+2} , el incremento de Ca^{+2} necesario para la contracción y la restitución de los niveles normales de Ca^{+2} que se requieren para que se alcance la relajación. Para que se produzcan

estas oscilaciones de Ca^{+2} se precisa tanto de la salida e ingreso de Ca^{+2} a la célula a través de la membrana plasmática como de la liberación del Ca^{+2} que está contenido en el retículo endoplasmático (RE) seguido de su posterior rellenado.

En las células musculares lisas viscerales el ingreso de Ca^{+2} es controlado principalmente por el potencial de membrana, ya que esto determina la apertura de los canales de Ca^{+2} operados por voltaje. Los canales de Ca^{+2} tipo L son los que en mayor medida se expresan en las células musculares lisas y son los responsables del ingreso de la mayor parte del Ca^{+2} requerido para activar a los miofilamentos. Por otro lado, para que los niveles de Ca^{+2} retornen a las condiciones normales y la célula sea capaz de responder nuevamente a un estímulo contráctil, se requiere de la acción de alguno de los dos transportadores que están implicados en la salida de Ca^{+2} : el canal Ca^{+2} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) o el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (Figura 6). Existen trabajos que mencionan que estos transportadores se encuentran en las regiones de la membrana plasmática enriquecidas de caveolas (Blaustein y col. 2002), donde el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ reside en los microdominios de la membrana plasmática que están cercanos al RE, mientras que el PMCA tiene una distribución más uniforme. Como resultado de esta disposición, Juhaszova y col (1996;1997) proponen que el PMCA regula los incrementos de Ca^{+2} que se producen en la célula de una manera globalizada y que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ regula lo que sucede en los pequeños espacios existentes entre la membrana plasmática y el RE.

Los transportadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ utilizan el gradiente de Na^+ para producir la eliminación del Ca^{+2} citoplasmático. En cada ciclo, un ion de Ca^{+2} se intercambia por tres iones de Na^+ . Esta reacción de intercambio ocurre en dos direcciones, según sea la concentración de Na^+ relativa. Así, si disminuye la concentración de Na^+ extracelular, el Na^+ contenido en el interior de la célula sale y el Ca^{+2} ingresa. Arnon y col. (2000) observaron que en ausencia de un incremento *global* de Na^+ intracelular, si se producen cambios locales de la concentración de Na^+ en microdominios funcionales de la membrana plasmática, se puede regular el intercambiador y así promover el ingreso de Ca^{+2} . Además, si la depresión de Na^+ en el medio extracelular es prolongada, los niveles aumentados de Ca^{+2} dentro de la célula inducen el proceso de liberación de Ca^{+2} inducida por Ca^{+2} desde el RE.

La estimulación de los receptores asociados a proteínas G con los agonistas conduce a la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5- bifosfato por medio de la acción de la enzima fosfolipasa C ($\text{PLC}\beta$), de tal manera que se producen los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). El principal efecto de IP_3 dentro de la célula es conducir la liberación de Ca^{+2} desde el RE a través de los receptores de IP_3 (IP_3R) que están presentes en la membrana de esta

organela. Por otro lado, el Ca^{+2} del citoplasma puede unirse a los receptores de rianodina (RyR) e inducir la liberación de una mayor cantidad de Ca^{+2} desde el RE en un proceso conocido como *liberación inducida por calcio* (Figura 6). Estos hechos demuestran el importante rol que cumple el RE como una fuente intracelular de Ca^{+2} . La capacidad del RE de contener concentraciones de Ca^{+2} mayores que el citoplasma requiere el transporte activo de Ca^{+2} por medio de la bomba Ca^{+2} -ATPasa, conocida como SERCA (Figura 6). Diversos trabajos mencionan que la bomba SERCA, los RyRs y los IP_3 Rs no adoptan una distribución homogénea en la célula, sino que están próximos a las caveolas (Nixon y col. 1994; Shmygol y Wray 2004).

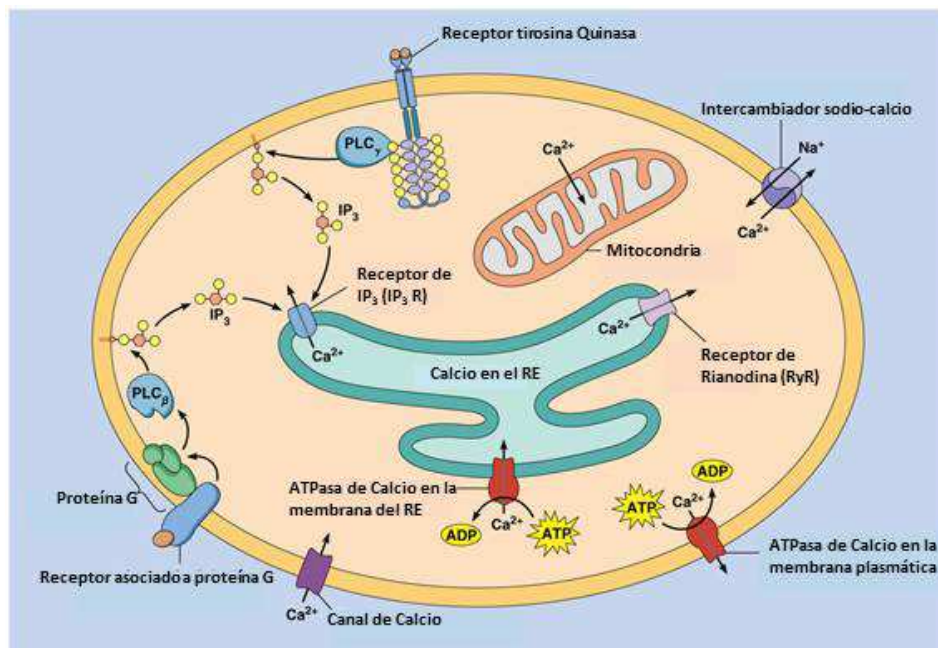


Figura 6. *Esquema representativo de los transportadores de calcio presentes en el músculo liso.* (Figura extraída de Principios de la Biología Celular, <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-14/CB14.html>)

2. El testículo

El testículo de los mamíferos contiene túbulos seminíferos (TSs) que se disponen en asas plegadas con ambos extremos dirigidos hacia la rete testis (Figura 7). Los TSs, responsables de la producción de espermatozoides, están constituidos por un epitelio estratificado germinativo que apoya sobre una membrana basal. La pared del TS de roedores adultos está constituida por una monocapa de células mioides peritubulares (células MP) (Palombi y col. 1992; Vogl y col. 1985), que a su vez está cubierta por una monocapa de células endoteliales (CE) (Clark 1976; Fawcett y col. 1969; Söderström y col. 1997).

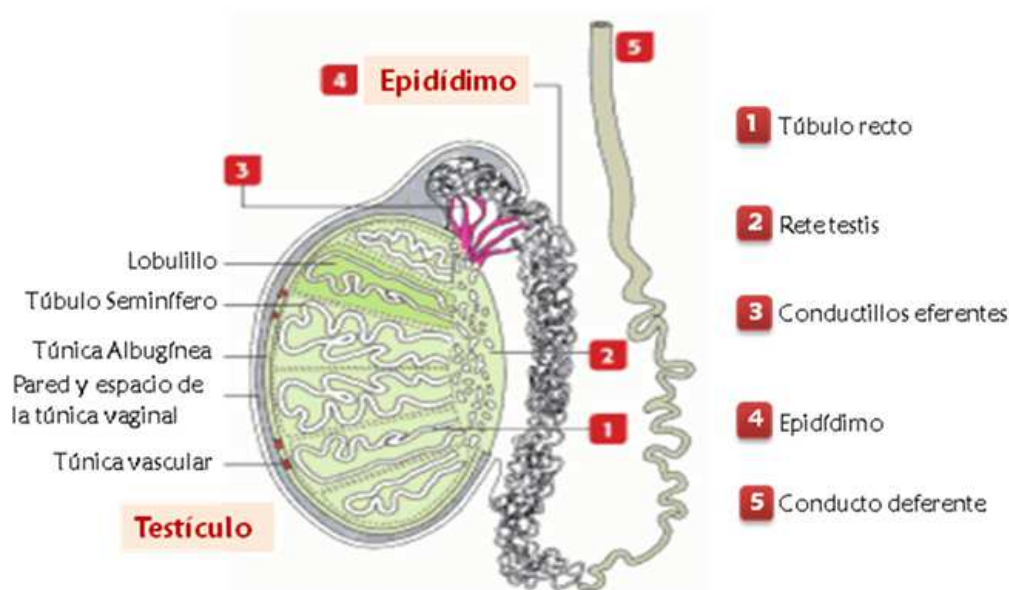


Figura 7. *Esquema general de la organización del testículo.* (Figura extraída de **Histología y biología celular: introducción a la anatomía patológica** de A. Kierszenbaum, 2ª ed, 2008).

2.1. El epitelio seminífero

El epitelio seminífero contiene 2 tipos de células: las denominadas células de Sertoli y las células germinales precursoras de las gametas. Las células de Sertoli proveen el soporte y/o sustento mecánico y funcional a las células germinales. Entre estas últimas se encuentran las espermatogonias, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios, espermátides redondas y las espermátides elongadas (Figura 8).

A lo largo del TS, se encuentra una secuencia de segmentos donde el epitelio presenta asociaciones celulares fijas o estadios. Un ciclo espermatogénico implica cambios en la asociación celular a lo largo del **tiempo** en un punto determinado del TS. Estos cambios se producen conforme las células espermatogénicas progresan en su desarrollo. Es decir, sería como visualizar los cambios de

los estadios de un ciclo empleando una cámara con control del tiempo colocada en un lugar determinado del TS (Figura 9 y 10). Por otro lado, a la secuencia ordenada de estadios en una dirección del túbulo se le llama onda espermatogénica (Figura 10 y 11). El número de estadios varía según la especie de mamífero. En la rata, los estadios son numerados consecutivamente del I al XIV. En los estadios germinales VII-VIII en el epitelio seminífero se encuentran las espermatídes con mayor grado de diferenciación (espermatídes elongadas) que son liberadas en el estadio VIII hacia la luz tubular en un proceso conocido como espermiación.

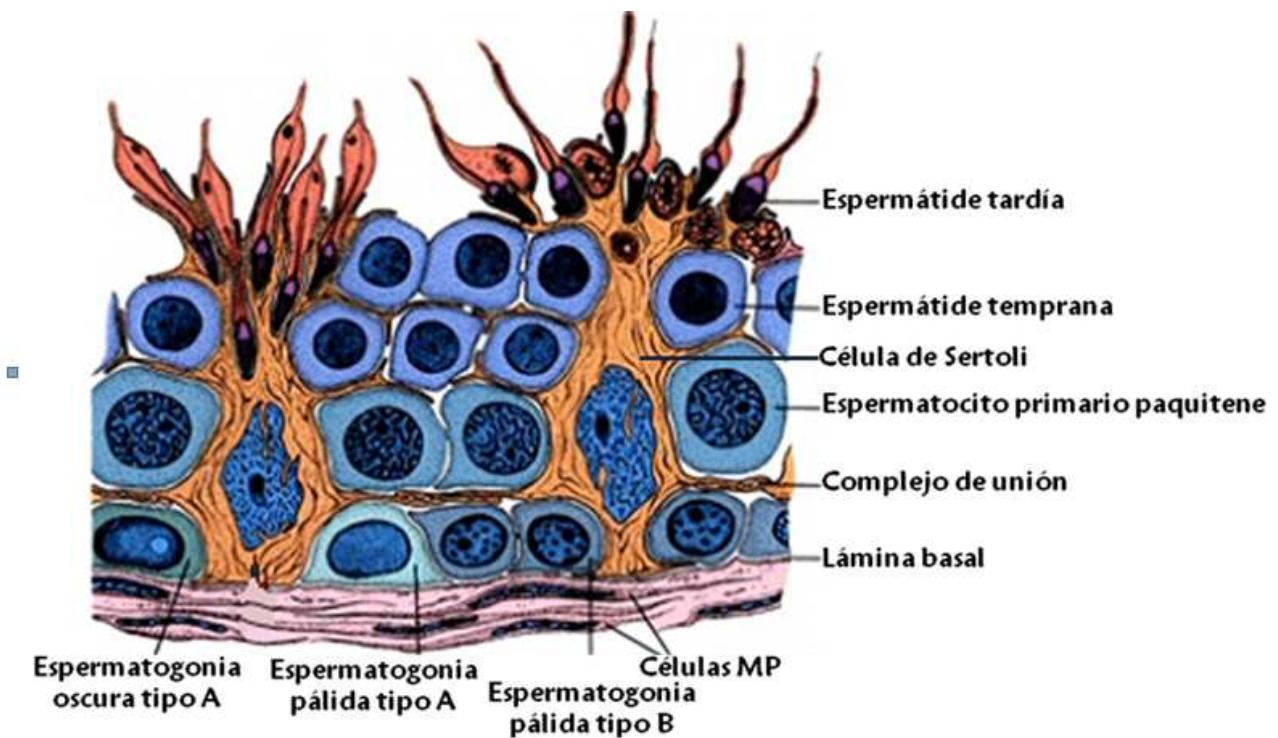


Figura 8 *Esquema del epitelio seminífero*. (Figura extraída de **Basic Histology: Text & Atlas**, Luiz Carlos Junqueira y José Carneiro, 11ed, 2005).

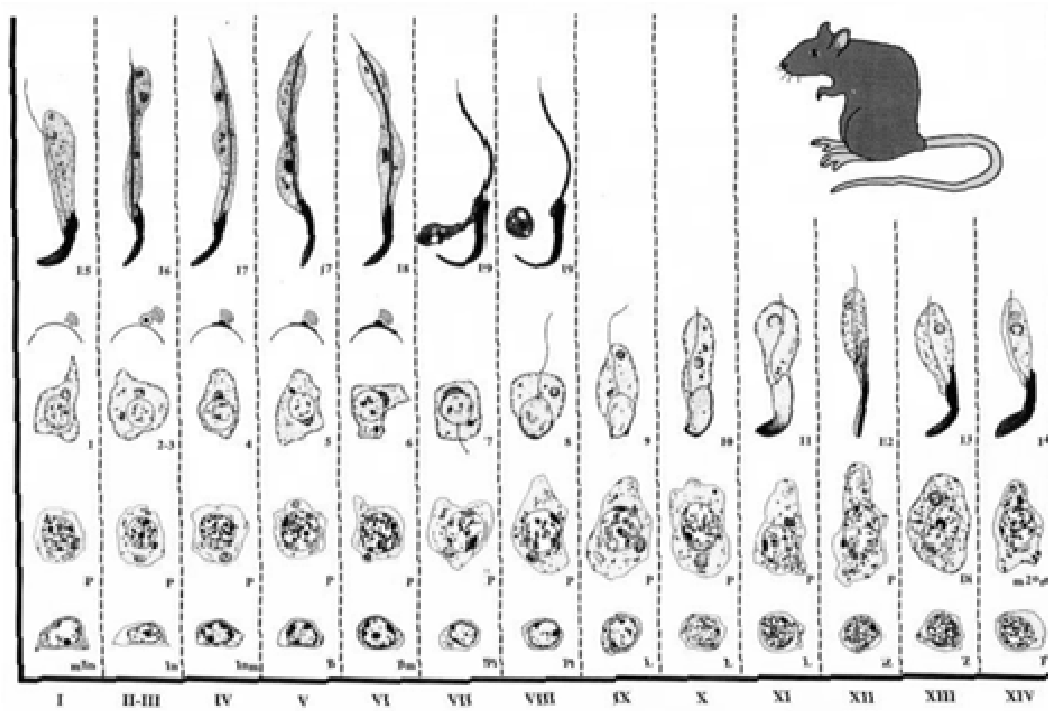


Figura. 9. *Mapa del ciclo de la espermatogénesis de la rata*. Las columnas verticales que están designadas con números romanos representan las asociaciones celulares o estadios. La progresión del desarrollo de las células es seguida horizontalmente desde la izquierda hasta el borde derecho del mapa del ciclo, se continúa en la segunda fila ascendente y así sucesivamente hasta terminar con la formación del espermatozoide. (Figura extraída de **Russell y col. 1990**).

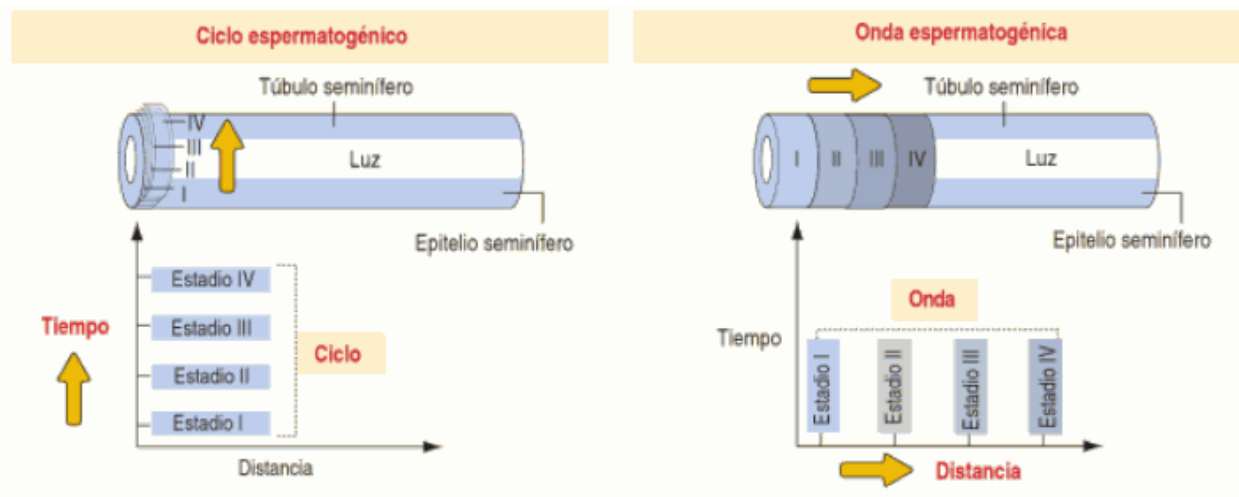


Figura 10. *Esquema representativo del ciclo espermatogénico y de la onda espermatogénica en el Túbulo Seminífero*. (Figura extraída de **Histología y biología celular: introducción a la anatomía patológica** de A. Kierszenbaum, 2ª ed, 2008).

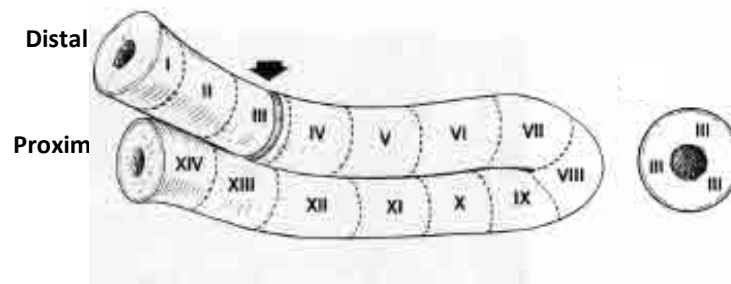


Figura 11. *Esquema de un túbulo seminífero con los estadios designados en números romanos.* La sección proximal es la más cercana a la rete testis. Con la flecha se indica el sitio en el cual si se realiza un corte perpendicular al TS, se obtiene una sección transversal en la que se observa sólo un estadio de la espermatogénesis en toda su superficie (Figura extraída de <http://www.infertile.com/inthenew/sci/maleage.htm>).

2.2. La pared del túbulo seminífero

2.2.1. Las células endoteliales.

Las CE constituyen una monocapa continua por encima de las células MP que puede identificarse por microscopía electrónica de transmisión (MET). Las CE son mononucleadas, poseen una forma poligonal y se encuentran adheridas al TS por medio de la interacción con el colágeno de la matriz extracelular. Tanto las membranas plasmáticas como el citoplasma poseen abundantes caveolas que intervienen en el transporte de sustancias (Figura 12). Debido a las escasas organelas para la síntesis de lípidos y proteínas y a la carencia de filamentos contráctiles, el rol funcional que estas células desempeñan en el TS permanece aún incierto.

2.2.2. Las células mioides peritubulares

Se ha propuesto que las células MP derivan de una población de células mesenquimáticas del intersticio que además de las células MP darán lugar a otras células, tales como los fibroblastos (Leeson y Leeson 1963; Ross 1967). Las células MP están presentes en todas las especies de mamíferos, pero exhiben diferencias en su modo de organización según la especie animal (Bustos-Obregon 1976). En los roedores adultos estas células cuya morfología es poligonal aplanada se disponen en una sola capa, mientras que en el hombre lo hacen en varias capas. La monocapa de células MP se denomina también “interlamelar” por estar en contacto con dos membranas basales propias, una membrana basal interna, dirigida hacia el epitelio germinativo y una membrana basal externa, dirigida hacia el intersticio (Figura 12) (Hadley y Dym 1987; Yazama y col. 1997).

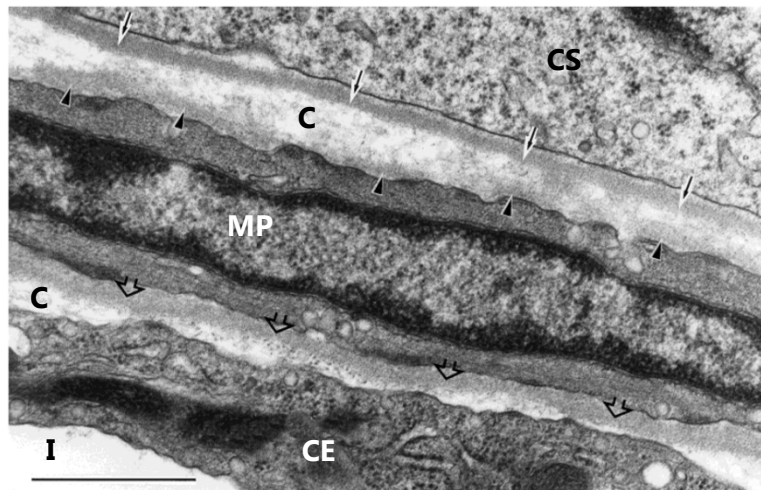


Figura 12. *Pared del TS. Micrografía electrónica de una sección longitudinal del TS de rata adulta.* CS: célula de Sertoli, MP: célula MP, CE: célula endotelial, C: fibras de colágeno, I: intersticio. **Flecha sólida:** Membrana basal (MB) del epitelio germinativo, **cabeza de flecha:** MB interna de la célula MP, **flecha abierta:** MB externa de la célula MP. Barra: 1 µm (Figura extraída de Yazama y col. 1997).

2.2.2.1. *Propiedades de las células MP*

Estudios *in vitro* han demostrado que las células MP secretan un número de sustancias que incluyen componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento, algunos de los cuales estimulan en forma paracrina la secreción de las células de Sertoli.

Durante mucho tiempo las células MP fueron consideradas como células mioepiteliales (Clermont 1958) o como miofibroblastos (Bock y col, 1972) debido a las características ultraestructurales que esta célula exhibe, tales como la presencia de numerosos microfilamentos con densidades focales en el citoplasma. Sin embargo, a partir de la evidencia que surgió sobre la existencia de una membrana basal propia a su alrededor sumado al posicionamiento central de sus organelas (característica de las células musculares) y a la presencia de caveolas en las membranas plasmáticas, se propuso que las células MP eran un tipo de células musculares lisas (Lacy y Rotblat 1960; Leeson y Leeson 1963; Ross 1967). A medida que avanzaron los conocimientos sobre los marcadores del citoesqueleto específicos de la célula muscular, se pudo determinar que las células MP no sólo expresan α -actina, sino también miosina-CMP (un isotipo de miosina con alta homología a la miosina II de músculo liso, pero cuyos filamentos se desensamblan a baja temperatura) y desmina (filamentos intermedios indicadores del linaje muscular) (Fernández y col. 2008; Tung y Fritz 1990; Virtanen y col. 1986). Estas contribuciones respaldan la nueva clasificación propuesta para la célula MP, que al igual que cualquier célula muscular exhibe propiedades contráctiles (Niemi y Kormano 1965). La principal función biológica atribuida a la contracción de las células MP es la generación de impulsos para la progresión de los espermatozoides y del fluido testicular hacia la rete testis, una función crucial para la fertilidad masculina (Tung y Fritz 1990). Se ha descrito que el grado de

contracción de los TSs está relacionado con los estadios del ciclo espermatogénico, siendo más contráctiles los segmentos correspondientes a los estadios IV-V y XIII-I (Harris y Nicholson 1998). Sin embargo, todavía no se conoce de qué forma se contraen y cómo se coordinan las células MP para llevar a cabo esta función.

Vogl y col. (1985) y Maekawa y col (1996) sostuvieron a partir de los experimentos realizados por inmunofluorescencia que los filamentos de actina (FA) en las células MP de los testículos de rata adulta se disponen ortogonales, es decir que existen FA paralelos y transversales al eje del TS que forman una malla regular entretrejida. Sin embargo, trabajos realizados en nuestro laboratorio indicaron que los FA en las células MP no se organizaban de esta manera.

2.2.2.2. Regulación de la contracción

En las células musculares lisas la contracción depende de los cambios que se producen en la concentración de Ca^{+2} intracelular. En el testículo, la regulación de la contracción de los TSs se realiza por medio de un control endocrino-paracrino, en ausencia aparente de terminales nerviosas. Entre los agonistas de la contracción del testículo se encuentra la endotelina-1 (ET-1), un péptido de 21 aminoácidos sintetizado por las células de Sertoli que se une a los receptores presentes en las células MP. Existen evidencias que ET-1 promueve la contracción de las células MP tanto del TS como de los cultivos primarios (Filippini y col. 1993; Tripiciano y col. 1996, 1997, 1998).

Hay dos subtipos distintos del receptor de la ET-1 que se expresan en las células MP: $ET_A R$ y $ET_B R$. Ambos subtipos consisten en receptores asociados a proteína G trimérica. A partir de agonistas y antagonistas selectivos de los receptores de la ET-1, se pudo determinar diferencias en las vías de transducción de señales asociadas a cada receptor. El $ET_A R$ luego de ser estimulado desencadena oscilaciones de Ca^{+2} por medio de vías *dependientes* de IP_3 , mientras que el $ET_B R$ moviliza Ca^{+2} a través de vías *independientes* de IP_3 (Tripiciano y col. 1997). Diversas observaciones sostienen que los $ET_A R$ y $ET_B R$ junto con su ligando unido, se localizan en las caveolas (Chun y col. 1994; Cui y col. 2010; Yamaguchi y col. 2003).

De acuerdo a la clasificación de las células MP como células musculares lisas y al poco conocimiento que existe sobre su citoesqueleto y su modo de contracción, evaluaremos durante esta tesis la organización tanto del aparato contráctil como de otras estructuras celulares que están implicadas en la respuesta de la célula MP a estímulos constrictores. Para ello, tomaremos como base las características y el comportamiento de las células musculares lisas típicas.

2.3. Desarrollo del testículo

En los animales euterios el desarrollo temprano del embrión es similar en ambos sexos hasta el estadio fetal, cuando machos y hembras embarcan trayectorias diferentes en cuanto al tipo de regulación genética y el modo de organización celular que se desencadena, ya sea para dar lugar al testículo o al ovario.

En los mamíferos, la cresta genital aparece dentro de la cavidad celómica a lo largo de la superficie del mesonefros. En el ratón este proceso sucede en el día 10 post coito (pc) cuando se produce el reclutamiento de células somáticas desde el epitelio celómico.

La cresta genital es bipotencial, ya que puede diferenciarse en testículo o en ovario según las señales genéticas. En una cresta genital XY se expresa el gen *Sry* (ligado al cromosoma Y) que induce la expresión de *Sox9* y así la diferenciación del testículo. Sin embargo, la cresta genital XY puede ser inducida a diferenciarse como ovario por delección o malfuncionamiento de los genes *prottestículo* *Sry* y *Sox9*, mientras que una cresta genital XX puede ser inducida a desarrollarse como testículo si se expresan estos genes (Svingen y Koopman 2013). En ausencia del gen *Sry*, la diferenciación en ovario se inicia por la acción de los genes *Rspo1* y *Wnt4* (Figura 13 y 14).

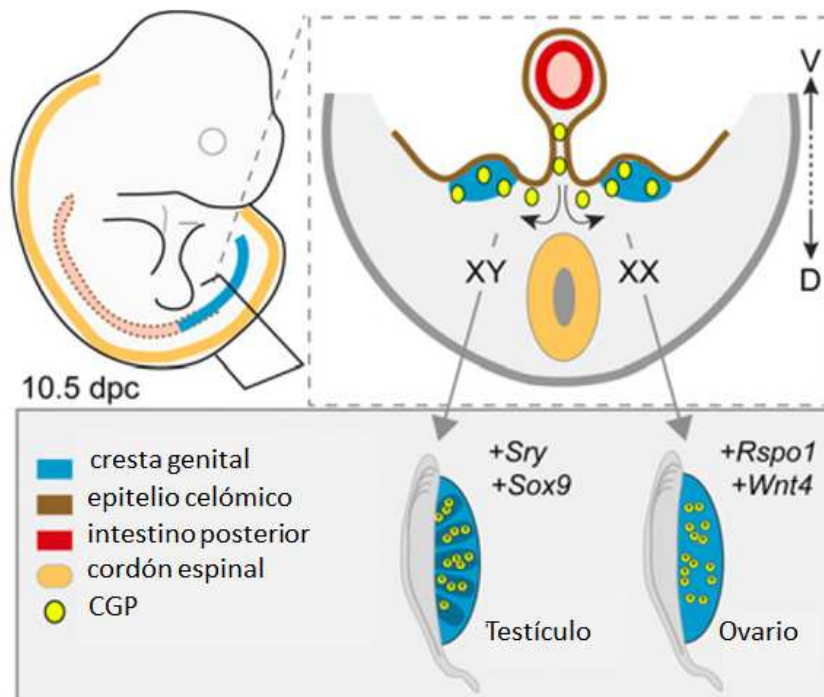


Figura 13. Establecimiento de la cresta genital bipotencial y determinación del sexo de la gónada. (D) Dorsal; (V) ventral. (Figura extraída de Svingen y Koopman 2013)

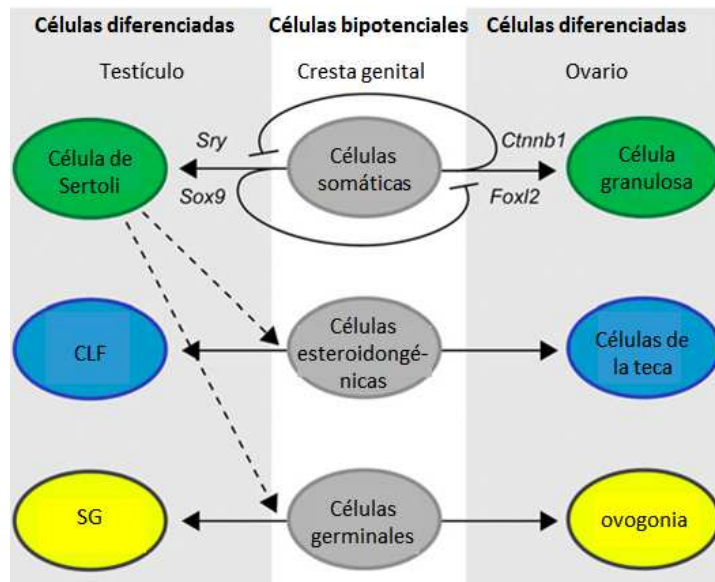


Figura 14. **Determinación del sexo.** En las gónadas XY aún indiferenciadas las células somáticas de la cresta genital expresan *Sry* y luego *Sox9*, lo que induce su diferenciación en célula de Sertoli. En ausencia de *Sry* y *Sox9*, como sucede en una cresta genital XX, las mismas células precursoras se diferencian a células de folículos bajo la influencia de los genes codificantes de factores de transcripción como *Ctnnb1* y *Foxl2*. Además de promover la diferenciación de la célula de Sertoli, *Sry* y *Sox9* suprimen la vía de señalización que desencadena la diferenciación celular específica de las hembras. Las células de Sertoli inducen (línea punteada) a otras células a que se diferencien a células de Leydig fetales (CLF) esteroidogénicas que de otra manera se diferenciarían a células de la teca del ovario. Por otro lado, las células de Sertoli inducen el comienzo de la vía espermatogénica, la cual es opuesta a la vía de diferenciación a ovocito. (Figura extraída de **Svingen and Koopman 2013**)

Durante el proceso embrionario, los testículos en desarrollo sufren en su organización una serie de cambios que transforman la cresta gonadal en un órgano altamente estructurado. En los embriones de ratones esta metamorfosis se inicia en el día 10 pc debido a la expresión de gen *Sry* en las células somáticas bipotenciales. Esto provoca un incremento en la expresión de *Sox9*, lo que induce la diferenciación de estas células a células de Sertoli (Sekido y col. 2004; Wilhelm y col. 2005).

Entre el día 11 y el día 12 pc las células de Sertoli se agrupan alrededor de las gonocitos que han migrado a la cresta genital en el día 10 pc. Es necesario mencionar que la formación del cordón no depende de la presencia de células germinales como un disparador, sin embargo, este proceso no debe desencadenarse hasta que las células germinales primordiales hayan alcanzado la gónada. Los grupos de células de Sertoli que encierran a los gonocitos son particionados por las células endoteliales vasculares que migran desde el mesonefros y que invaden la gónada para establecer la vasculatura arterial primitiva. A partir de la proliferación de las células de Sertoli, crece la estructura del cordón seminífero macizo y alrededor del día 13 pc se rodea de células fusiformes (Figura 15). Wainwright y Wilhelm (2010) proponen que las células de Leydig fetales y las células MP se originan de una población común de células precursoras multipotentes que está presente en el

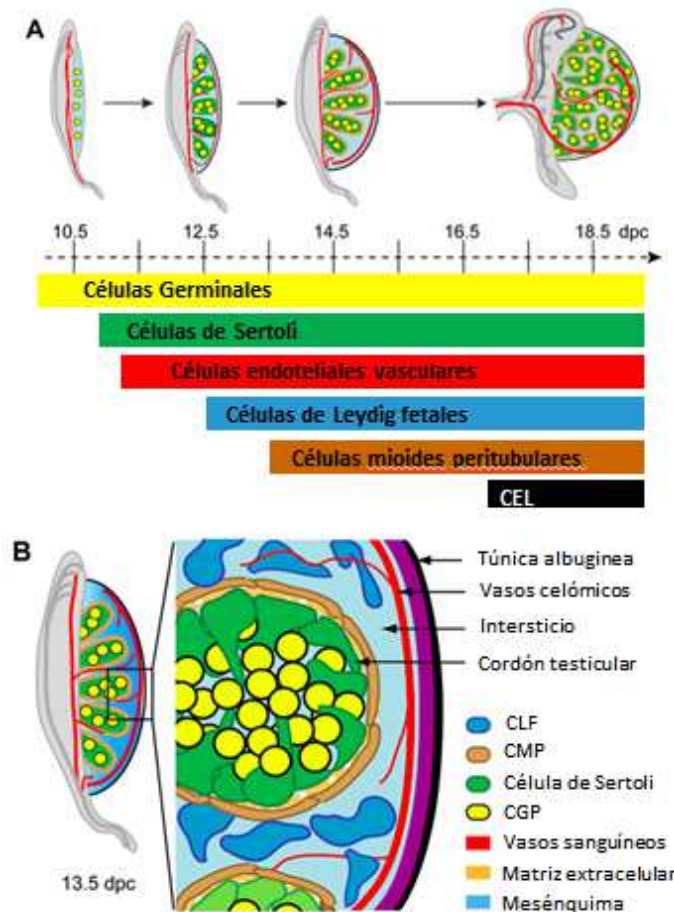


Figura 15. *Desarrollo del testículo del ratón*. **A**. Esquema de la diferenciación de los linajes celulares durante la organogénesis testicular. Previo a la especificación del testículo, las crestas genitales son colonizadas por células germinales primordiales (CGP). La primera célula somática en diferenciarse es la célula de Sertoli, mientras que las últimas en hacerlo son las células endoteliales linfáticas (CEL). **B** Arquitectura del testículo fetal. A los 13.5 dpc el testículo está compartimentalizado en cordones seminíferos y en espacio intersticial, con la mayoría de los tipos celulares que se encuentran en un testículo maduro en su lugar. En ese momento, la túnica albugínea ha comenzado a desarrollarse. (Figura extraída de **Svingen y Koopman 2013**)

intersticio testicular, pero cuyo destino final depende de la localización física que estas células tienen dentro del testículo. De esta manera, una estrecha proximidad a la célula de Sertoli favorecería la diferenciación de una población de células fusiformes a células MP, mientras que el resto se diferenciará a células de Leydig. Por otro lado, Combes y col. (2009) proponen que las células MP se originan a partir de una población de células mesenquimáticas provenientes del mesonefros (Figura 16). A pesar de los avances en este área, poco se conoce sobre el origen de las CE que forman parte de la pared de los TSs.

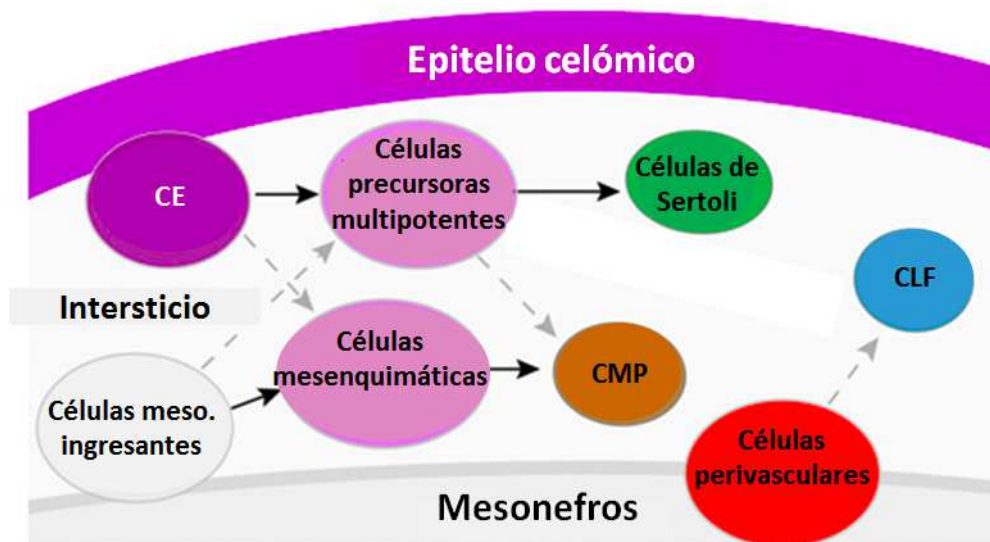


Figura 16. *Orígenes propuestos para los linajes celulares del testículo.* Las células de las crestas genitales se originan primariamente del epitelio celómico pero también del mesonefros subyacente. Un conjunto de células epiteliales (CE) se diferencian a células de Sertoli luego de la expresión de Sry. Es probable que las células provenientes del mesonefros contribuyan al mesénquima. Las células MP (CMP) pueden originarse tanto a partir de unas células mesenquimáticas como también de un precursor de células multipotentes presente en el intersticio testicular. Se propone un origen para las a células de Leydig fetales (CLF) que incluye a las células perivasculares localizadas en la unión entre la gónada y el mesonefros. (Figura extraída de Svingen y Koopman 2013).

En el momento del nacimiento los cordones seminíferos macizos están formados por células de Sertoli inmaduras que se encuentran en la base del cordón y por gonocitos centrales. La pared que rodea a los cordones, descrita en muchos trabajos como tejido limitante, consiste en varias capas de células fusiformes con características estructurales similares.

En la rata la espermatogénesis comienza alrededor del día 9 postnatal (pn) y dura aproximadamente 49 días. Los primeros espermatozoides se liberan al epitelio seminífero alrededor del día 60, de tal manera que la madurez sexual en las ratas se alcanza aproximadamente a los dos meses de edad.

Existen numerosas investigaciones sobre el desarrollo de varios parámetros morfológicos de la pared del cordón/TS (Dym y Fawcett 1970; Korman y Hovatta 1972; Leeson y Leeson 1963; Ross 1967). En esta tesis evaluaremos la maduración de la célula MP durante el desarrollo postnatal, con un principal interés en los cambios de morfología que experimenta durante el primer mes de vida, en el modo de organización de su citoesqueleto y en el inicio de su actividad contráctil.

Capítulo 2

OBJETIVOS

Objetivo General: *Caracterizar la estructura contráctil de las células mioides peritubulares desde la rata neonata a la adulta.*

Objetivos Específicos

En testículos de ratas adultas (A)

- 1A. Determinar la morfología y la organización del citoesqueleto de actina y miosina de las células MP.
- 2A. Describir la distribución que adoptan ciertas proteínas que están implicadas en la regulación de la contracción, tales como Cav-1, receptores de ET-1 y transportadores de calcio del retículo endoplasmático en la célula MP.
- 3A. Determinar los cambios que se producen en el TS y en las células MP por el tratamiento con ET-1 en ausencia y presencias de antagonistas.

En testículos de ratas en desarrollo (D)

- 1D. Interpretar cómo se adapta la célula MP a los cambios que se producen en los cordones seminíferos durante el desarrollo testicular postnatal.
- 2D. Describir la morfología de la célula MP junto con la aparición y disposición de sus filamentos de actina durante el desarrollo postnatal. Determinar el momento en que comienza la respuesta contráctil al estímulo de ET-1.

Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación:

Los procedimientos que se usaron en la experimentación con animales fueron evaluados y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas perteneciente a la Universidad Nacional de Cuyo.

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de 0 a 30 días pn (*en desarrollo*) y de 2 a 3 meses pn (*adultas*) provenientes del bioterio de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UN-Cuyo. Los animales se mantuvieron con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y alimentación *ad libitum* de acuerdo con la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud (NIH, Estados Unidos). La eutanasia de los animales se realizó por medio de inhalación de CO₂.

Aislamiento de cordones/túbulos seminíferos:

Para cada experimento se extrajeron los testículos de una rata y luego de la remoción de la túnica albugínea, los cordones/TSs se disgregaron mecánicamente en presencia de medio de cultivo DMEM/F12 con el fin de conservar la viabilidad celular.

Estandarización de la digestión enzimática de la capa de células endoteliales de la pared de los TS:

Un grupo de TSs disgregados en medio DMEM/F12 se incubó durante 5, 10, 20 o 30 minutos con colagenasa (disuelta en medio de cultivo sin suero fetal bovino) en concentraciones de 0,5 mg/ml ó 1 mg/ml. Al finalizar cada período de incubación, las muestras se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS o con glutaraldehído al 5% en buffer cacodilato durante 20 minutos a 37°C. Las muestras fijadas con paraformaldehído se procesaron según el protocolo de inmunofluorescencia para la detección de α -actina y de β -actina y se observaron en el microscopio confocal a fin de seleccionar las condiciones óptimas de digestión (concentración de colagenasa y tiempo de incubación ideales). Las muestras digeridas óptimamente se conservaron para su posterior procesamiento según la técnica de microscopía electrónica de barrido (para más detalles ver el apartado 4.1.1.2.2.2, página 48).

Filmación in vitro de TS inducidos a contraerse con ET-1:

Un grupo de TSs aislados se mantuvo a 37°C en medio D-MEM/F12 para preservar la viabilidad celular. En la lupa de transiluminación Nikon SMZ10 se separaron segmentos de TSs que posteriormente se colocaron en portaobjetos sobre una platina Nikon con termostato a fin de mantener

constante la temperatura de 37°C. Se tomaron fotografías de los TSs antes de ser expuestos al estímulo contráctil con una cámara Panasonic Color CCD, GP-KR222 (Matsushita Communication Industrial Co. Ltd). Posteriormente, se colocaron unas gotas de ET-1 50 nM sobre los TSs en estudio, instante en el que se comenzaron a tomar fotografías cada 2 segundos para registrar los cambios que se producían por el tratamiento. Las imágenes se procesaron en el programa Image J (Media Cybernetics Inc.) (Rasband W.S.).

Contracción de los cordones/túbulos seminíferos con ET-1:

Un grupo de 100 cordones o TSs disgregados en medio DMEM/F12 (sin o con digestión enzimática previa, según corresponda) se incubó sin (control) y con ET-1 50 nM durante 5 minutos (muestras de animales adultos) o durante 10 min (muestras de animales en desarrollo) a 37°C. En ambos casos, las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos a 37°C para su estudio por microscopía confocal y con glutaraldehído al 5% en buffer cacodilato para su estudio por microscopía electrónica de transmisión y de barrido. Este experimento se repitió tres veces.

Contracción de los túbulos seminíferos con ET-1 en presencia de sus análogos no funcionales:

Se separó una serie de TSs en cinco grupos de tratamientos. Cada uno de ellos contenía 100 segmentos de TSs que se preincubaron durante 20 minutos a 37°C con medio DMEM/F12 (*grupos 1 y 2*), medio DMEM/F12 con BQ-123 50 nM (antagonista selectivo para el receptor ET_AR, *grupo 3*), medio DMEM/F12 con BQ-788 50 nM (antagonista selectivo para el receptor ET_BR, *grupo 4*) o medio DMEM/F12 con BQ-123 y BQ-788 (*grupo 5*). Luego de tres lavados con PBS, se tomaron fotografías en la lupa estereoscópica para registrar a los TSs antes del tratamiento con ET-1. Posterior a esto, el grupo 1 se incubó nuevamente con medio DMEM/F12, mientras que los grupos 2-5 se incubaron con ET-1 50 nM durante 5 minutos a 37°C. Se volvieron a tomar fotografías en la lupa estereoscópica, se recuperaron las muestras y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS para su posterior observación en el microscopio confocal. Este experimento se repitió tres veces.

Microscopía Electrónica de Transmisión:

Para cada experimento, se extrajeron porciones de testículo con cordones o TSs que se fijaron con glutaraldehído 5% en buffer cacodilato 0.1 M (pH 7,4) a 37 ° C durante 20 minutos y luego a 10 ° C por 2 horas. Las muestras se lavaron nuevamente en el mismo buffer y se postfijaron a temperatura ambiente por 1 hora con una solución que contenía tetróxido de osmio al 1% y ferrocianuro de potasio al 1% (Karnovsky, 1971). Luego de una serie de lavados con buffer cacodilato, las muestras

se deshidrataron con soluciones que contenían un gradiente creciente de acetona (50%, 75%, 90%, 100%, 100%) para finalmente ser incluidas en resina de baja viscosidad (Pelco International, CA. Spurr, 1969). Las muestras se polimerizaron en una estufa a 70°C durante 48 horas. Mediante la utilización de un ultramicrotomo Leica Ultracut R se obtuvieron secciones de 1 µm y de 60 nm de espesor. Las secciones de 1 µm se tiñeron con una solución de azul de toluidina en borato de sodio para su posterior observación en el microscopio óptico, mientras que los cortes de 60 nm se recogieron en grillas de cobre que se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963). Las grillas así procesadas se observaron en el microscopio electrónico de transmisión Zeiss 900.

Microscopía Electrónica de Barrido:

Para cada experimento, de las muestras que se fijaron con glutaraldehído al 5% en buffer cacodilato se aislaron TSs por disgregación mecánica en la lupa de transiluminación, los cuales se deshidrataron en soluciones que contenían un gradiente creciente de acetona. Luego de realizarles el punto crítico de CO₂, se metalizaron con oro y se observaron en el microscopio electrónico de barrido EVO 40 VP perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica del Centro Científico Tecnológico de Bahía Blanca.

Inmunofluorescencia:

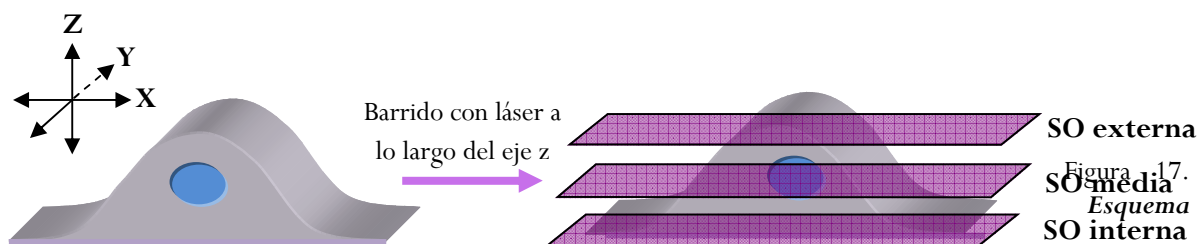
Para cada experimento, muestras de 100 cordones o TSs fijados con paraformaldehído, fueron lavadas con PBS (3 x 10 minutos), incubadas 30 min en NH₄Cl 50 mM en PBS, enjuagadas con una solución de lavado compuesta por saponina al 0.05% y BSA al 0.2% en PBS (3 x 10 min) e incubadas durante 12 horas a 4°C con Faloidina o con alguno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-α-actina conjugado con FITC, anti-β-actina, anti-miosina de músculo liso tipo II, anti-caveolina-1, anti-ET_AR, anti-ET_BR, anti-IP₃R y anti-RyR3. Posteriormente, se realizó la incubación con el Ac secundario correspondiente (anti-IgG de ratón conjugado con Cy3 o anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (Tabla 1). Para corroborar la especificidad de los anticuerpos secundarios, los ensayos se repitieron sin la presencia del anticuerpo primario. Se embebieron las muestras en medio de montaje NP-galato para luego observarlas en un microscopio confocal OLYMPUS FV-1000 con un lente Paplon 60X. Se incluyeron controles negativos apropiados para asegurar la especificidad de la tinción observada.

Anticuerpo	Dilución	Origen	Marca
<i>Anti-α-actina-FITC</i>	1/500	Ratón	Sigma- Aldrich
<i>Anti-α-actina-Cy3</i>	1/500	Ratón	Sigma- Aldrich
<i>Anti-β-actina</i>	1/500	Ratón	Sigma- Aldrich
<i>Anti-Cav-1</i>	1/200	Conejo	Santa Cruz
<i>Anti-ET_AR</i>	1/400	Ratón	Santa Cruz
<i>Anti-ET_BR</i>	1/400	Conejo	Santa Cruz
<i>Anti-IP₃R</i>	1/100	Rabbit	Pierce Antibody
<i>Anti-miosina de músculo liso tipo II</i>	1/800	Ratón	Santa Cruz
<i>Anti-RyR3</i>	1/400	Conejo	Alomone
<i>Anti-IgG de ratón- Cy3</i>	1/200	Cabra	Jackson
<i>Anti-IgG de conejo- Alexa 488</i>	1/200	Cabra	Invitrogen
<i>Anti-IgG de conejo- Cy3</i>	1/200	Cabra	Jackson

Tabla 1. Lista de Anticuerpos utilizados.

Captura de imágenes en el microscopio confocal:

Por medio de la función Z-stack del microscopio confocal se analizaron los cordones/TSS procesados según la técnica de inmunofluorescencia en donde se tomaron secciones ópticas (SOs) secuenciales cada 200 nm. La primera SO se tomó en el nivel más profundo de las células MP (cerca del epitelio seminífero) mientras que las siguientes SOs se tomaron hasta alcanzar el nivel más superficial de las células MP o de la CE (cerca del intersticio), según corresponda (Figura 17).



representativo del modo de operación de la función Z- stack. El láser escanea la muestra (ej.: célula) a lo largo del eje Z generando secciones ópticas con un grosor determinado que pueden ser integradas para obtener una reconstrucción tridimensional de la muestra.

Parámetros morfológicos:

En los cortes histológicos transversales de 1 μ m de los cordones/TSS de los animales en desarrollo, se evaluó la aparición de la luz tubular, el número de capas de células que conformaban la pared

peritubular, la forma de la célula MP de canto y su grado de proliferación. En las fotos tomadas en el microscopio óptico se midió el diámetro de los cordones/TS por medio del programa Image J.

Por otro lado, en fotos de 30 TSs de animales adultos tomadas en la lupa estereoscópica, se midió el diámetro tubular y su longitud, mientras que en las imágenes tangenciales tomadas en el microscopio confocal de 50 TSs teñidos con anticuerpos anti- α -actina, se midió por medio del programa Image J el área celular y los diámetros x e y (paralelo y perpendicular al eje principal del TS, respectivamente) de 10 células MP por segmento de TS (Figura 18). Los datos se analizaron estadísticamente con el programa Graphad Prism 5 mediante pruebas de t student. Se consideró un valor de $p \leq 0,05$ como significativo. Los resultados se expresaron como media \pm ESM (error estándar medio) de tres experimentos.

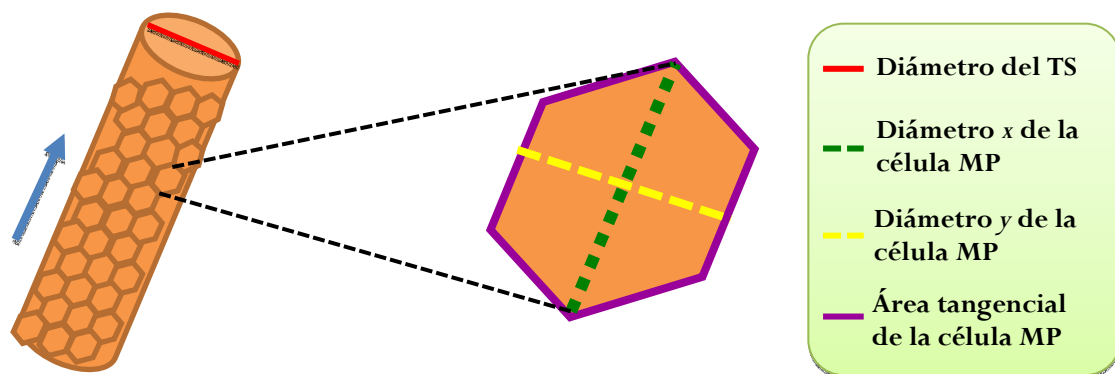


Figura 18. Esquema representativo de un TS donde se indican los distintos parámetros de medición del TS y de la célula MP (ampliación, derecha). Flecha: Eje longitudinal del TS.

Análisis cuantitativo de colocalización:

El análisis de colocalización se realizó con la aplicación JACoP del programa Image J de acuerdo a Bolte y Cordelières (2006). Se deconvolucionaron imágenes de 100 células MP provenientes de 20 segmentos de TS teñidos con la combinación de anticuerpos primarios anti- α -actina y anti-miosina II de músculo liso, anti- α -actina y anti- Cav-1, anti- α -actina y anti-ET_AR o ET_BR, anti- α -actina y anti- IP₃R o RyR3. Se generaron las funciones de dispersión de los puntos específicos de cada canal y la relación señal/ruido se ajustó hasta que las imágenes deconvolucionadas estaban libres de ruido. Se calcularon dos coeficientes de correlación: Pearson (PCC) y Mander (MCC). Para el cálculo de PCC, se midió la dependencia de píxeles en las imágenes de dos canales (canal verde y rojo para los filamentos de actina y los filamentos de miosina, para los filamentos de actina y Cav-1, para los filamentos de actina y los receptores de ET-1 o para los filamentos de actina e IP₃R/RyR3, respectivamente). Los valores de los píxeles de las dos imágenes se muestran en un diagrama de distribución de píxeles (gráfico de dispersión). Por medio de una regresión lineal se calculó la relación exis-

tente entre las intensidades de las dos imágenes. Además, se obtuvo la función de correlación cruzada (CCF) donde se representa la variación de los PCC según el desplazamiento de píxeles ($\hat{\delta}x$) en la dirección x de la imagen verde respecto de la imagen de color rojo. El valor real del PCC se estima a $\hat{\delta}x=0$, varía entre 1 y -1, donde el valor 1 indica correlación completa mientras que -1, correlación negativa. El coeficiente MCC aportó dos datos, MCC-M1 y MCC-M2, que fueron útiles para describir la fracción de filamentos de actina que colocalizaba con la de los filamentos de miosina y la fracción de filamentos de miosina que colocalizaba con la de los filamentos de actina, respectivamente. De la misma manera se evaluó la colocalización de caveolina-actina, de actina-ET_AR/ET_BR y de actina-IP₃R/RyR3. Los valores de MCC varían entre 0 y 1, correspondientes a imágenes que no colocalizan o que colocalizan completamente.

Ensamblaje de la molécula de miosina de las células MP:

Para confirmar el efecto de las bajas temperaturas en el ensamblaje de los filamentos de miosina por microscopía confocal, se incubaron segmentos de TSs en PBS a 4°C o a 37°C durante 10 minutos. Los TSs de los tratamientos a 4°C y a 37°C se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min a 4°C o a 37°C, respectivamente. Posteriormente las muestras se trataron según el protocolo de inmunofluorescencia para la marcación de actina y miosina.

Para analizar por Western Blot el ensamblaje de miosina en las células MP se utilizó el procedimiento descrito por Fernández y col. (2008). Brevemente, 0,5 g de TSs tratados en PBS a 4°C y a 37°C se mantuvieron a 4°C y a 37°C, respectivamente, durante todo el procedimiento que consistió en la homogenización de la muestra con 1 ml de buffer PMEE (PIPES 35 mM, MgSO₄ 5mM, EGTA 1 mM y EDTA 0,5 mM, pH 7,4) con cóctel de inhibidores de proteasas y en una centrifugación a 14 000 g durante 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante (S1) que contenía la fracción de miosina soluble mientras que el precipitado (P1) que contenía la fracción de filamentos de miosina se resuspendió con 1 ml de buffer PMEE de alta fuerza iónica (buffer PMEE al que se le adicionó KCl 0,6 M) para desensamblar los filamentos de miosina. Luego, se centrifugaron las muestras a 4°C para la obtención del sobrenadante (S2) y del precipitado (P2). Se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7,5%, 7 µl de los sobrenadantes S1 y S2 de cada condición que posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Luego, la membrana se bloqueó por 30 minutos con la solución de leche descremada al 5% en PBS-tween. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-miosina II de músculo liso (1/500, ver tabla) durante 12 horas a 4°C. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson, dilución 1/2000) durante 2 horas a 25°C. Para el revelado se utilizó el reactivo qui-

mioluminiscente SuperSignal West Pico de Pierce/Thermo Scientific de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Depleción de colesterol en las células MP

Un grupo de TSs disgregados en medio DMEM/F12 se incubó en presencia del compuesto β - metil ciclodextrina (β -mCD) (disuelto en medio de cultivo sin suero fetal bovino), en una concentración de 10 mg/ml durante 1 hora. Luego de varios lavados con PBS, los TSs se incubaron en medio DMEM/F12 sin o con ET-1 (ver Contracción de los cordones/túbulos seminíferos con ET-1). Las muestras de TSs se fijaron con paraformaldehído al 4% para su posterior procesamiento según la técnica de inmunofluorescencia. Se analizó por microscopía confocal la distribución de Cav-1 y α -actina en los TSs expuestos o no a β -mCD.

Capítulo 4

RESULTADOS

SECCIÓN 4.1:

Características del túbulo seminífero de ratas adultas

Por medio del uso de diversas técnicas de microscopía, se describirán las características que posee la pared del TS y la transformación que ésta experimenta por la contracción. A lo largo de esta sección se detallarán las propiedades de las células que forman parte de la pared tubular, en especial las células MP de las que se mostrará la organización del citoesqueleto contráctil junto con la distribución de estructuras y proteínas implicadas en la regulación de la contracción.

4.1.1. Características de la pared tubular

4.1.1.1. Aspecto del túbulo seminífero por lupa de transiluminación.

Cuando se observaron los TSs por lupa de transiluminación se obtuvo un patrón de absorción de la luz que era característico para cada segmento. Cuanto mayor era el nivel de condensación de la cromatina en las espermatídes, mayor era la cantidad de luz absorbida, por lo que cada segmento de TS tenía una apariencia distinta según el estadio de la espermatogénesis en el que se encontraba. El diámetro tubular promedio fue de $315 \pm 3 \mu\text{m}$ independientemente del estadio germinal. Además, las paredes de los TSs presentaron bordes regulares en toda su extensión (Figura 19).

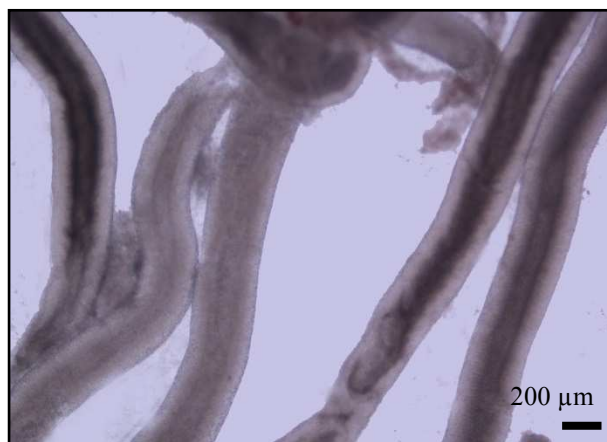


Figura 19. Túbulo seminífero de rata adulta observado por lupa de transiluminación.

4.1.1.2. Observación de la pared del túbulo seminífero por distintos tipos de microscopía

4.1.1.2.1. Microscopía óptica

En los cortes transversales de los TSs teñidos con azul de toluidina y observados por microscopía óptica se diferenciaron, aunque con cierta dificultad, los dos tipos celulares que componen la pared del TS. Las células MP forman una monocapa que se encuentra próxima al epitelio seminífero, mientras que las CE aparecen lindantes al intersticio testicular. Ambas monocapas estaban cons-

tituidas por células planas y fusiformes que tenían un aspecto similar al microscopio óptico, con sus superficies celulares lisas, y con una altura celular a nivel del núcleo de $1,9\ \mu\text{m}$ aproximadamente (Figura 20).

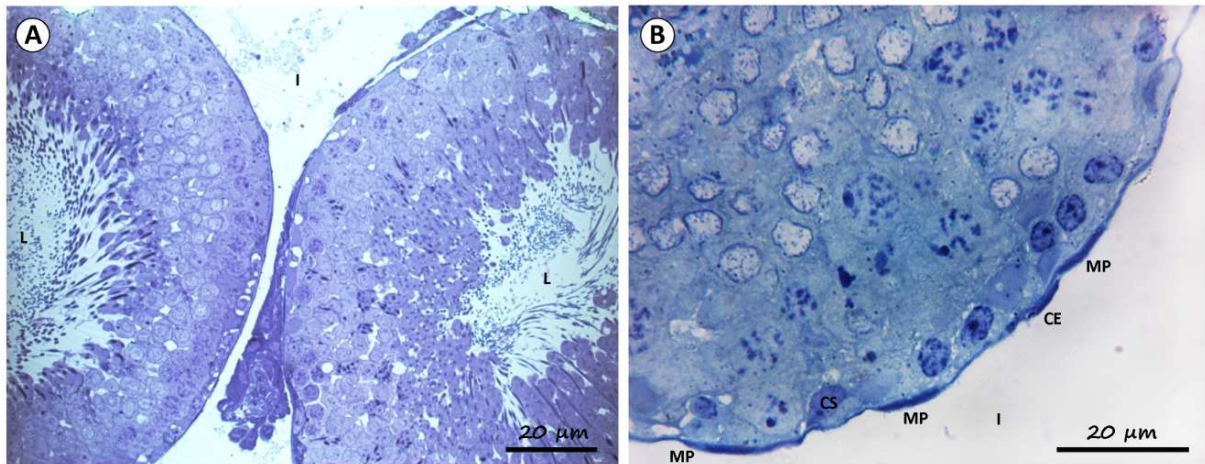


Figura 20. Cortes transversales de túbulos seminíferos de rata adulta teñidos con azul de toluidina y observados por microscopía óptica. **A.** Imagen a menor aumento donde se observa la organización del TS en epitelio germinativo y en pared tubular. **B.** Imagen a mayor aumento de un TS en la que se diferencian los dos tipos de células que componen la pared del TS: células mioides (MP) y células endoteliales (CE). CS: Célula de Sertoli, I: Intersticio, L: Luz tubular.

4.1.1.2.2. Microscopía electrónica de barrido

4.1.1.2.2.1. Superficie de las células endoteliales

En las muestras de los TSs intactos procesados para microscopía electrónica de barrido (MEB), se observó que la superficie del TS estaba tapizada por las CE, poligonales y planas. En la periferia de las CE se logró distinguir el reborde de las uniones intercelulares que se establecían entre ellas, y por tratarse de células muy delgadas, también se identificaron los núcleos protruyentes de éstas. Llamativamente, en algunas zonas del TS las CE estaban parcialmente desprendidas, probablemente como consecuencia de la manipulación de la muestra. Debido a esto, en esos sectores se lograron observar otros componentes de la pared del TS, tales como las fibras de colágeno de la matriz extracelular externa ubicada entre la célula MP y la CE. Además del colágeno, en algunos sectores se distinguió la superficie de las células MP (Figura 21).

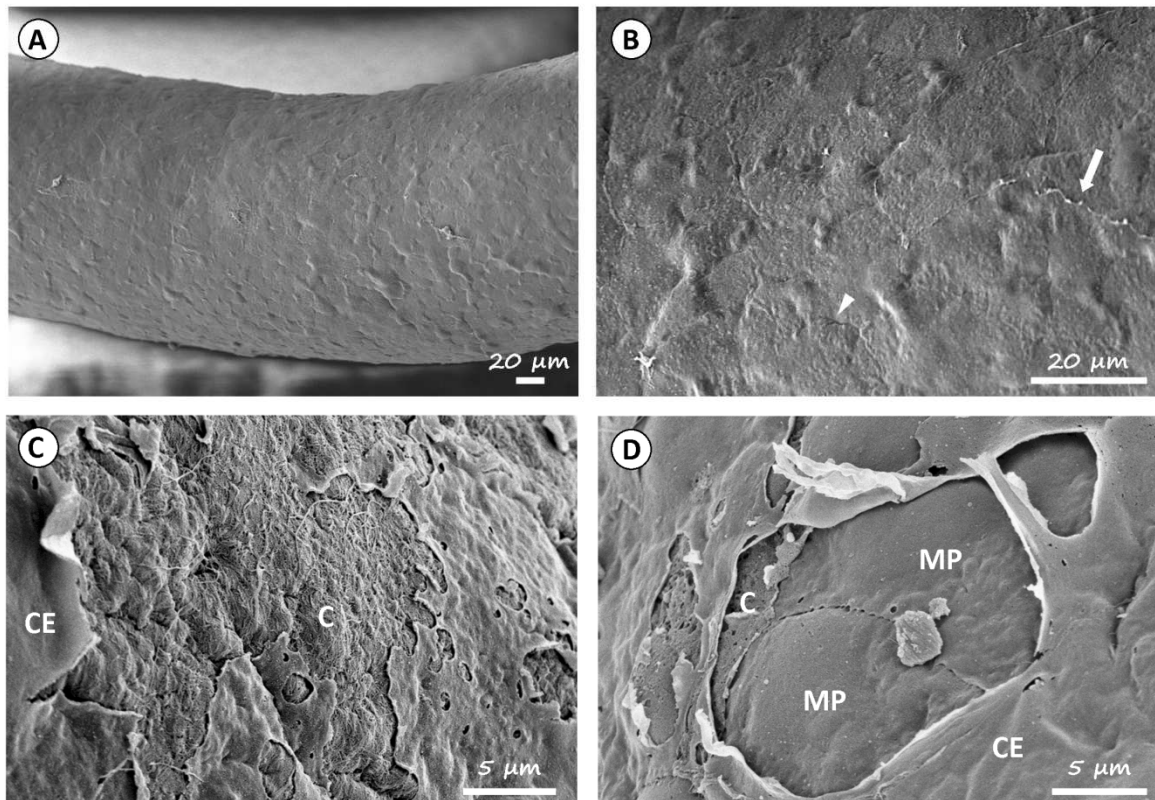


Figura 21. *Microscopía electrónica de barrido de TSs intactos*. **A.** Segmento de TS observado a menor aumento. **B.** Mismo segmento de TS observado a mayor aumento donde se distinguen las uniones intercelulares de las células endoteliales (**flecha**) y las de las células MP (**cabeza de flecha**). **C.** Zona del TS con células endoteliales (**CE**) parcialmente desprendidas donde se identifican las fibras de colágeno (**C**) de la matriz extracelular ubicada entre la monocapa de CE y la monocapa de células mioides (**MP**). **D.** Zona del TS con CE parcialmente desprendidas donde se identifican las fibras de colágeno (**C**) y la unión intercelular de dos células MP.

4.1.1.2.2. *Desprendimiento enzimático de las células endoteliales*

Debido a que en nuestro modelo de estudio las CE tapizan de una manera completa el TS, resulta imposible observar por medio de esta técnica a las células MP en toda la extensión de un TS intacto. Para observar a las células MP, se puso a punto una técnica de digestión con la enzima colagenasa con el fin de desprender a las CE del TS. Esta enzima aplicada al TS es capaz de degradar el colágeno tanto de la matriz extracelular que se ubica entre el epitelio seminífero y la célula MP como de la que se ubica entre la célula MP y la CE. Debido a esto, un tratamiento digestivo controlado con colagenasa permitirá la remoción de las CE sin afectar a las células MP.

En base a lo detallado en el capítulo de materiales y métodos, se utilizaron concentraciones de 0,5 mg/ml y 1 mg/ml de colagenasa con distintos tiempos de incubación. Para evaluar el efecto de la digestión con colagenasa, se analizaron los TSs provenientes de cada condición por medio de la función Z-stack del microscopio confocal. Para identificar a las células MP se incubaron los TSs tratados con un anticuerpo específico para α -actina (proteína expresada en el TS únicamente en las

células MP), mientras que para reconocer a las CE se utilizó un anticuerpo específico para β -actina (proteína expresada en las CE).

Cuando se observaron los TSs intactos (no digeridos con colagenasa), en la cercanía al epitelio seminífero se reconocieron células poligonales decoradas con el anticuerpo para α -actina, mientras que en la cercanía al intersticio aparecían otras células poligonales, de tamaño heterogéneo, que estaban decoradas con el anticuerpo específico para β -actina. De acuerdo a este patrón, las células más internas correspondían a las células MP, mientras que las más externas correspondían a las CE (Figura 22).

En las muestras de TSs tratados con 0,5 mg/ml de colagenasa durante 5 minutos, sólo se detectaron a las células MP. La ausencia de células decoradas con el anticuerpo para β -actina indicó el desprendimiento de las CE (Tabla 2, Figura 22). Por otro lado, en las muestras que se digirieron con 0,5 mg/ml de colagenasa por más de 5 minutos, se encontraron no sólo células MP pequeñas que tenían sus uniones intercelulares muy alteradas, sino también zonas libres de células MP. De la misma manera, todas las muestras que se trataron con 1 mg/ml de colagenasa mostraron este comportamiento, por lo que en esas condiciones además de la remoción de la capa de CE, las células MP comenzaron a desprenderse del TS (Tabla 2, Figura 22). De acuerdo a estos resultados, se eligió el tratamiento con 0,5 mg/ml de colagenasa durante 5 min como condición óptima de digestión.

	Tiempo (min)	Anti α -actina	Anti β -actina
Sin digestión	---	Célula MP con morfología preservada	CE presentes
Colagenasa 0,5 mg/ml	5	Célula MP con morfología preservada	Parches de CE
	10	Célula MP con morfología alterada	CE ausentes
	20		
	30		
Colagenasa 1 mg/ml	5	Célula MP con morfología alterada	CE ausentes
	10		
	20		
	30		

Tabla 2. *Aspecto de las células de la pared del TS según la concentración de colagenasa y el tiempo de incubación.* Lo resaltado en naranja corresponde a los TSs intactos, en amarillo se representa a los TSs digeridos exageradamente, mientras que lo resaltado en verde representa a los TSs digeridos de una manera óptima.

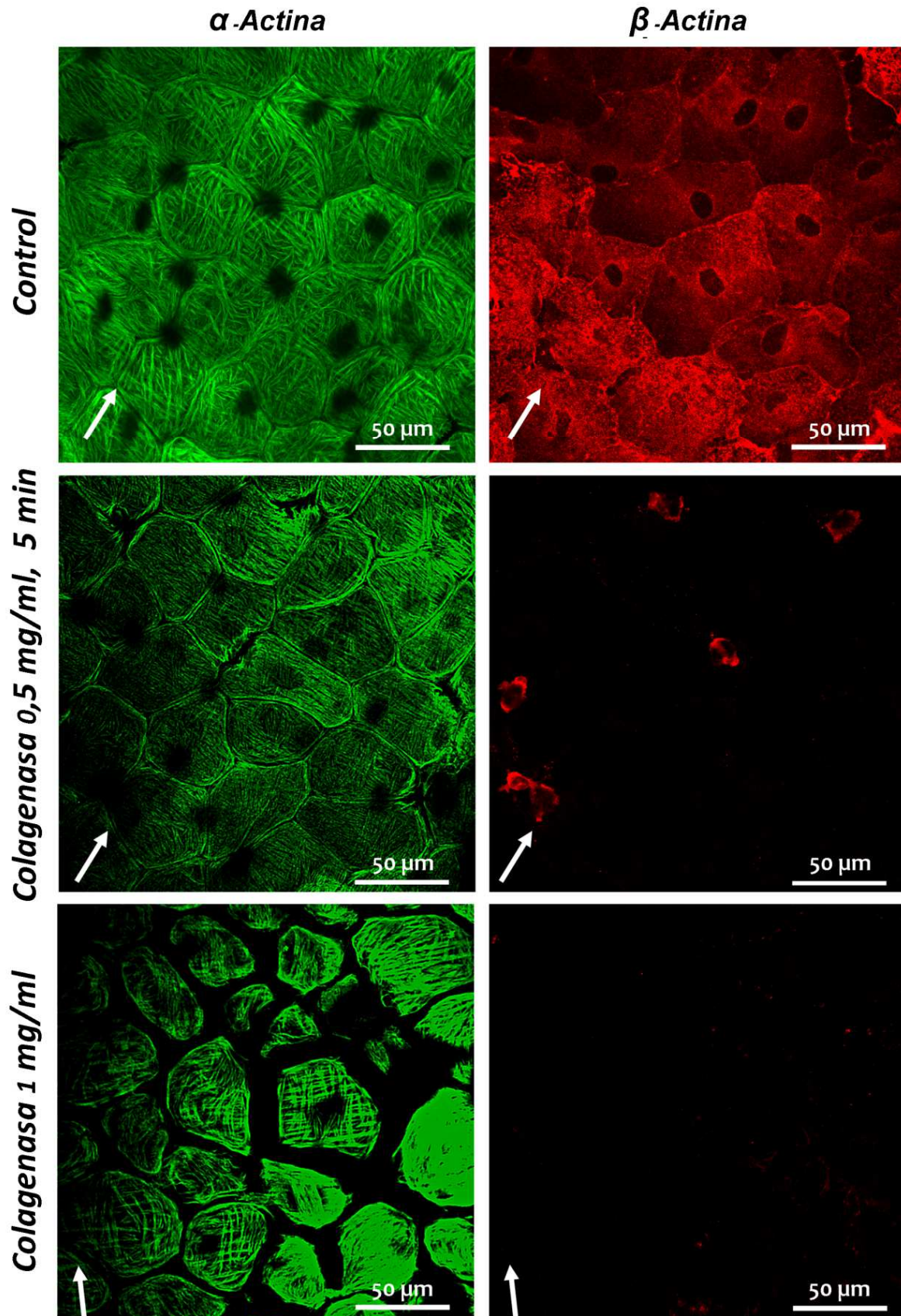


Figura 22. Aspecto por microscopía confocal de las células MP y CE de los TSs intactos y tratados con colagenasa en condiciones de digestión óptima (Colagenasa 0,5 mg/ml, 5 minutos) y de digestión exagerada (Colagenasa 1 mg/ml). Imágenes tomadas en el mismo campo óptico en el nivel de las células MP (α -actina positivas) y en el nivel de las CE (β -actina positivas). Flecha: Eje principal del TS.

4.1.1.2.2.3. Superficie de las células mioides

Cuando se observaron por MEB los segmentos de TSs digeridos con 0,5 mg/ml de colagenasa durante 5 minutos, se notó que en la superficie de los TSs existían escasas zonas que estaban cubiertas por parches de CE y por fibras de colágeno. En la mayor parte de la superficie del TS se observaban con claridad a las células MP, con su superficie lisa y con un aspecto similar al de la figura 22 (Figura 23).

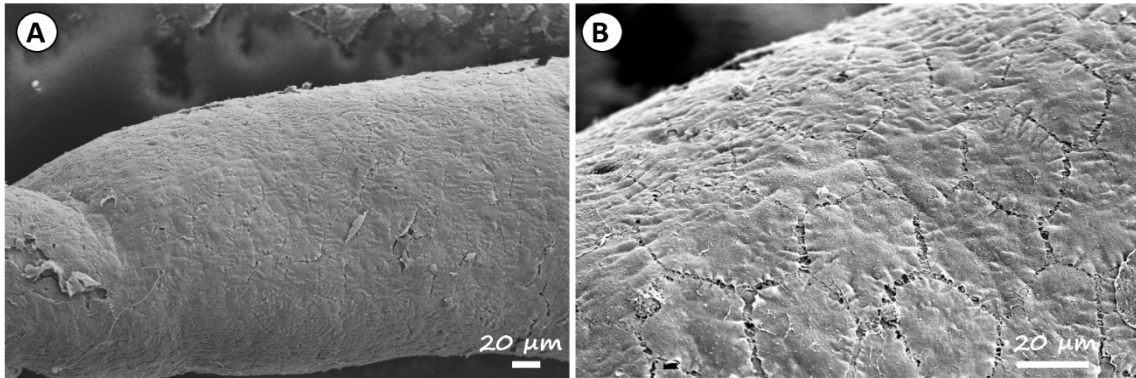


Figura 23. *Microscopía electrónica de barrido de TSs intactos y digeridos con 0,5 mg/ml de colagenasa, durante 5 minutos.* Segmento de TS observado a menor (A) y a mayor aumento (B) donde se distinguen las células MP.

Por lo tanto, a través de una digestión controlada con colagenasa se logra desprender la monocapa de CE sin alterar a las células MP que se encuentran por debajo. De esta manera, queda libre la superficie de las células MP para un análisis más profundo de los eventos que transcurren en su membrana.

4.1.2. Efecto de la contracción con ET-1 en la pared del túbulo seminífero

Se conoce que el TS experimenta contracciones que favorecen el transporte de los espermatozoides inmóviles hacia la rete testis. Sin embargo, no se han descrito los cambios específicos que se producen en la pared del TS una vez que sucede la contracción. Por ello, mediante el uso de diferentes técnicas de microscopía se estudiaron los efectos que se desencadenan en el TS por acción de ET-1.

4.1.2.1. Aspecto del túbulo seminífero por lupa de transiluminación.

Para observar la contracción de los TSs se recurrieron a las imágenes de video tomadas en la lupa de transiluminación mediante las cuales se registraron los efectos inducidos por ET-1 en los TSs.

Transcurridos los primeros 5 minutos del tratamiento con ET-1, el 100 % de los TSs manifestaba signos de contracción. En esos segmentos, se notaron *zonas de contracción* donde el diámetro tubular era de $187,5 \pm 5 \mu\text{m}$, lo que implicaba una reducción aproximada del 50% respecto al diámetro de los TSs controles y zonas donde el diámetro era de $315,8 \pm 8,4 \mu\text{m}$, es decir, similar al de los TSs controles (Figura 24). Además de la presencia de constricciones, los TSs que respondían a ET-1 también experimentaban un acortamiento a lo largo del eje mayor del TS del 17% aproximadamente. Independientemente del estadio germinal del segmento, en los TSs aparecían movimientos ondulatorios que provocaban la expulsión del contenido tubular. Llamativamente, esta expulsión era unidireccional, es decir, ocurría en un solo sentido que coincidía con el sentido de progresión de la onda espermatogénica. Además, en los extremos de los TSs tratados con ET-1 aparecían eversiones del tejido tubular.

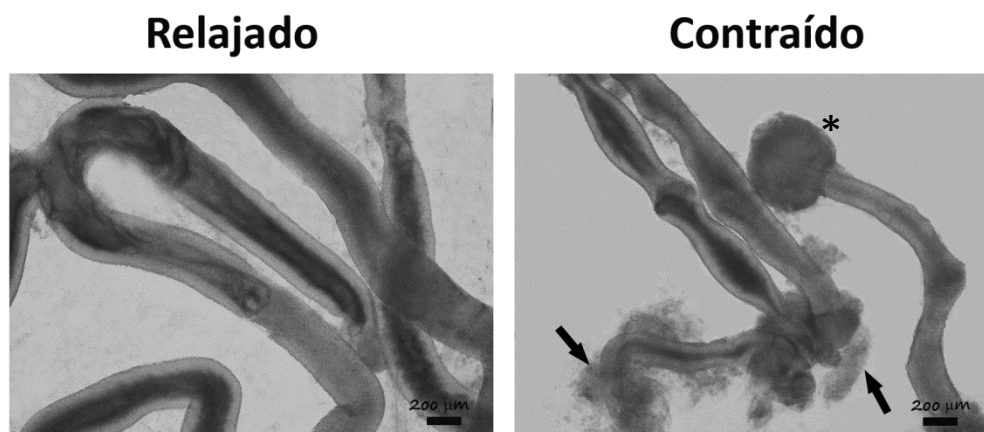


Figura 24. *TSs controles y tratados con ET-1 observados por lupa de transiluminación*. En ambas fotografías aparecen TSs que se encuentran en diferentes estadios germinales. Sin embargo, todos los TSs reaccionan por igual con ET-1 independientemente del estadio de los segmentos. Con flechas se señala la expulsión del contenido tubular que ocurre en el mismo sentido que el de la progresión de la onda espermatogénica, mientras que con el asterisco se indica la eversión del tejido tubular.

4.1.2.2. Observación de la pared del TS contraído por distintos tipos de microscopía

4.1.2.2.1. Microscopía óptica

Los cortes histológicos transversales de los TSs con y sin tratamiento con ET-1 se observaron por microscopía óptica. Así, se apreció que los TSs tratados tenían su diámetro tubular reducido respecto del estado relajado en una proporción que era similar a la que se mencionó en el ítem anterior. En la pared de los TSs contraídos las células MP tenían mayor altura al adoptar una forma cónica, cuyo vértice estaba orientado hacia el epitelio seminífero. De la misma manera, el núcleo de las células MP aparecía plegado hacia el epitelio. Además de manifestarse cambios en la capa de

células MP, la superficie de las CE presentaba numerosas proyecciones dirigidas hacia el intersticio (Figura 25).

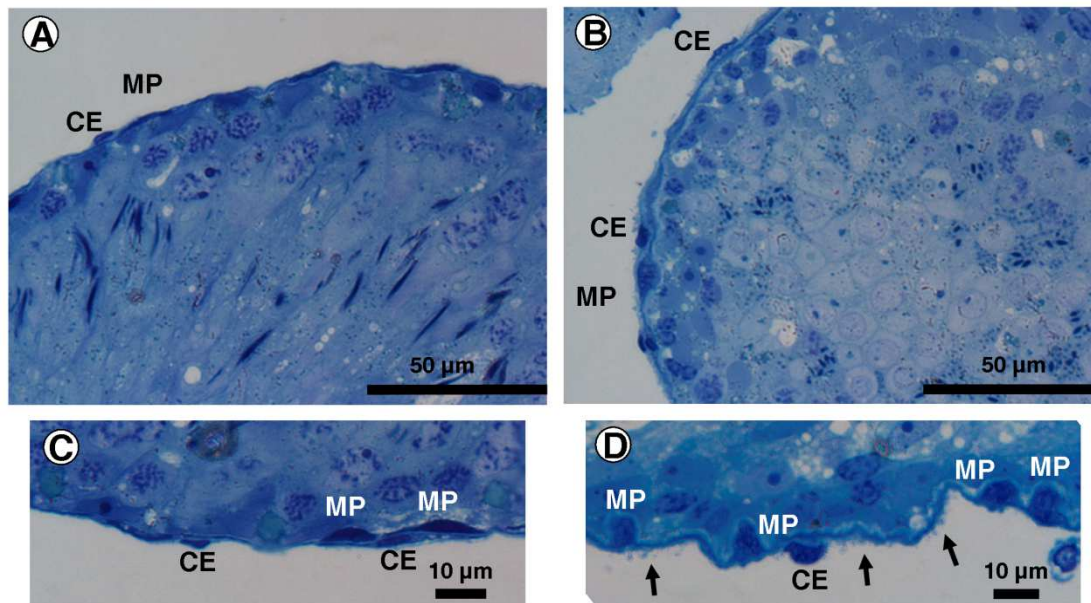


Figura 25. Cortes transversales de TSs controles y tratados con ET-1, teñidos con azul de toluidina y observados por microscopía óptica. A, C. TSs relajados observados a bajo y gran aumento, respectivamente. B, D. TS contraídos observados a bajo y gran aumento, respectivamente. CE: Célula endotelial, MP: Célula mioide. Flechas: proyecciones en la superficie de las células endoteliales.

4.1.2.2.2. Microscopía electrónica de barrido

Para determinar los cambios que la contracción produjo en la superficie del TS se recurrió al uso de la MEB.

4.1.2.2.2.1. Superficie de las células endoteliales

Para analizar la superficie de las CE se utilizaron TSs intactos, tratados o no con ET-1. Por MEB, se observó que en los TSs contraídos las CE tenían el núcleo abultado hacia el intersticio. Llamativamente, la superficie de las CE estaba cubierta por pequeñas y numerosas proyecciones digitiformes dirigidas hacia el intersticio. Por otro lado, en aquellos TSs que no se expusieron a ET-1, se observaron las mismas características que se describieron previamente para el TS relajado (ítem 4.1.1.2.2.1) (Figura 26).

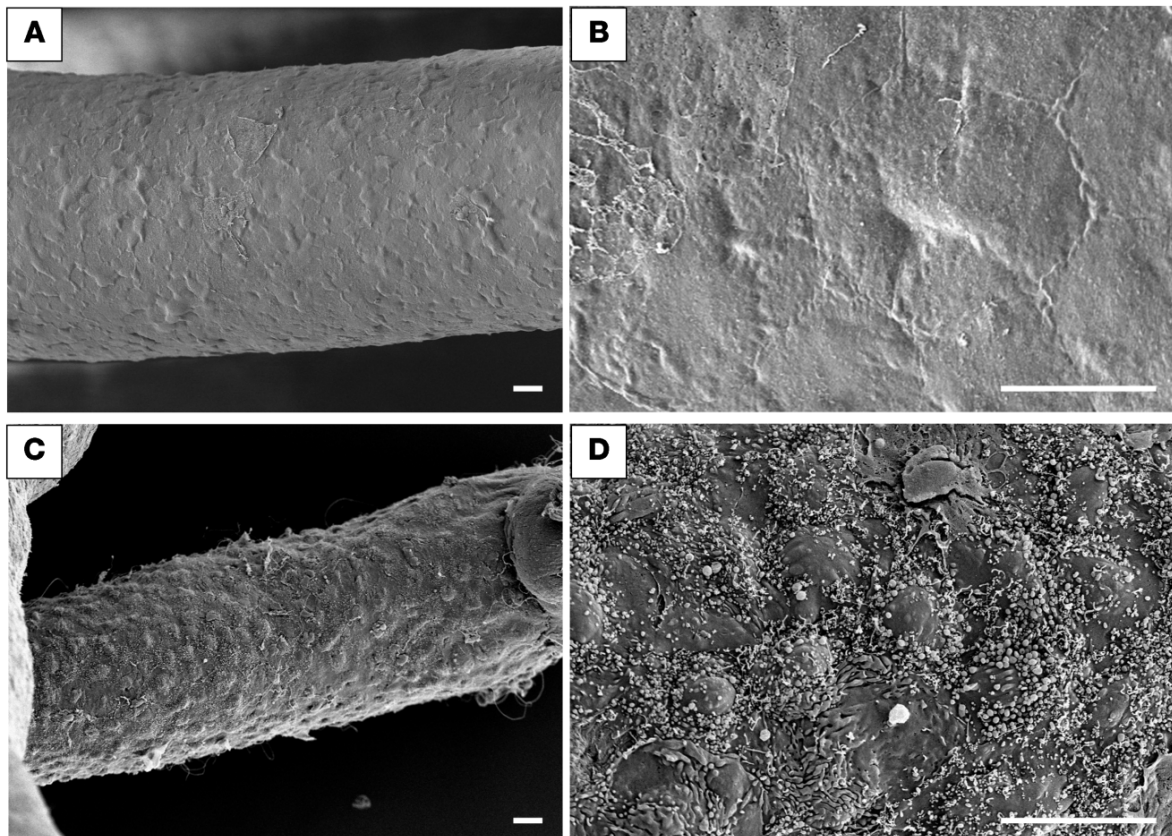


Figura 26. *Superficie de las células endoteliales observada por microscopía electrónica de barrido*. TS relajado a menor (A) y a mayor aumento (B). TS tratado con ET-1 a menor (C) y a mayor aumento (D). Barras: 20 μm .

4.1.2.2.3.2. *Superficie de las células mioides*

Para estudiar las modificaciones que se producían en la superficie de las células MP a causa de su contracción, se utilizaron TSs digeridos con colagenasa, tratados o no con ET-1. Cuando se observaron por MEB los segmentos de los TSs contraídos por ET-1, en la superficie de las células MP aparecían pliegues que estaban orientados principalmente a lo largo del eje del TS. Estos pliegues presentaban abultamientos que posiblemente se correspondan con el núcleo de las células MP ubicado por debajo de ellos. Además, se lograron reconocer los escasos parches de CE que se mantenían luego de la digestión enzimática a partir de las proyecciones digitiformes que cubrían su superficie. Nuevamente, en aquellos TSs que no se expusieron a ET-1 se observaron las mismas características que se describieron previamente para un TS relajado (ítem 4.1.1.2.2.3) (Figura 27).

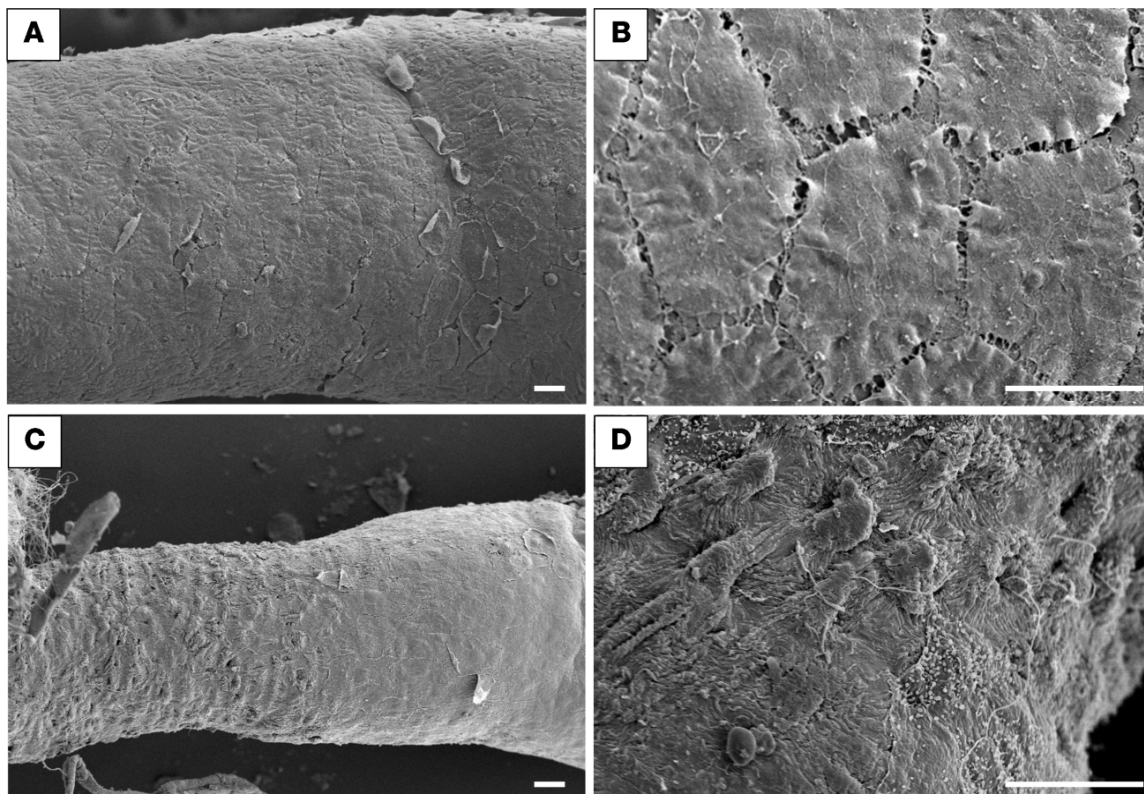


Figura 27. Superficie de la célula MP observada por microscopía electrónica de barrido. TS relajado a menor (A) y a mayor aumento (B). TS tratado con ET-1 a menor (C) y a mayor aumento (D). Barras: 20 μm .

4.1.3. Características que definen a las células MP como células contráctiles.

Una vez comprobado que los efectos del tratamiento de los TSs con ET-1 se manifiestan en la pared tubular, se procedió a estudiar las propiedades de célula muscular que presenta la célula MP. Para ello, se evaluó la organización del citoesqueleto de actina y miosina además de la distribución de ciertas proteínas que están involucradas en la vía de señalización que desencadena la contracción, tales como Cav-1, los receptores de ET-1 y los transportadores de Ca^{+2} del retículo endoplasmático.

4.1.3.1. Dimensiones de la célula MP

En las imágenes tomadas en el microscopio confocal, se midieron los diámetros de las células MP a lo largo del eje x (paralelo al eje mayor del TS) e y (perpendicular al eje tubular principal) además de su área tangencial.

Las células MP presentaban un área tangencial promedio de $1776 \mu\text{m}^2$, mientras que los diámetros celulares x e y eran de $43,9 \mu\text{m}$ y de $48,4 \mu\text{m}$, respectivamente (Tabla 3).

Diámetro del TS ($\mu\text{m}\pm\text{ESM}$)	Área CMP ($\mu\text{m}^2 \pm\text{ESM}$)	Diámetro X CMP ($\mu\text{m}\pm\text{ESM}$)	Diámetro Y CMP ($\mu\text{m}\pm\text{ESM}$)
315,8 \pm 8,4	1776 \pm 19,3	43,9 \pm 1,7	48,4 \pm 1,7

Tabla 3. *Parámetros morfológicos del TS y de la célula MP.* El área de la célula MP (CMP) y sus diámetros x e y se midieron en imágenes obtenidas en el microscopio confocal, mientras que los diámetros de los TSs se midieron en imágenes obtenidas en la lupa de transiluminación.

4.1.3.2. Citoesqueleto de actina y miosina

4.1.3.2.1. Distribución de los filamentos de actina por microscopía confocal

Como se expuso en la introducción, en la bibliografía hay numerosos artículos que mencionan la disposición ortogonal de los filamentos de actina (FA) en las células MP. Sin embargo, para estudiar con mayor detalle la organización de los filamentos que conforman el aparato contráctil de esta célula se utilizó el microscopio confocal que permite obtener imágenes de las distintas secciones ópticas (SOs) de la célula MP. Así, mediante la función Z-stack se observó que en las SOs más internas (dirigidas hacia el epitelio seminífero), los FA se orientaban perpendicularmente al eje principal del TS. Luego de varias SOs aparecían junto a los FA anteriores, nuevos FA con orientación paralela al eje tubular. Próximas al intersticio, en las SOs más externas, sólo estaban presentes los FA paralelos al eje principal del TS. Notoriamente, en cada célula MP muchos de los FA se correspondían con aquellos que tenían la misma orientación en las células MP vecinas. De esta manera, el conjunto de filamentos perpendiculares al eje tubular de todas las células MP formaba una vaina continua que ceñía circularmente al TS, mientras que el de filamentos paralelos al eje formaba cintas longitudinales. En adición a estos filamentos, se distinguieron FA periféricos que formaban un cinturón cortical que delimitaba el contorno de la célula. De esta manera se pudieron medir los parámetros morfológicos de la célula MP que se mencionaron en el ítem anterior (Figura 28, Tabla 3).

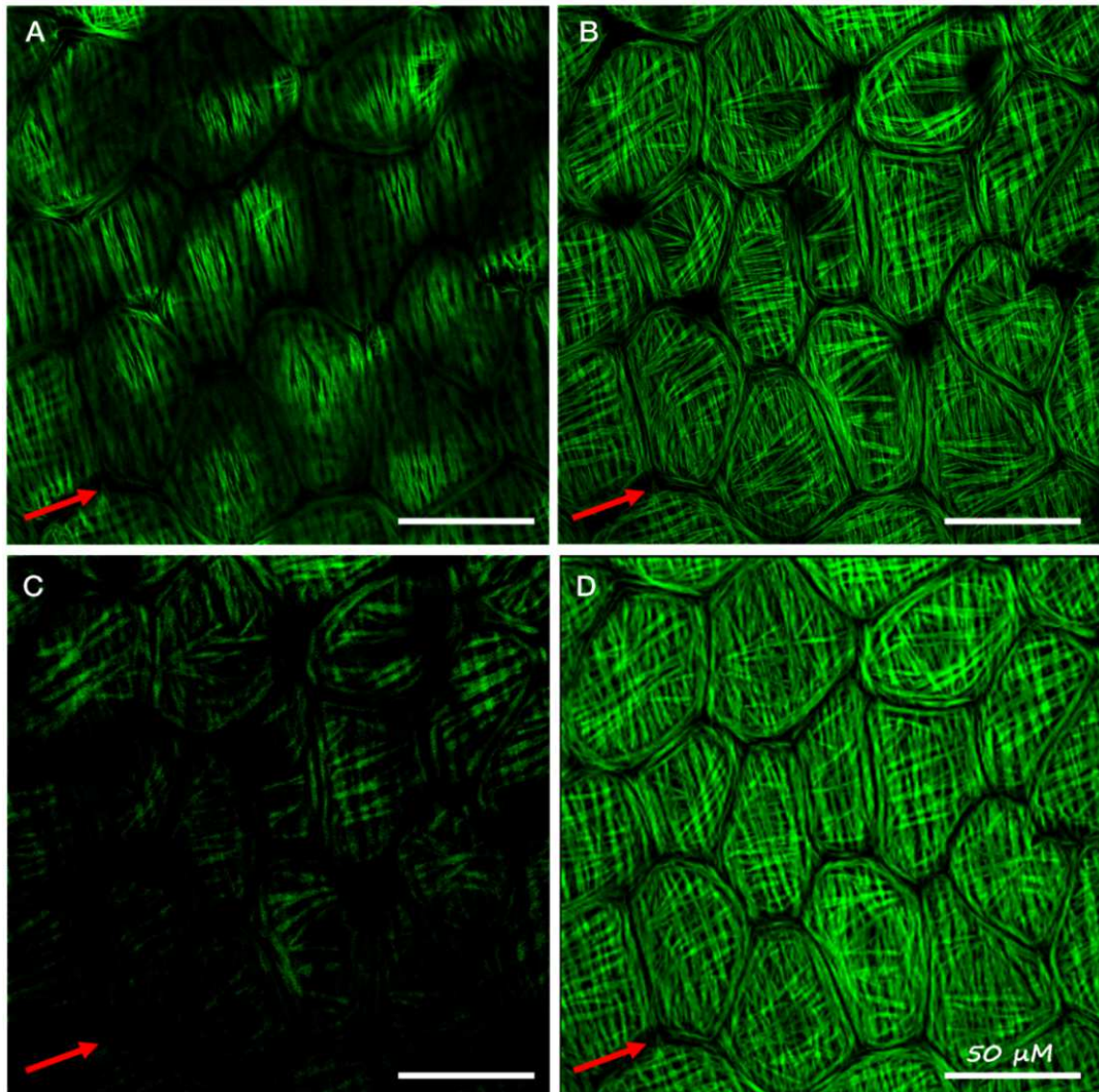


Figura 28. *Microscopía confocal de los FA de las células MP incubadas con el anticuerpo α -actina-FITC. A.* Sección óptica interna. *B.* Sección óptica media. *C.* Sección óptica externa. *D.* Imagen integrada de todas las secciones ópticas que se obtuvieron del mismo campo. **Flecha:** Eje longitudinal del TS.

4.1.3.2.2. *Distribución de los filamentos de miosina por microscopía confocal*

Si tenemos en cuenta que las células MP son células musculares lisas y que poseen sus FA dispuestos en dos orientaciones diferentes, resultó necesario determinar cómo era la distribución del otro componente principal del aparato contráctil: la proteína miosina-CMP (con alta homología a la proteína miosina II de músculo liso). En base a esto, se empleó la técnica de inmunofluorescencia para luego observar por microscopía confocal los TSs correctamente procesados.

Así, el inmunomarcado de las células MP con anticuerpos específicos para esta proteína indicó la presencia de estructuras filamentosas que adoptaban la misma disposición que se describió para los FA, es decir, en las SOs internas de las células MP los filamentos de miosina (FM) se orientaban

perpendicularmente al eje longitudinal del TS, mientras que en las SOs externas lo hacían paralelamente al eje tubular. Por otro lado, se advirtió una fuerte tinción de miosina alrededor del núcleo, que podría indicar los anclajes de los FM a la envoltura nuclear. No se encontraron FM en el cinturón cortical donde los FA sí estaban presentes (Figura 29).

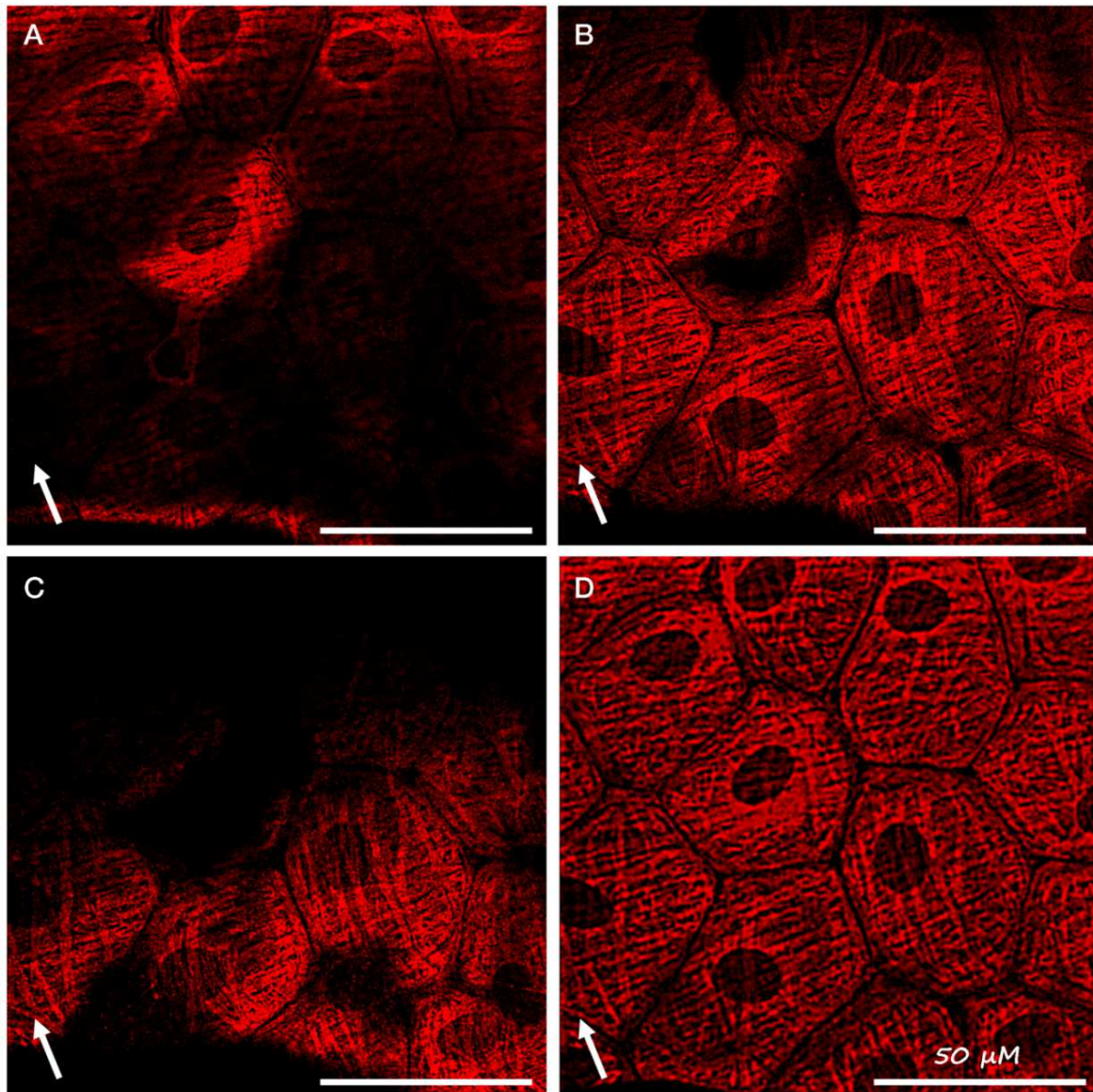


Figura 29. *Microscopía confocal de los FM de las células MP. A.* Sección óptica interna. *B.* Sección óptica media. *C.* Sección óptica externa. *D.* Imagen integrada de todas las secciones ópticas obtenidas en el mismo campo. **Flecha:** Eje principal del TS.

4.1.3.2.3. Colocalización de los filamentos de actina y miosina en las células de músculo liso

La distribución de los FA y los FM de las células MP en dos direcciones diferentes marcaría una diferencia fundamental con las células de músculo liso convencionales, cuyo aparato contráctil está orientado sólo a lo largo del eje longitudinal de la célula. Para determinar si la técnica que se

utiliza para visualizar a los miofilamentos y analizar la colocalización que existe entre ellos es fiable, se analizaron las células musculares de la pared de la arteria espermática cuya organización del citoesqueleto es conocida. Para ello, se procesaron muestras de arteria espermática según la técnica de inmunofluorescencia: los FA se detectaron con faloidina- Alexa 488, una micotoxina producida por el hongo *Amanita phalloides*, mientras que para la detección de los FM se utilizaron los mismos anticuerpos del experimento descrito en el ítem 4.1.3.2.2.

El análisis de este ensayo por microscopía confocal mostró que las células de músculo liso de la arteria espermática tenían forma de huso y se disponían perpendicularmente al eje de la arteria. Los FA y los FM se orientaban a lo largo del eje longitudinal de las células y exhibían signos de colocalización. Para determinar el grado de colocalización de los FA con los FM se evaluaron los coeficientes PCC, MCC-M1 y MCC-M2. El valor PCC era 0,48; distante de 1 (colocalización completa), lo que indicó una colocalización parcial de los miofilamentos. A partir de la forma de la curva CCF se advirtió que la colocalización obtenida no era aleatoria, sino real. Sin embargo, por medio de un coeficiente independiente de la intensidad de tinción, MCC, se encontró que el valor de MCC-M1 (fracción de FA que colocalizaba con la de los FM) era de 0,97 mientras que el de MCC-M2 (fracción de FM que colocalizaba con la de los FA) era de 0,98. Estos valores cercanos a 1 confirmaron que la colocalización de los FA y los FM en realidad era casi completa (Bolte y Cordelières, 2006) al igual de lo que se manifiesta en la bibliografía (Figura 30). Por lo tanto, las imágenes que se obtienen en el microscopio confocal y el análisis de colocalización que se les realiza, reflejan lo que sucede en la célula y no son producto de un artefacto experimental.

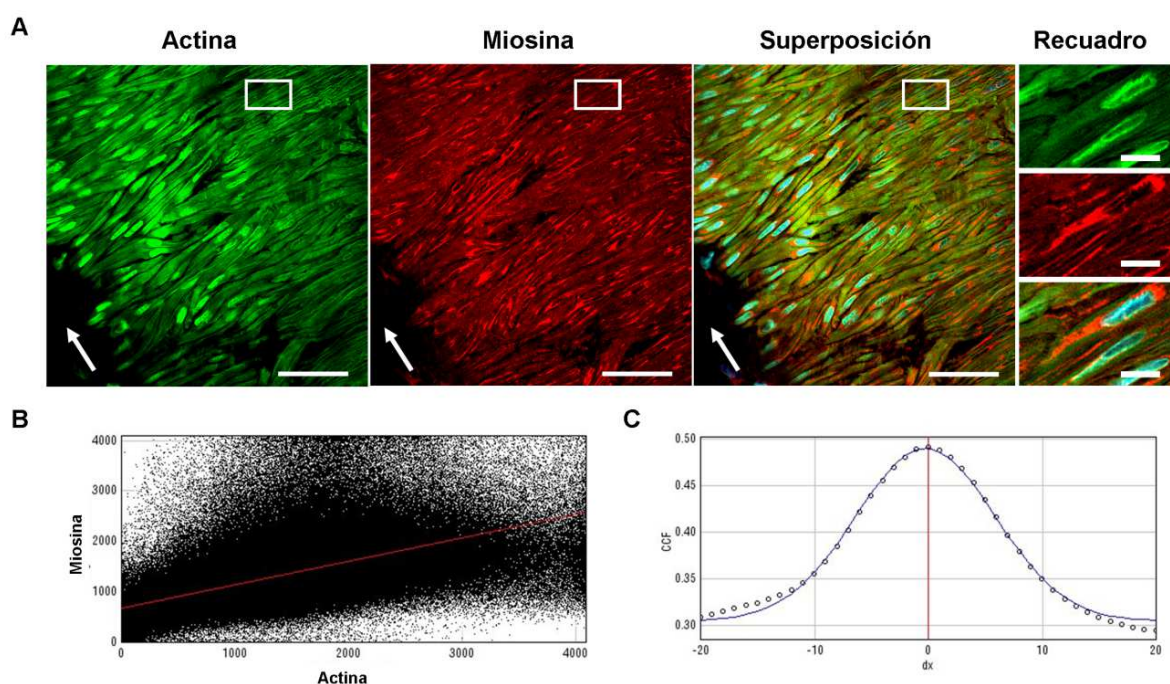


Figura 30. *Colocalización de los FA y los FM en las células musculares lisas de la arteria testicular.* A. Microscopía confocal de las CML incubadas con faloidina- Alexa 488, Hoescht (azul) y con los anticuerpos específicos para miosina. **Recuadro:** Detalles de cada imagen a mayor magnificación. B, C. Análisis de colocalización por JACoP. Gráfico de dispersión de los eventos de colocalización para miosina vs α -actina (B). CCF de Van Steensel: Relación PCCs vs desplazamiento de píxeles (Δx) (C). **Flecha:** Eje de la arteria. **Barras:** 50 μm (imágenes a bajo aumento de A) y 10 μm (recuadro).

4.1.3.2.4. Colocalización de los filamentos de actina y miosina en las células MP.

Debido a que el método empleado para estudiar la colocalización fue útil para reflejar el comportamiento de actina y miosina en un sistema de músculo liso conocido, se analizó si en la célula MP los FA y los FM también colocalizaban.

La primera prueba de colocalización que se realizó consistió en utilizar faloidina- Alexa 488 para decorar los FA, mientras que para detectar los FM se usaron anticuerpos específicos para miosina II de músculo liso.

Cuando se observaron en el microscopio confocal los TSs procesados en estas condiciones (Figura 31), se advirtió que los FA y los FM presentaban el mismo patrón de organización que cuando se utilizaban por separado los anticuerpos primarios para identificar los FA y los FM (Figura 28 y 29).

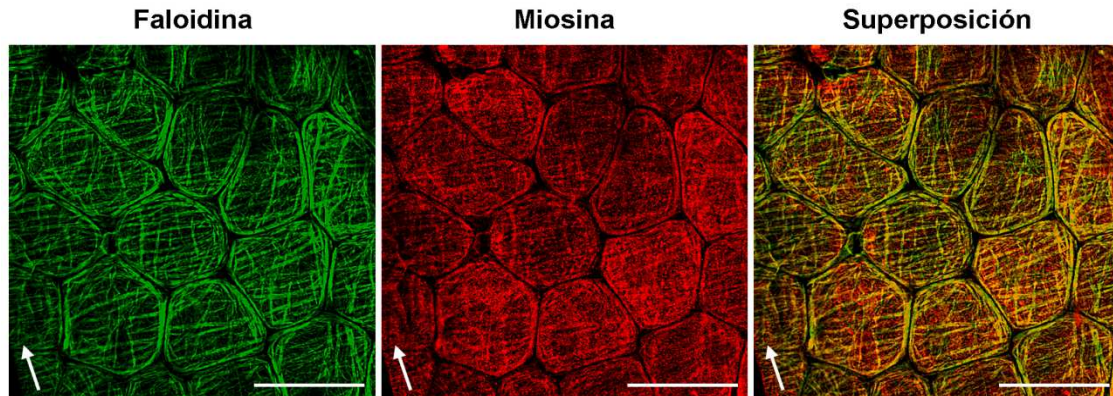


Figura 31. *Microscopía confocal de TS fijados a 37°C e incubados con faloidina- Alexa 488 y anticuerpos específicos para miosina II de músculo liso.* Flecha: Eje longitudinal del TS. Barra: 50 μm .

Sin embargo, debido a que la faloidina reacciona con todas las isoformas de actina, con esta tinción que es convencional en los experimentos de colocalización no era posible distinguir los FA de las células MP (α -actina positivas) de los de las células de Sertoli, germinales y endoteliales (β -actina positivas). Es por esto, que para evaluar cuantitativamente la colocalización de los FA con los FM únicamente en las células MP, se utilizaron anticuerpos específicos para cada proteína de interés.

Para confirmar que cada anticuerpo primario utilizado reaccionaba específicamente con los FA ó con los FM, se analizaron células MP a las que previamente se les había desensamblado los FM (para más detalle ver Materiales y Métodos). Para ello, antes de la fijación se incubaron los TSs 4°C según lo publicado por (Fernández y col., 2008).

Mediante Western Blot se corroboró que efectivamente a causa de las bajas temperaturas los FM se habían desensamblado (Figura 32, A). Cuando se observaron en el microscopio confocal los TSs fijados a 4°C, se notó que los FA mantenían la organización que se describió previamente, mientras que la tinción de miosina desaparecía casi en su totalidad (Figura 32, B), posiblemente porque los monómeros de miosina-CMP se perdieron durante el proceso de permeabilización. Esto indicó que entre los anticuerpos utilizados no se producía una reacción cruzada.

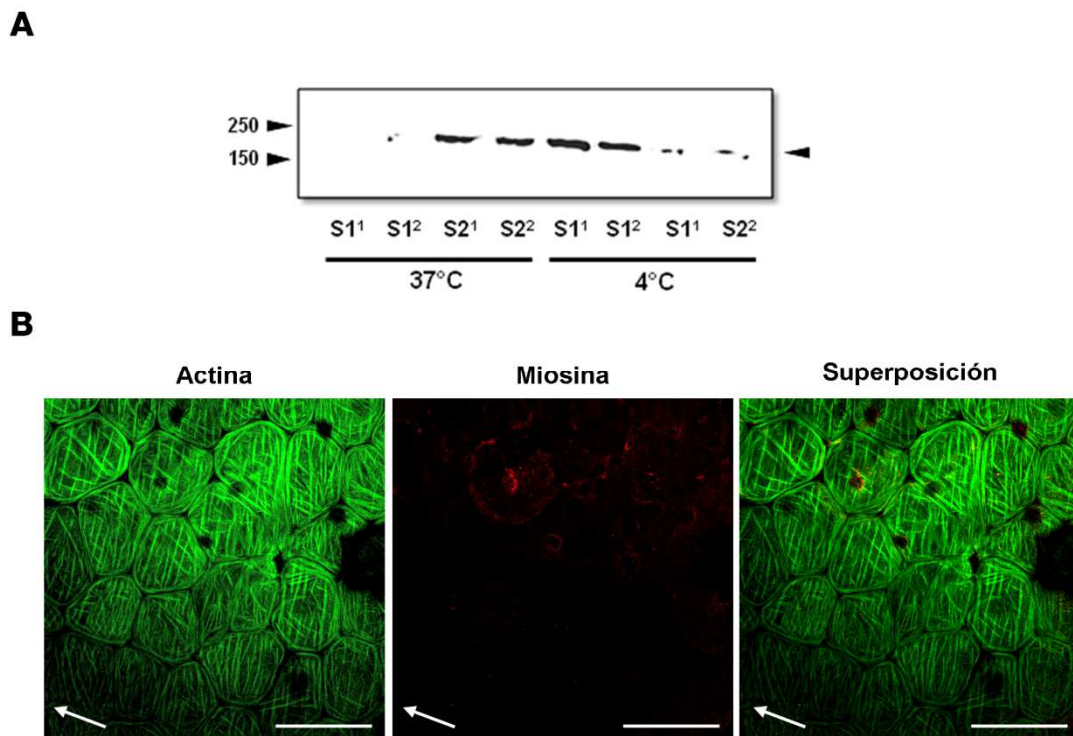


Figura 32. *Efecto de las bajas temperaturas en el ensamblaje de la miosina-CMP en filamentos.* **A.** Análisis por Western blot de miosina II de músculo liso en los sobrenadantes S1 (fracción de miosina soluble) y S2 (fracción de miosina agregada en filamentos) de dos experimentos independientes (1 y 2) de TSs incubados en PBS, homogenizados y centrifugados a 4°C o a 37°C. La posición de migración de los marcadores de peso molecular (250 kDa y 150 kDa) se indica a la izquierda de la figura, mientras que la de miosina se indica a la derecha. **B.** Microscopía confocal de TSs fijados a 4°C e incubados con los anticuerpos correspondientes para identificar miosina y actina. **Flecha:** Eje longitudinal del TS.

Por otro lado, para descartar una reacción inespecífica del anticuerpo secundario utilizado para visualizar miosina, se repitió el proceso de inmunomarcado pero esta vez sin incubar el anticuerpo primario correspondiente. Cuando se observó en el microscopio confocal esta muestra, no se detectó ninguna señal en el canal respectivo a miosina (datos no mostrados).

Una vez realizadas todos los controles pertinentes, la tinción simultánea de los FA y los FM de las células MP con anticuerpos específicos confirmó que los FA colocalizaban con los FM debido a la coloración amarillenta que se obtenía cuando se superponían las imágenes de los dos canales estudiados (Figura 33). Para determinar el grado de colocalización de los FA con los FM se evaluaron los coeficientes PCC, MCC-M1 y MCC-M2. El valor PCC era 0,646, lo que indicó una colocación parcial de los miofilamentos. Además, la forma de la curva CCF indicó que la colocalización no era aleatoria, sino real. Sin embargo, por medio del coeficiente independiente de la intensidad de tinción, MCC, se encontró que el valor de MCC-M1 (fracción de FA que colocalizaba con la de los FM) era de 0,949 mientras que el de MCC-M2 (fracción de FM que colocalizaba con la de los FA) era de 0,947. Estos valores cercanos a 1 demostraron que la colocalización de los FA y los FM en realidad era casi completa. Así, los FA y los FM en la célula MP están entrecruzados al igual que en las células musculares típicas (Figura 30 y 33).

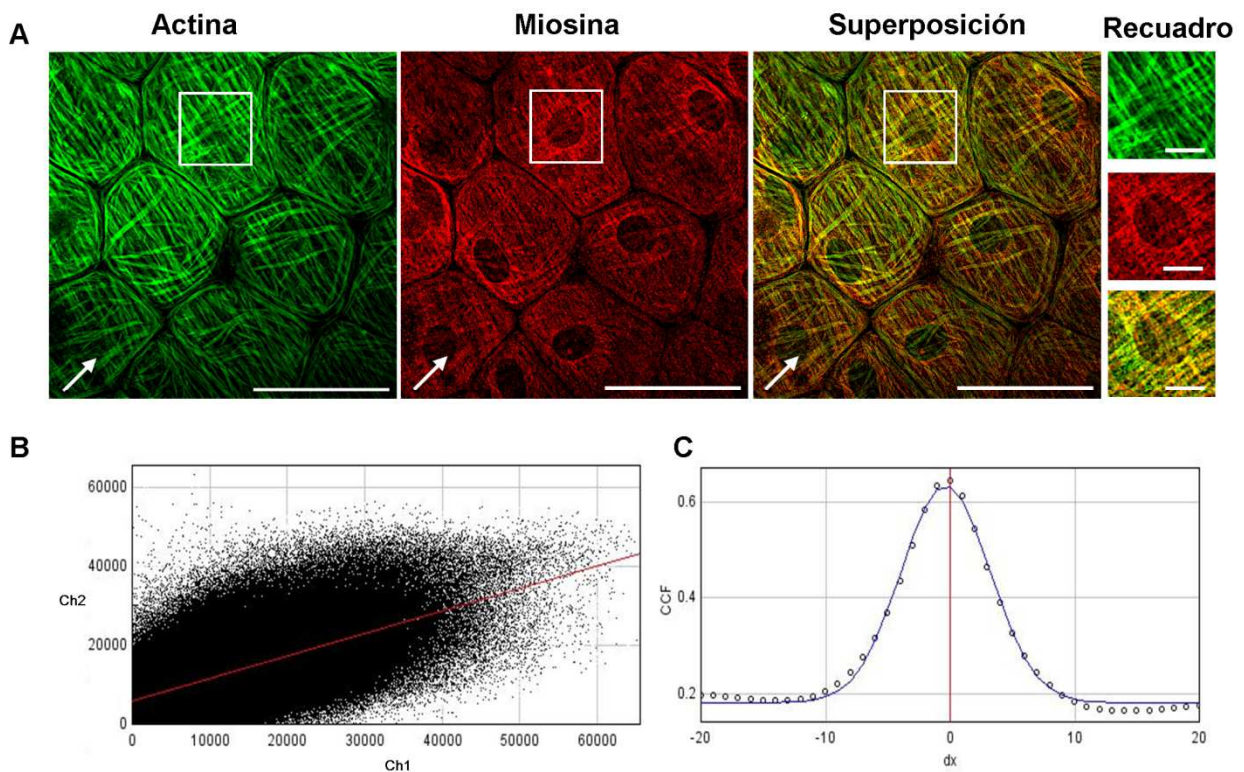


Figura 33. *Colocalización de los FA y los FM en la célula MP.* **A.** Microscopía confocal de las células MP incubadas con los anticuerpos específicos para α -actina y miosina II de músculo liso. **Recuadro:** Detalles de cada imagen a mayor magnificación. **B., C.** Análisis de colocalización por JACoP. Gráfico de dispersión de los eventos de colocalización para FM (Ch2) vs FA (Ch1) (**B**). CCF de Van Steensel: Relación PCCs vs desplazamiento de píxeles (∂x) (**C**). **Flecha:** Eje longitudinal del TS. **Barras:** 50 μm (imágenes a bajo aumento de A) y 10 μm (recuadro).

4.1.3.2.5. Distribución de los filamentos de actina por microscopía electrónica de transmisión

Para corroborar las observaciones que se describieron previamente (apartado 4.1.3.2.1), se empleó microscopía electrónica de transmisión (MET). Cuando se observaron cortes longitudinales y transversales del TS, se identificaron en las células MP dos capas independientes de FA bien diferenciadas: una capa circular interna y una capa longitudinal externa. En la zona citoplasmática interna, ubicada entre el núcleo y la membrana plasmática dirigida hacia el epitelio seminífero, los FA correspondientes a la *capa circular interna* estaban orientados perpendicularmente al eje del TS. Por otro lado, en la zona citoplasmática externa situada entre el núcleo y la membrana plasmática dirigida hacia el intersticio, los FA que representaban *la capa longitudinal externa* estaban orientados en paralelo al eje tubular. Es importante mencionar que la capa circular interna se encontraba en cualquier sección de la célula MP, a diferencia de la capa longitudinal externa que se observaba con más frecuencia por encima de la zona nuclear (Figura 34 y 35). Estas dos capas de FA permanecían separadas aún en las zonas en las que el núcleo no estaba presente.

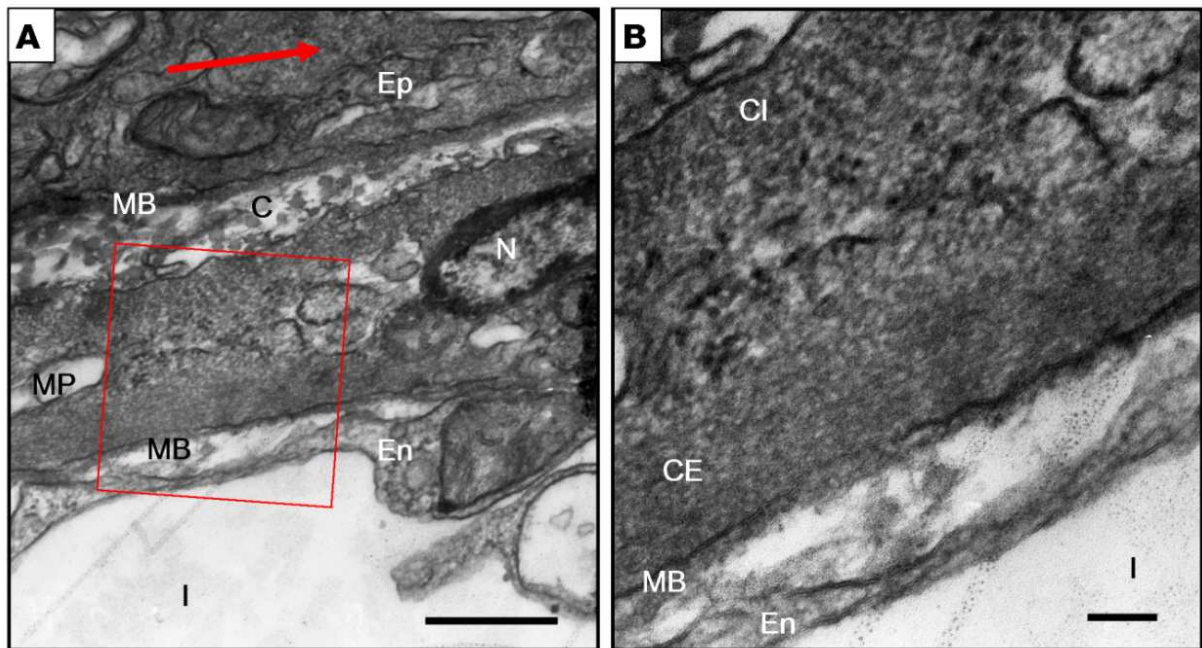


Figura 34. **A.** Corte longitudinal de TS observado por TEM. C: colágeno, En: endotelio, Ep: epitelio germinativo, CI: capa circular interna de FA, CE: capa longitudinal externa de FA, I: intersticio, MB: membrana basal, N: núcleo de célula MP. **B.** Detalle del recuadro. Flecha: Eje principal del TS. Barras: 1 μ m.

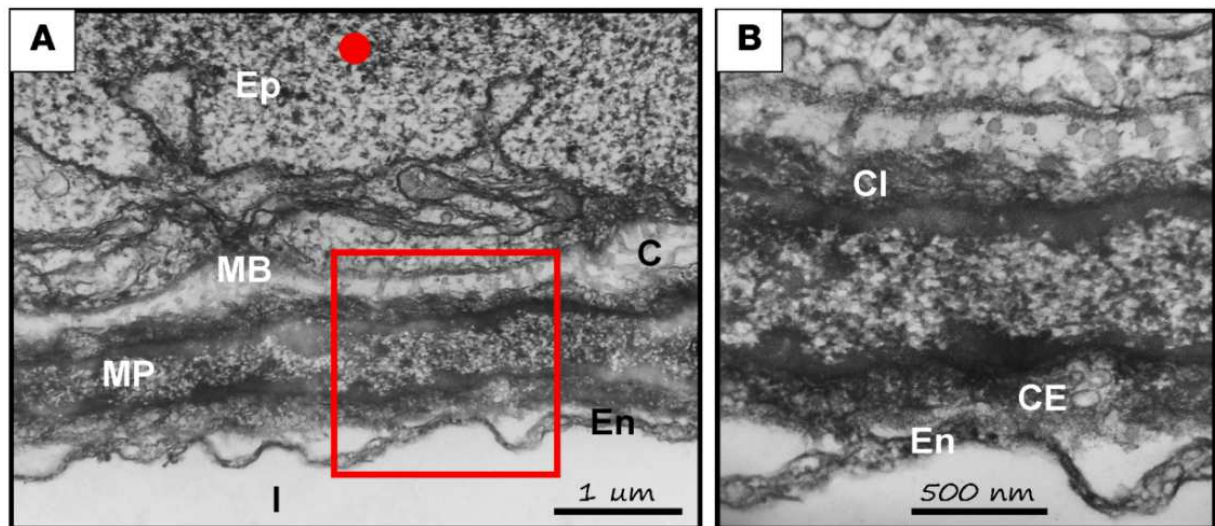


Figura 35. **A.** Corte transversal de TS observado por TEM. C: colágeno, En: endotelio, Ep: epitelio germinativo, CI: capa circular interna de FA, CE: capa longitudinal externa de FA, MB: membrana basal, I: intersticio. **B.** Detalle del recuadro. **Círculo:** Eje principal del TS.

A partir de estos resultados concluimos que en la célula MP hay dos capas de filamentos, una interna y otra externa. Dentro de cada capa, los FA y los FM se orientan en la misma dirección y son perpendiculares a los FA y FM de la otra capa (Losinno y col. 2012).

4.1.3.3. Localización de proteínas relacionadas con la vía de señalización de la contracción

4.1.3.3.1. Distribución de Caveolas

Una célula contráctil además de presentar miofilamentos, requiere de estructuras anexas implicadas en la regulación de la contracción. Existen evidencias que manifiestan que en las células musculares lisas numerosos receptores, proteínas de señalización y canales iónicos son secuestrados en las caveolas, unas invaginaciones de la membrana plasmática ricas en colesterol y esfingolípidos. Se propone que este tipo de estructura crea focos para la regulación de diversas actividades celulares, entre las que se encuentra la contracción. Numerosas descripciones sostienen que en la membrana plasmática de las células musculares lisas las caveolas se ordenan en hileras a lo largo del eje longitudinal de la célula y acompañan a los miofilamentos subyacentes. En el caso de las células MP donde el aparato contráctil adopta una organización particular, resultó interesante determinar cómo estaba distribuida Cav-1, una de las proteínas principales que conforman la caveola.

Se observaron por MET cortes de TSs para determinar la presencia de caveolas en la célula MP. Así, en cortes transversales se observó que tanto la membrana plasmática de la cara interna de la célula MP (dirigida hacia el epitelio seminífero) como de la cara externa (dirigida hacia el intersti-

cio) presentaban numerosas caveolas que estaban próximas a los FA ubicados por debajo de las membranas (Figura 36).

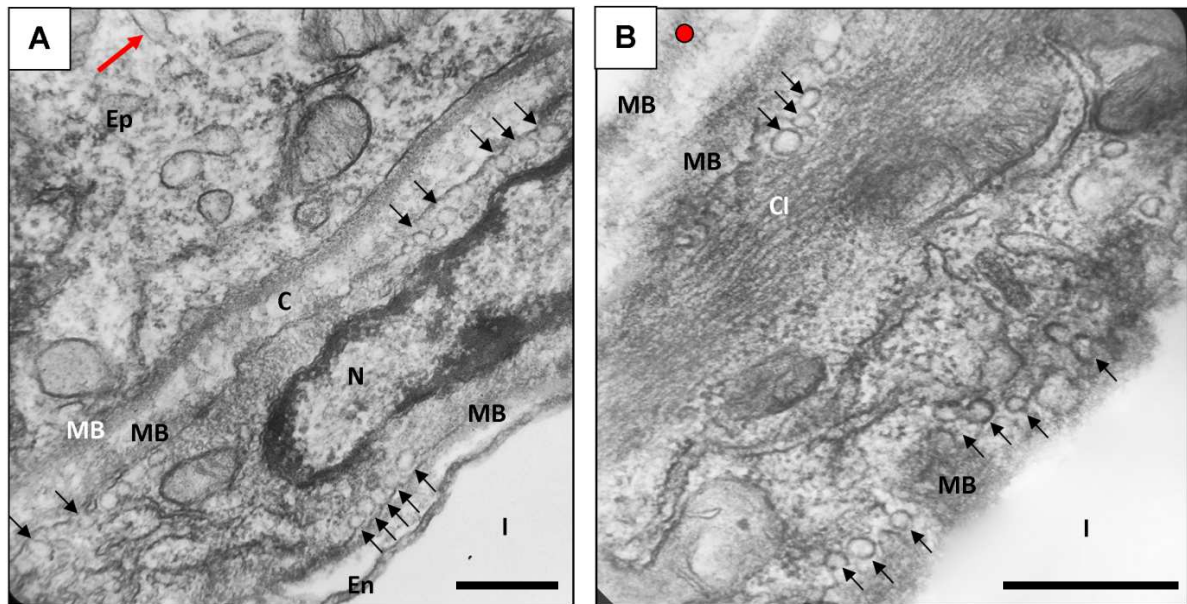


Figura 36. *Microscopía electrónica de transmisión de un TS en el que se pueden ver las caveolas (flechas negras) de la célula MP tanto en la membrana plasmática de la cara interna como de la cara externa. A. Corte longitudinal de un TS observado a menor aumento. B. Corte transversal de un TS observado a mayor aumento. C: colágeno, CI: capa circular interna de FA, Ep: epitelio germinativo, En: Endotelio, MB: Membrana Basal, N: núcleo de la célula MP, I: Intersticio. Flecha y círculo rojos: Eje principal del TS. Barras: 500 nm.*

Debido a que en el TS tanto las CE como las células MP poseen caveolas, para poder analizar por microscopía confocal la disposición de Cav-1 en las células MP, se utilizaron TSs digeridos con 0,5 mg/ml de colagenasa durante 5 min.

Así, cuando se observaron tangencialmente a las células MP por microscopía confocal, se comprobó que las caveolas formaban filas que se disponían de dos maneras: transversales (en la membrana plasmática de la cara interna) y longitudinales (en la membrana plasmática de la cara externa) al eje principal del TS (Figura 37). Es necesario remarcar que no se encontró ninguna Cav-1 en las proximidades del cinturón periférico de FA, es decir, las caveolas no aparecían en las membranas laterales de la célula.

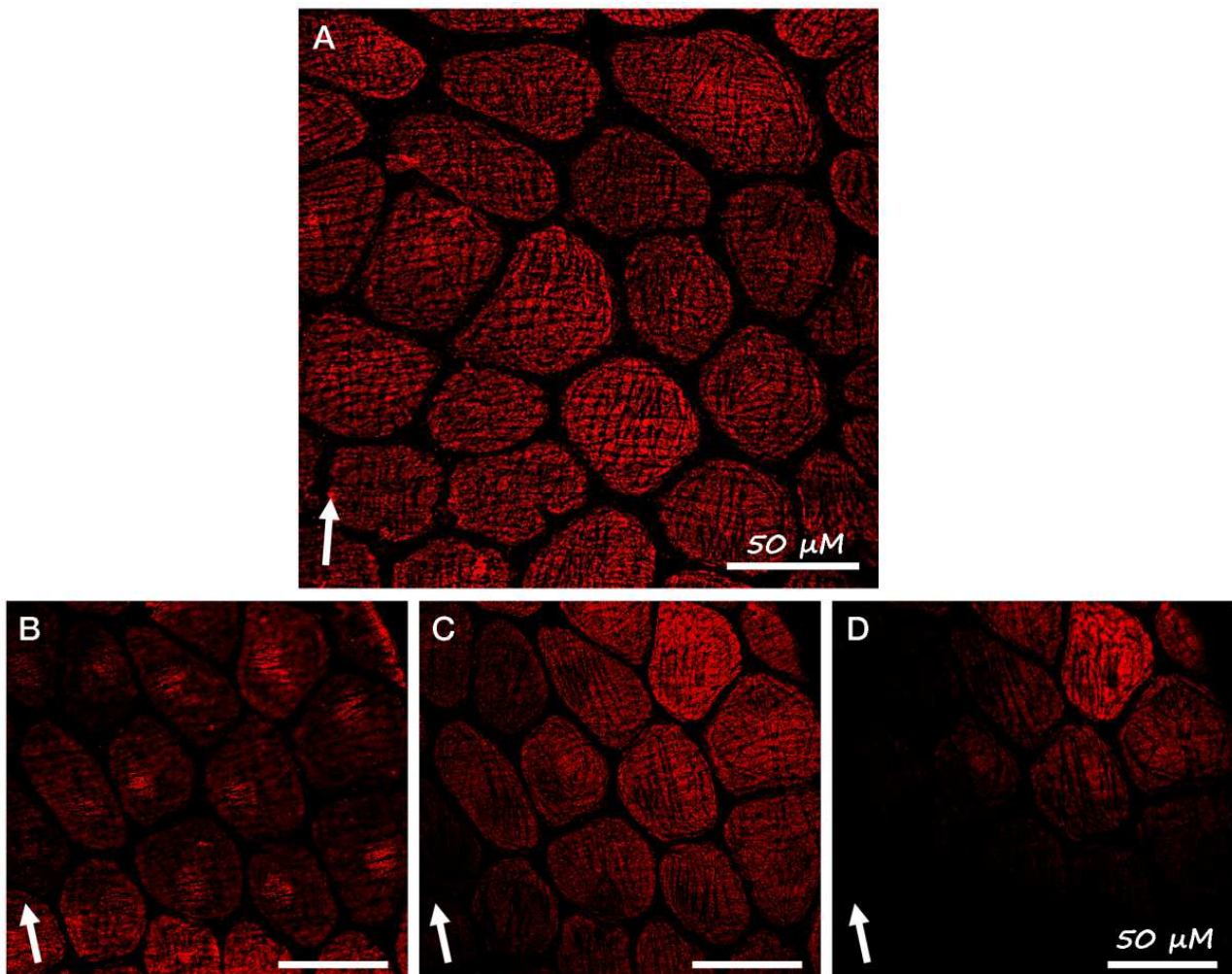


Figura 37. *Microscopía confocal de TSs digeridos con collagenasa*. **A**. Distribución de Cav-1 en filas en las células MP. **B, C, D**. Secciones ópticas del TS obtenidas mediante la función Z-stack. Sección óptica interna (**B**). Sección óptica media (**C**). Sección óptica externa (**D**). **Flecha**: Eje principal del TS.

Dado que el modo de distribución de esta proteína se asemejaba al de los miofilamentos, se realizaron estudios de colocalización de Cav-1/ α -actina para determinar la posición relativa de ambas proteínas. El análisis de colocalización demostró que las caveolas y los FA no colocalizaban sino que adoptaban una distribución complementaria, de tal manera que las filas de caveolas se orientaban alternadas con los FA. Este posicionamiento quedó evidenciado en el gráfico de la función de Van Steensel que relaciona la variación del coeficiente de correlación (colocalización) con el desplazamiento de una imagen respecto de la otra. En un comienzo ($\delta x=0$) las imágenes provenientes de cada canal no colocalizaban pero a medida que se producía el desplazamiento de una de ellas en un sentido u otro, el coeficiente de colocalización aumentaba (Figura 38).

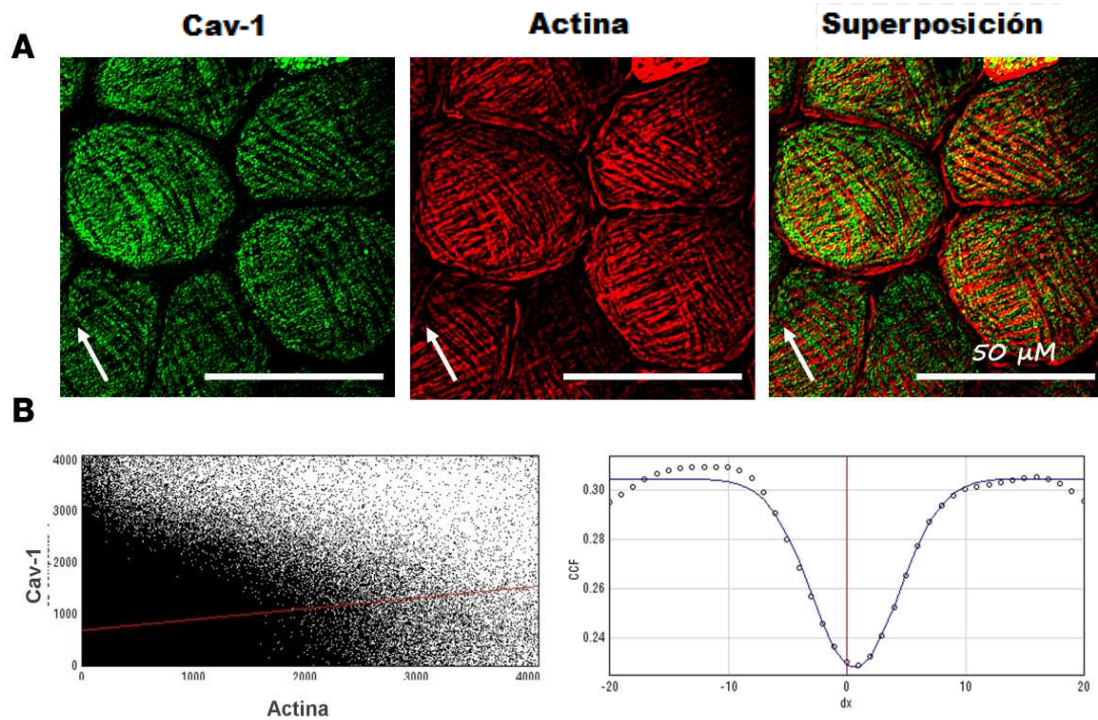


Figura 38. Colocalización de Cav-1 y los FA en la célula MP. A. Microscopía confocal de las células MP incubadas con los anticuerpos específicos para Cav-1 y α -actina. B, C. Análisis de colocalización por JACoP. Gráfico de dispersión de los eventos de colocalización para Cav-1 vs Actina (B). Función de Van Steensel: Relación de PCCs vs desplazamiento de píxeles (∂x) (C). Flecha: Eje longitudinal del TS.

Para analizar si las caveolas son necesarias para que se produzcan la contracción de la célula MP se realizó un ensayo de depleción del colesterol con el fin de romper la estructura de estas invaginaciones para posteriormente analizar el comportamiento de la célula MP frente al estímulo de ET-1 (ver más adelante en el apartado 4.1.4.4). Se ha descrito que la extracción de colesterol desde las membranas se realiza con β - metil ciclodextrina (β -mCD), un oligosacárido cíclico frecuentemente utilizado en sistemas donde se quiere evaluar el rol de los lípidos en diversas funciones biológicas (Kilsdonk y col., 1995).

Para realizar este estudio se expuso un grupo de TSs a 10 mg/ml de β -mCD durante 1 hora. Luego de la fijación con paraformaldehído, los TSs sin (control) y con exposición a β -mCD se incubaron con los anticuerpos específicos para Cav-1 y α -actina y se analizaron por microscopía confocal. El inmunomarcado de α -actina se realizó con el fin de determinar si el tratamiento afectaba la forma la célula MP y/o la organización típica de sus FA. En las células MP de los TSs tratados con este compuesto, Cav-1 no formaba filas como en los TSs controles, sino que se distribuía en todo el citoplasma. De todas maneras, se detectó una mayor tinción de Cav-1 alrededor del núcleo. Tanto la forma de la célula MP como la organización de los FA no presentaban alteraciones por el tratamiento. Es necesario aclarar que en los TSs controles tanto Cav-1 como α -actina presentaban el

mismo patrón de distribución de la figura 38, por lo que las figuras correspondientes a cada proteína no serán mostradas (Figura 39). Los ensayos de colocalización de Cav-1 y α -actina en las células MP de TSs tratados con β -mCD indicaron que no existía relación alguna en la distribución de pixeles de una imagen respecto de los de la otra, es decir, se perdía la distribución complementaria entre estas dos proteínas (Figura 39 C). Estos resultados confirman la desestabilización de las caveolas con su consecuente desorganización a causa de la depleción de colesterol.

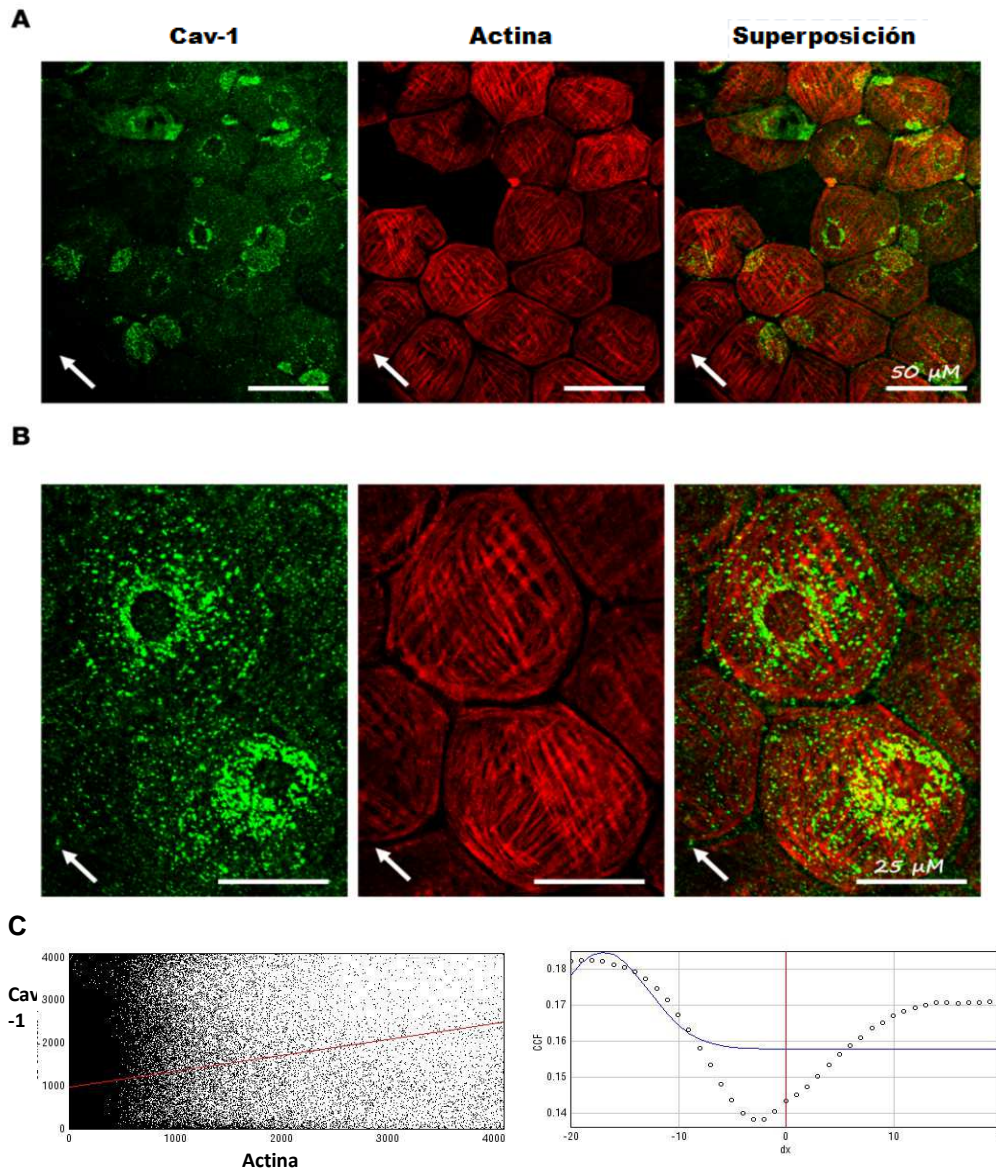


Figura 39. *Microscopía confocal de TS expuestos a β -mCD. Imágenes tomadas a bajo (A) y alto aumento (B). C, D. Análisis de colocalización por JACoP. C. Gráfico de dispersión de los eventos de colocalización para Cav-1 vs Actina. D. Función de Van Steensel: Relación de PCCs vs desplazamiento de pixeles (∂x) Flecha: Eje longitudinal del TS.*

4.1.3.3.2. Localización de los receptores de ET-1.

Existen trabajos en la bibliografía que mencionan que en diversas líneas celulares los dos subtipos de receptores de ET-1 (ET_A R y ET_B R) se encuentran reclutados en las caveolas. Una vez de-

terminada la disposición que adoptan las caveolas en las células MP, se analizó la distribución de $ET_A R$ y $ET_B R$ en la célula MP. Por medio del uso de TSs digeridos con colagenasa e incubados con anticuerpos específicos a cada subtipo de receptor, se observó que en la célula MP tanto $ET_A R$ como $ET_B R$ se disponían en filas que estaban orientadas perpendiculares y paralelas al eje principal del TS (Figura 40). Por medio de esta técnica no se encontró un patrón de distribución preferencial de los subtipos de receptor respecto a la membrana plasmática de la cara interna o externa de la célula MP, sino que ambos se ordenaban homogéneamente.

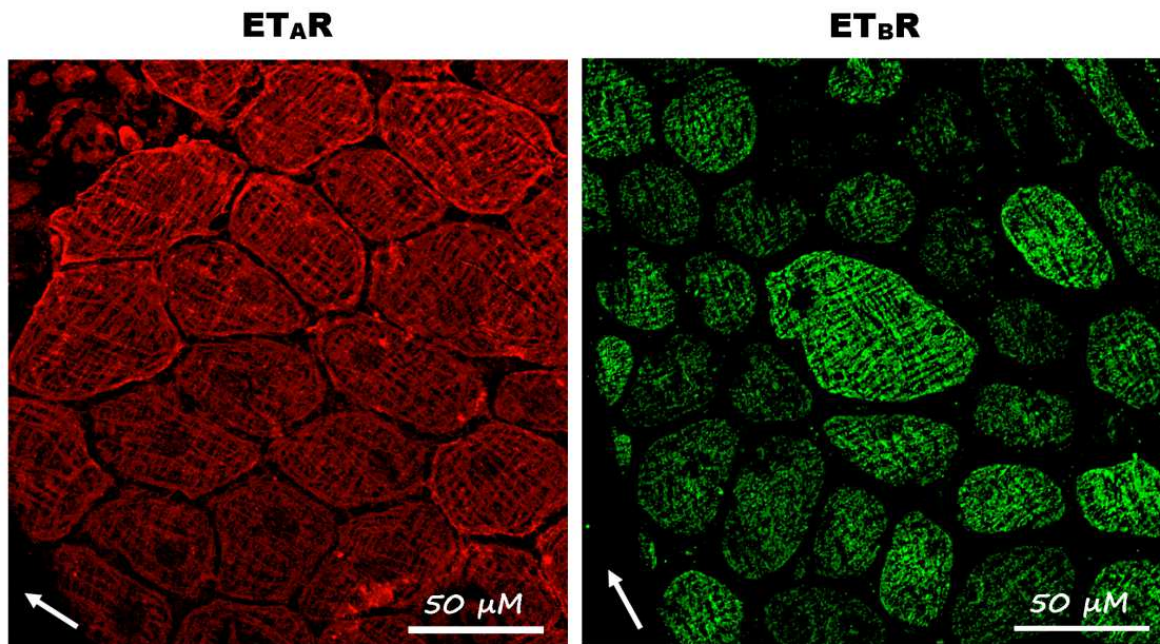


Figura 40. *Distribución de los receptores a ET-1 en la célula MP por microscopía confocal. Flecha: Eje principal del TS.*

Por otro lado, cuando se analizó el grado de colocalización existente entre los receptores de ET-1 y los FA, se notó que tanto $ET_A R$ como $ET_B R$ colocalizaban de una manera casi completa con los FA. Este comportamiento se vio reflejado no sólo en la coloración amarillenta de la imagen proveniente de la superposición de las dos proteínas, sino también en los gráficos obtenidos del estudio de colocalización por medio de la aplicación JACoP del programa Image J (Figura 41).

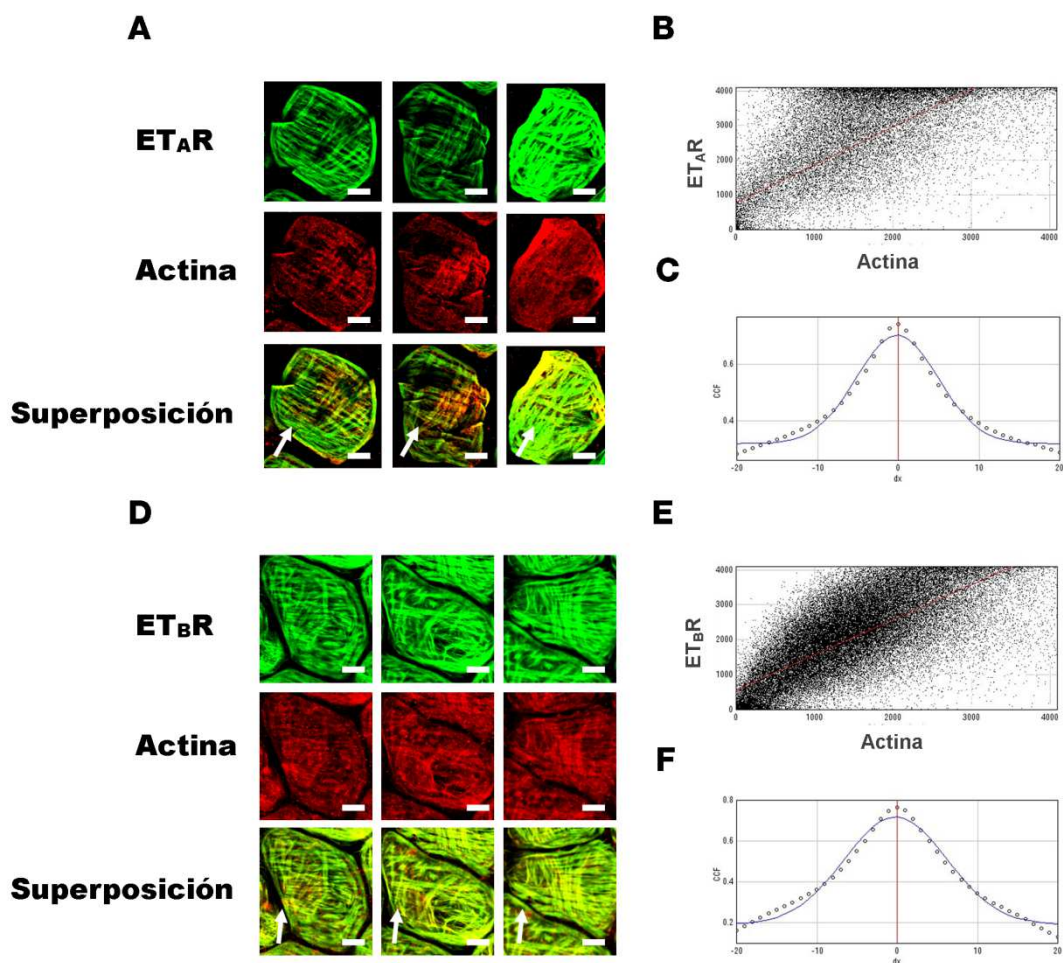


Figura 41. *Microscopía confocal de TSs expuestos a los anticuerpos específicos para ET_AR y α -actina (A) o para ET_BR y α -actina (D). B, C, E, F. Análisis de colocalización por JACoP. Gráfico de dispersión de los eventos de colocalización para ET_AR vs α -actina (B). Función de Van Steensel: Relación de PCCs vs desplazamiento de píxeles (∂x) para ET_AR (C) y para ET_BR (F). Gráfico de dispersión de los eventos de colocalización para ET_BR vs α -actina (E). Flecha: Eje principal del TS.*

4.1.3.3.3. Distribución de los transportadores de Ca⁺² en el retículo endoplasmático.

Existen descripciones en la bibliografía que mencionan que la vía de señalización del receptor ET_AR ocurre con dependencia del transportador de Ca⁺² IP₃R del retículo endoplasmático, mientras que la de ET_BR lo hace a través de RyR. En base a esto, resultó interesante analizar cómo era la distribución de estos transportadores de Ca⁺² en la célula MP.

Para este ensayo, se utilizaron TSs digeridos con colagenasa que se incubaron con los anticuerpos específicos para α -actina e IP₃R o con los anticuerpos para α -actina y RyR3.

Por medio de microscopía confocal se comprobó que IP₃R se distribuía en el interior de toda la célula MP, pero con una mayor concentración alrededor del núcleo (Figura 42 A). Por medio de esta técnica no se pudo diferenciar si IP₃R se distribuía de una manera polarizada, es decir, si se

localizaba próximo a la capa interna o a la capa externa de FA. Al determinar el grado de colocalización de IP_3R con α -actina, se notó que estas dos proteínas no colocalizaban, lo que pudo observarse también en la imagen que tenía los dos canales superpuestos (Figura 42 B). Sin embargo, en el gráfico de la función de Van Steensel en el que se relaciona la variación del coeficiente de colocalización con el desplazamiento de una imagen respecto de la otra, se encontró una cierta distribución complementaria entre ambas proteínas, ya que en un comienzo ($\partial x=0$) las imágenes provenientes de cada canal no colocalizaban, pero a medida que se producía el desplazamiento de una de ellas en un sentido u otro, el coeficiente de colocalización aumentaba (Figura 42 C).

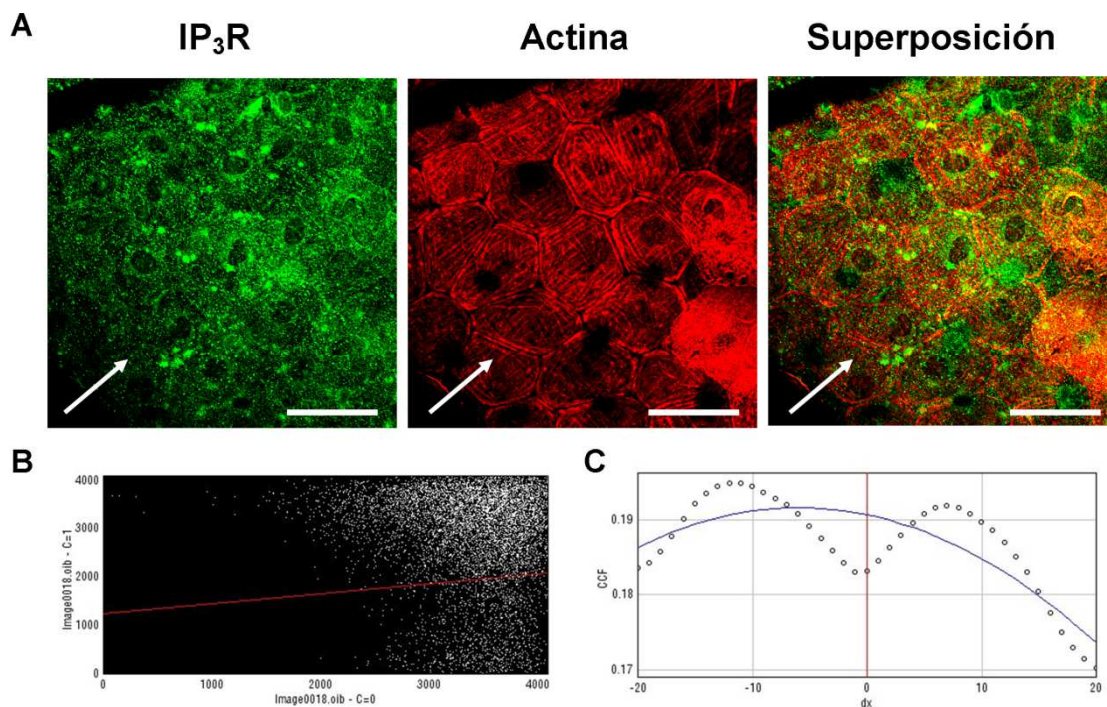


Figura 42. **Colocalización entre IP_3R y los FA en la célula MP.** **A.** Microscopía confocal de las células MP incubadas con los anticuerpos específicos para IP_3R y α -actina. **B, C.** Análisis de colocalización por JACoP. **B.** Gráfico de dispersión de los eventos de colocalización para IP_3R vs Actina. **C.** Función de Van Steensel: Relación de PCCs vs desplazamiento de píxeles (∂x). **Flecha:** Eje longitudinal del TS. **Barra:** 50 μm .

En cuanto a RyR3, por microscopía confocal se notó que este receptor adoptaba un modo de distribución particular: algunos receptores se distribuían de una manera homogénea en la célula MP, mientras que la mayoría se orientaba a lo largo de los FA transversales. Este fenómeno quedó evidenciado en la imagen amarillenta que provenía de la superposición de los dos canales de interés. Cuando se analizó el grado de colocalización existente entre los FA y el receptor RyR3, se determinó que el valor de PCC era de 0,629; mientras que el de los coeficientes de Mander eran de 0,865 (fracción de RyR3 que colocalizaba con actina) y de 0,796 (fracción de actina que colocalizaba con RyR3). Estos valores indicaron que RyR3 colocalizaba parcialmente con los FA de una manera que

no era aleatoria, Aparentemente, los RyR3 colocalizaban en mayor medida con los FA de la capa interna (Figura 43).

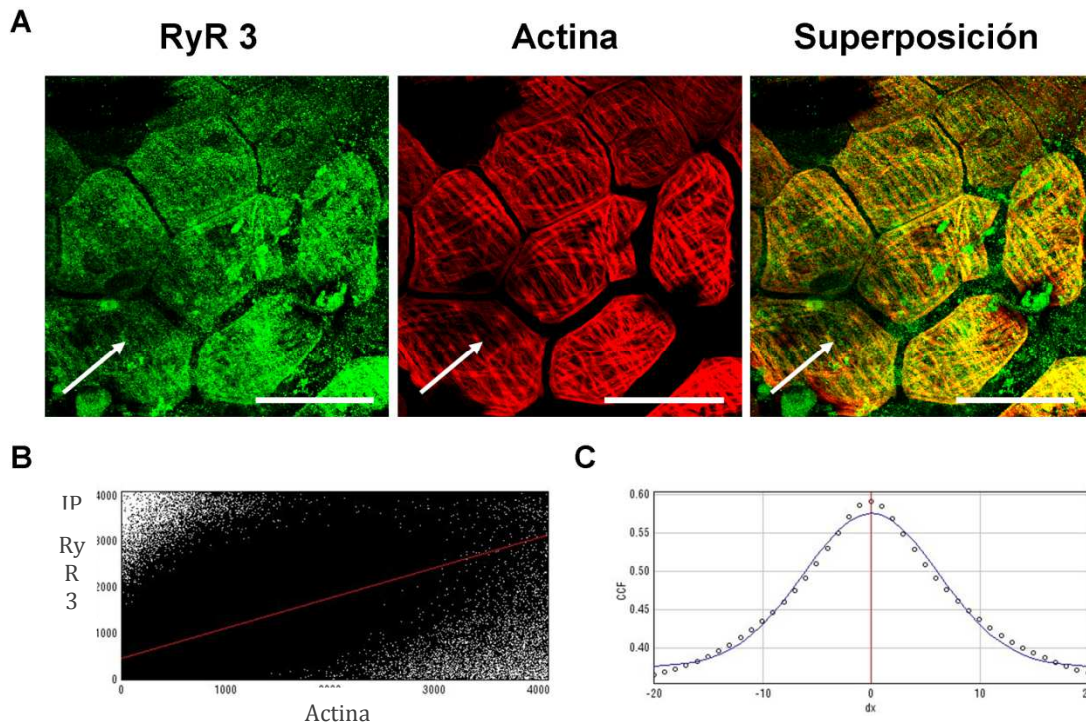


Figura 43. *Colocalización entre RyR3 y los FA en la célula MP.* **A.** Microscopía confocal de las células MP incubadas con los anticuerpos específicos para RyR3 y actina. **B, C.** Análisis de colocalización por JA-CoP. **B.** Gráfico de dispersión de los eventos de colocalización para RyR3 vs Actina. **C.** Función de Van Steensel: Relación de PCCs vs desplazamiento de píxeles (δx). **Flecha:** Eje principal del TS. **Barra:** 50 μm .

4.1.4. Respuesta de las células mioides a ET-1.

Una vez analizados los cambios que el TS experimenta cuando es tratado con ET-1 y en vista de las numerosas características que definen a la célula MP como una célula muscular lisa, resultó interesante estudiar el efecto que ET-1 causaba en la morfología de las células MP y en el modo de organización de sus miofilamentos. Además, se probó si las caveolas son necesarias para la acción de ET-1.

4.1.4.1. Morfología de la célula MP

A partir de las mediciones de los parámetros morfológicos de las células MP de los TSs contraídos se observó que el contorno celular perdía la forma poligonal, la altura se incrementaba, el área tangencial se reducía un 40%, mientras que los diámetros celulares x e y se reducían un 10,7% y un 27,3%, respectivamente, en relación al control (relajado) (Tabla 4, Figura 44).

		Tratamiento		% Cambio
		Control	ET-1	
TS	Diámetro (μm)	315,8 \pm 8,4	187 \pm 5 ***	- 40,6 \pm 1,97
Células MP	Área Tangencial (μm^2)	1776 \pm 19,3	833,1 \pm 15,45 ***	- 53,2 \pm 2,16
	Diámetro X (μm)	43,9 \pm 1,7	39,2 \pm 1,9 *	- 10,7 \pm 2,54
	Diámetro Y (μm)	48,4 \pm 1,7	35,2 \pm 1,5 **	- 27,3 \pm 3,52
	Altura (μm)	1,9 \pm 0.1	5,9 \pm 0.3 ***	+ 210,5 \pm 11.06

Tabla 4. *Parámetros morfológicos del TS y de la célula MP relajada (control) o contraída con ET-1.* (*) $p \leq 0,03$, (**) $p \leq 0,008$, (***) $p \leq 0,0001$, (diferencias significativas respecto al control).

4.1.4.2. Citoesqueleto de actina y miosina

Cuando se examinaron por microscopía confocal a las células MP luego del tratamiento con ET-1, se notó que a pesar de la contracción se mantuvo la organización de los miofilamentos en dos capas independientes. En el Z-stack de las células contraídas se notó que en las SOs más internas primero aparecían los filamentos de la capa circular que se encontraban en el “vértice” del cono en el que se transformaba la célula a causa de la contracción, mientras que en las SOs subsiguientes aparecía el resto de los miofilamentos de la capa circular interna. Cuando se alcanzó la SO más externa, se pudo ver la base plana de las células cónicas donde los filamentos de la capa externa formaban bandas compactas en la zona central de la célula MP. Llamativamente, las bandas compactas de una célula se correspondían con las de las células que estaban contiguas en dirección al eje del túbulo. En la Figura 44 se muestran las imágenes integradas de todas las SOs que se obtuvieron mediante la función Z-stack.

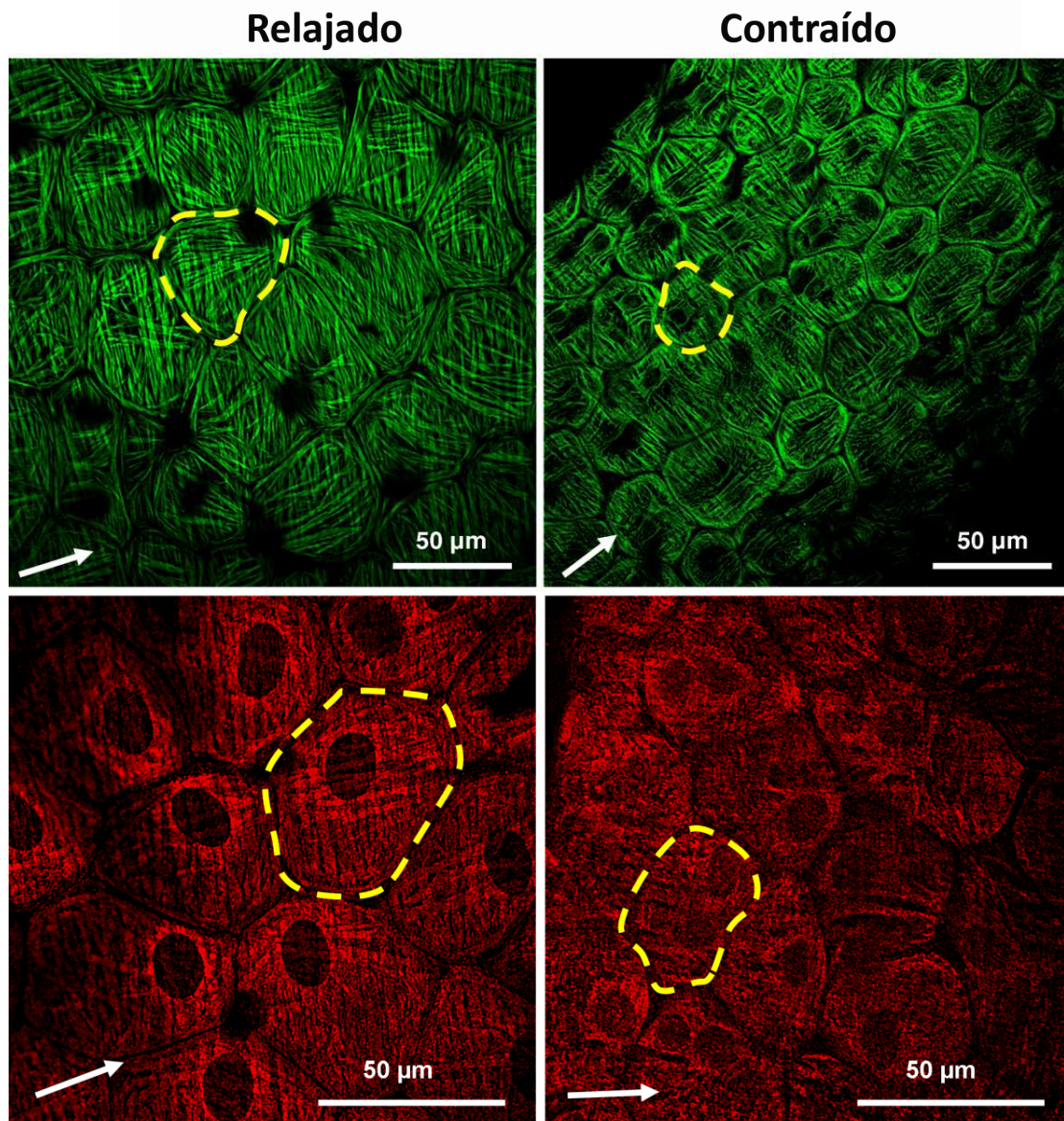


Figura 44. *Microscopía confocal de TSs controles y tratados con ET-1*. Imágenes integradas de todas las secciones ópticas que se obtuvieron en el mismo campo. Filamentos de actina (verde) y miosina (rojo) de la célula MP. **Flecha:** Eje principal del TS. **Área punteada:** Contorno de la célula MP.

4.1.4.3. *Modificaciones ultraestructurales por acción de ET-1*

Cuando se observaron con MET los TSs tratados con ET-1, éstos presentaban células MP contraídas con la misma morfología descrita en el ítem 4.1.2.2.1. Las células MP tenían mayor grado de entrecruzamiento de los FA y los FM (indicado por un aumento de la electrondensidad) y mayor cantidad de anclajes de los mismos a la membrana plasmática y a la envoltura nuclear (Figura 45 D). Como consecuencia, aparecían múltiples pliegues en el núcleo que contribuían a un incremento en la altura de las células MP respecto al control (Figura 45). Tanto la membrana basal del epitelio como la membrana basal externa de la célula MP tenían mayor grosor y presentaban abundantes ondulaciones (Figura 45 B). Además, el colágeno del espacio extracelular interno (entre el

Figura 45. *Microscopía electrónica de transmisión de TSs relajados y contraídos.* **A.** Corte longitudinal de un segmento de TS control. La célula MP parece plana y relajada, con su núcleo elongado (N). **B.** Corte longitudinal de TS tratado con ET-1. **C.** Corte transversal de un segmento de TS control que exhibe una célula MP relajada. El recuadro se muestra a mayor magnificación en **C'**. **D.** Corte transversal de un TS tratado con ET-1 que exhibe a una célula MP contraída. El recuadro se muestra a mayor magnificación en **D'**. **C:** colágeno, **En:** endotelio, **Ep:** epitelio, **CI:** capa circular interna de FA, **CE:** capa longitudinal externa de FA, **MB:** membrana basal, **I:** intersticio, **m:** mitocondria. **Flecha y Círculo:** Eje del TS. **Barras:** 1 μm (**A, D**) y 100 nm (**C', D'**).

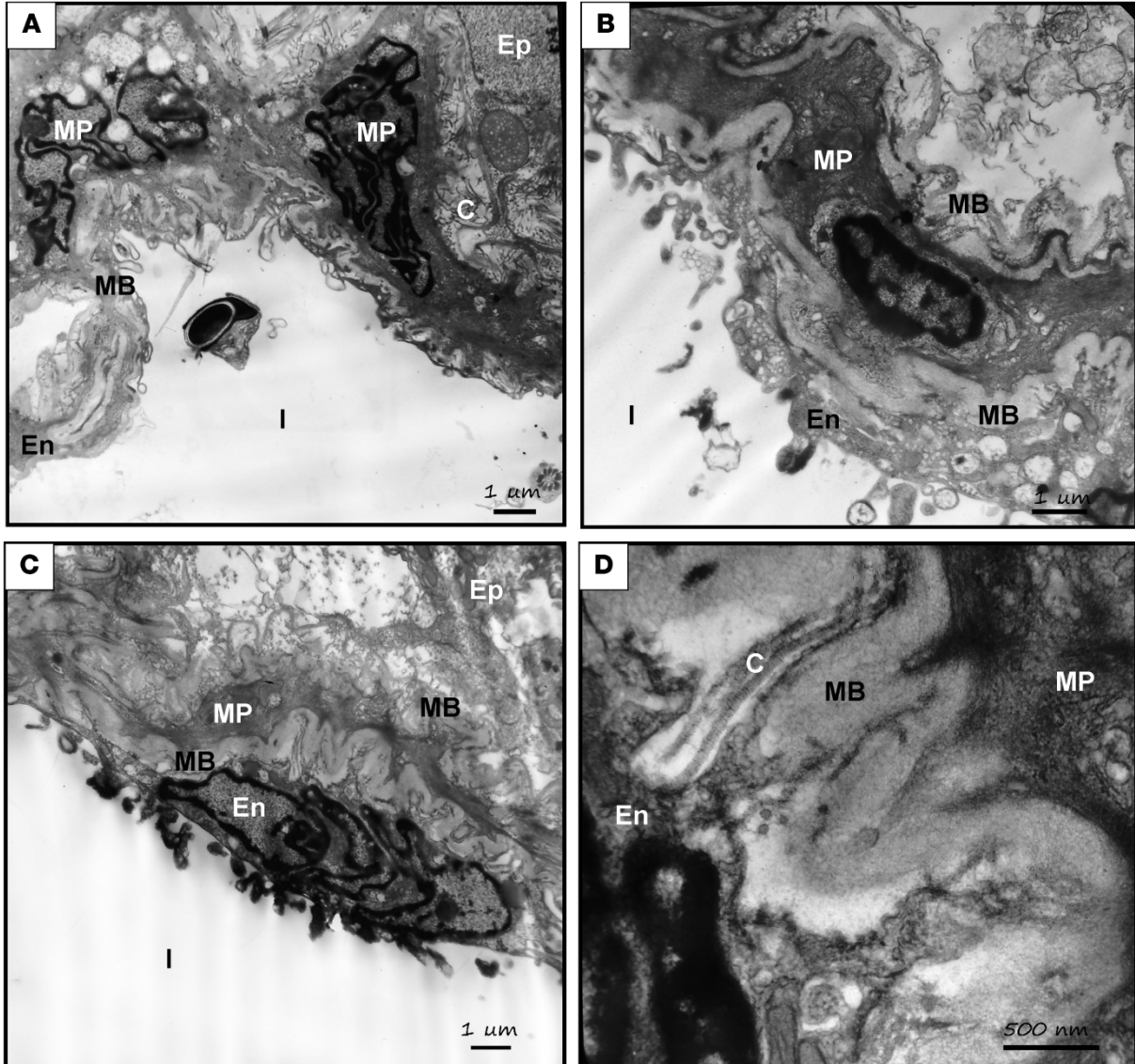


Figura 46. *Microscopía electrónica de transmisión de TSs contraídos.* **A.** Células MP contraídas con sus núcleos que protruyen hacia el epitelio seminífero. **B.** Célula MP contraída. **C.** Célula endotelial con su núcleo plegado y con múltiples prolongaciones citoplasmáticas en su superficie. **D.** Mayor magnificación del recuadro de la figura C donde se muestra el cambio de disposición del colágeno y la membrana basal engrosada. **C:** colágeno, **En:** endotelio, **Ep:** epitelio, **MB:** membrana basal, **I:** intersticio, **MP:** célula MP.

4.1.4.4. Impacto de la desintegración de las caveolas en la contracción

Se evaluó la respuesta contráctil de la célula MP depletada de colesterol (ver sección 4.1.3.3.1, página 67) con el fin de determinar si en estas células (al igual que en las células musculares lisas) las caveolas participan en la cascada de señalización que desencadena la contracción.

Cuando se analizaron por microscopía confocal TSs depletados en colesterol y expuestos a ET-1, se notó que aquellos TSs que tenían células MP con caveolas desorganizadas por el tratamiento con β -mCD no respondían al estímulo contráctil ya que el diámetro tubular, el área y los diámetros de las células MP de los TSs tratados con ET-1 eran similares a los de las células MP de TSs relajados. A pesar de la incubación con ET-1, los FA de las células MP sin caveolas presentaron el mismo modo de disposición que el de las células MP relajadas (Figura 39 y 47). En el caso de los TS que no se expusieron a β -mCD, las células MP se contrajeron con ET-1 y exhibieron las mismas características que se detallaron en las secciones 4.1.4.1 y 4.1.4.2. Cav-1 mantuvo la organización en filas transversales y longitudinales, las cuales se disponían de una manera complementaria a la de los FA de las capas subyacentes (Figura 47).

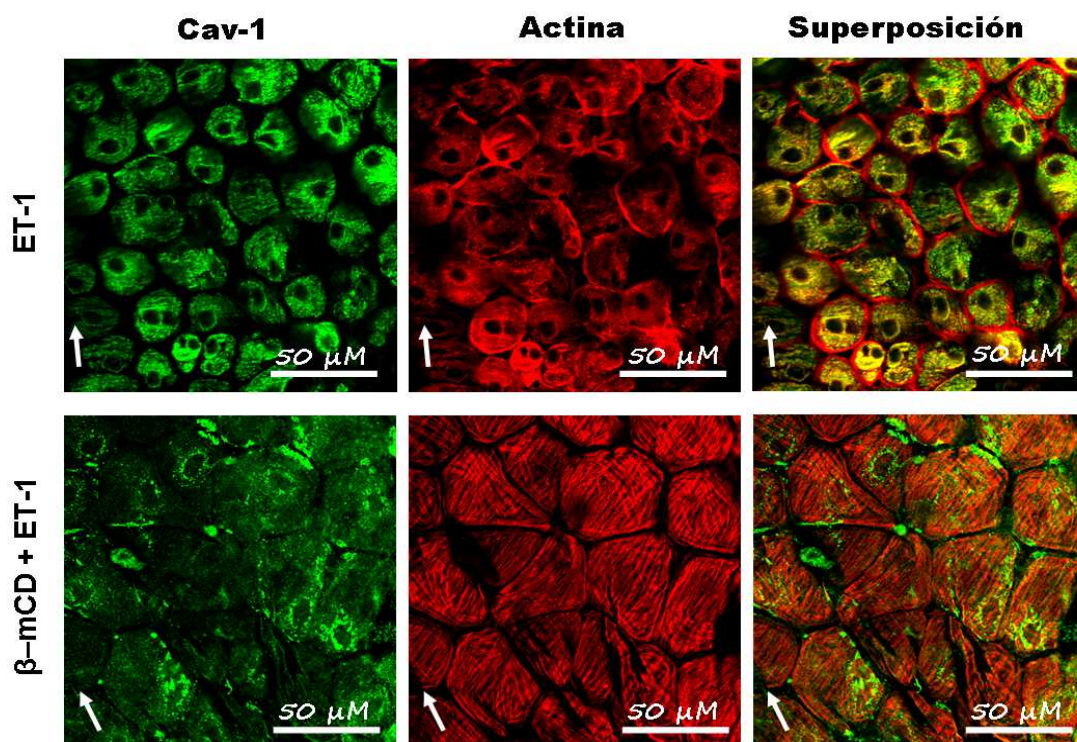


Figura 47. *Microscopía confocal de TS expuestos a ET-1, tratados o no con β -mCD. Flecha: Eje longitudinal del TS.*

4.1.5. Respuesta de las células MP a ET-1 en presencia de antagonistas de ET_AR y de ET_BR

Debido a que la célula MP tiene la particularidad de poseer dos capas de miofilamentos orientadas a lo largo de los dos ejes principales de la célula y que esto le permite contraerse en dos direcciones; se evaluó si la contracción de cada capa estaba regulada por un subtipo específico de receptor de ET-1. Para ello, se analizó la acción de ET-1 en TSs que habían sido tratados previamente con los antagonistas específicos a cada subtipo de receptor. Se determinaron las modificaciones en la longitud y en el diámetro del TS además de los cambios morfológicos que experimentaba la célula MP.

4.1.5.1. Aspecto del túbulo seminífero por lupa de transiluminación.

En los TSs expuestos solamente a ET-1 el diámetro tubular se reducía un $49,9 \pm 1,4$ %, mientras que su longitud disminuía un $16,9 \pm 2$ %. Por otro lado, en los TSs preincubados con el antagonista BQ-123 (antagonista selectivo para el receptor ET_AR) y tratados con ET-1, el diámetro tubular se reducía un $36,3 \pm 5,3$ % y la longitud de los TSs disminuía un $5,2 \pm 1,05$ %. En los TSs tratados inicialmente con BQ-788 (antagonista selectivo de ET_BR) y luego con ET-1, el diámetro tubular se reducía un $27,7 \pm 5,1$ %, mientras que la longitud se acortaba un $11,9 \pm 1,4$ %. En los TSs que se preincubaron con los dos antagonistas antes de la adición de ET-1, no se detectó ninguna modificación ni en el diámetro, ni en la longitud de los TSs (Tabla 5). Por lo tanto, el bloqueo del receptor ET_AR impide mayoritariamente el acortamiento longitudinal del TS, mientras que el del receptor ET_BR impide en mayor medida la reducción del diámetro tubular.

	Diámetro del TS (μm)			Longitud del TS (mm)		
	Antes	Después de ET-1	% Reducción	Antes	Después de ET-1	% Acortamiento
Control	302,3 \pm 2,3	157,9 \pm 1,8 ***	49,9 \pm 1,4	5,9 \pm 0,8	5,0 \pm 0,8 ***	16,9 \pm 2
BQ-123	303,3 \pm 6,5	178,5 \pm 15,7 **	36,3 \pm 5,3	6,1 \pm 0,7	5,8 \pm 0,7*	5,2 \pm 1,1
BQ-788	306,6 \pm 6,6	221,6 \pm 24,4*	27,7 \pm 5,1	6,3 \pm 0,6	5,6 \pm 0,6 ***	11,9 \pm 0,9
BQ 123 + BQ-788	303,9 \pm 3,9	294,6 \pm 6,4	3,06 \pm 2,3	6,1 \pm 0,7	6,0 \pm 0,4	1,5 \pm 0,6

Tabla 5. *Parámetros morfológicos del TS antes y después del estímulo con ET-1, preincubados o no con análogos de ET-1.* (*) $p \leq 0,03$, (**) $p \leq 0,009$, (***) $p \leq 0,0001$, (diferencias significativas respecto a los valores de los parámetros anteriores a ET-1).

4.1.5.1. Dimensiones de la célula MP

Cuando se analizaron por microscopía confocal los TSs provenientes de cada condición, se notó que en las células MP de TS expuestos solamente a ET-1, el área y los diámetros x e y de las células MP se redujeron un 77,3%; 44,0 % y 63,7%. En cambio, en las células MP de los TS ex-

puestos a ET-1 y a BQ-123 la reducción del área y de los diámetros x e y fue de 54,3%; 16,6% y 47,8%, respectivamente. Por otro lado, en las células MP de TS tratados con ET-1 y BQ-178, la reducción del área y de los diámetros x e y fue de 51,74%, 39,47% y 23,9%, respectivamente. Es necesario mencionar que en las células MP de TS expuestos a ET-1, BQ-123 y BQ-178, no se produjeron cambios en ninguno de los parámetros morfológicos analizados (Figura 48, Tabla 6).

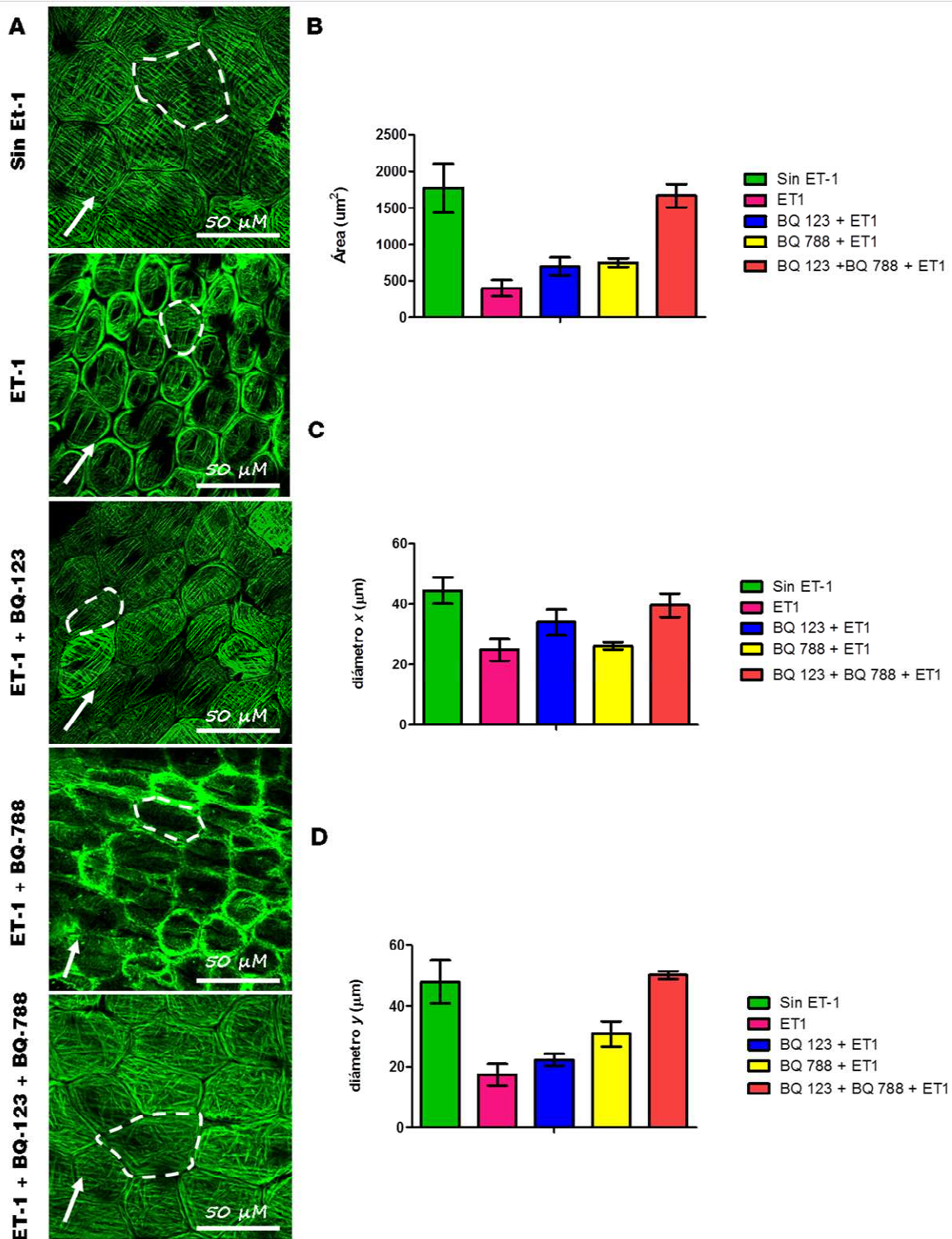


Figura 48. A. *Microscopía confocal de TS expuestos a ET-1 en presencia de antagonistas específicos de los receptores de ET (BQ-123 y BQ-788)*. B, C, D. Variación de los parámetros morfológicos de las células MP. B: Área tangencial, C: Diámetro x, D: Diámetro y. Flecha: Eje longitudinal del TS.

	Área CMP (μm^2)	% Reducción	Diámetro x CMP (μm)	% Reducción	Diámetro y CMP (μm)	% Reducción
Sin ET-1	1774 \pm 166,2	-	44,51 \pm 2,2	-	47,94 \pm 3,5	-
ET-1	398,5 \pm 16,5 ***	77,3 \pm 2,3	24,91 \pm 3,4 ***	44,0 \pm 1,7	17,37 \pm 0,5 ***	63,7 \pm 2,3
BQ-123 + ET-1	695,03 \pm 86,7 ***	54,3 \pm 3,9	34,0 \pm 3,1 *	16,6 \pm 2,1	22,3 \pm 1,3 ***	47,8 \pm 3,1
BQ-788 + ET-1	748,6 \pm 40,7 ***	51,7 \pm 1,4	26,13 \pm 0,9 **	23,9 \pm 1,1	30,7 \pm 2,9 ***	39,47 \pm 1,5
BQ 123 + BQ-788 + ET-1	1668,7 \pm 6,4	5,9 \pm 0,8	39,7 \pm 1,6	9,8 \pm 0,8	48 \pm 0,5	-

Tabla 6. *Parámetros morfológicos de las células MP de TS sin y con ET-1, preincubados o no con análogos de ET-1.* (*) $p \leq 0,03$, (**) $p = 0,0026$, (***) $p \leq 0,0001$ (diferencias significativas respecto a la condición sin ET-1).

Si se comparan los valores del área celular en los grupos estudiados se puede inferir que ambos receptores son necesarios para que la célula MP alcance su máxima capacidad de contracción. Sin embargo, la contracción del TS en presencia del antagonista de ET_AR produjo una menor reducción en el eje x de las células MP coincidente con un acortamiento a lo largo del eje tubular de tan sólo el 5%, mientras que la contracción en presencia del antagonista de ET_BR produjo una menor reducción del eje y que se tradujo en una reducción del diámetro tubular del 27 %, es decir, la mitad de lo que causó ET-1. Como puede notarse, este comportamiento diferencial de la célula MP en la contracción se reflejó en la morfología adoptada por la célula MP en cada condición.

SECCIÓN 4.2:

Características del cordón/ túbulo seminífero durante el desarrollo postnatal

El cordón seminífero experimenta grandes cambios durante el desarrollo postnatal del testículo. A lo largo de esta sección se analizará cómo la célula MP se adapta al crecimiento del cordón seminífero y cómo es el proceso de maduración que finalmente la convierte en una célula con capacidad de contraerse.

4.2.1. Cambios en el peso corporal, peso testicular y diámetro del cordón seminífero.

El primer estudio que se realizó consistió en analizar la variación del *peso testicular* respecto al *peso corporal*, *el diámetro de los cordones o túbulos* y el grado de *proliferación* de las células MP durante el primer mes de vida. Así se observó que el peso testicular desde el día 1 al día 8 pn aumentaba significativamente y que el perfil de la curva de variación presentaba un patrón similar al del peso corporal, lo que indicó que el crecimiento del testículo se producía normalmente, sin alteraciones aparentes. Sin embargo, en ese período no se encontró ninguna variación del diámetro del cordón a pesar que en esos días existía el mayor número de células MP y células de Sertoli en proliferación. Entre los días 9 y 17 pn se observó un incremento significativo no sólo del peso testicular sino también del diámetro del cordón, coincidente con el comienzo y progreso de la espermatogénesis. A partir del día 18 pn ese aumento era aún más pronunciado debido a la apertura de la luz tubular en todos los cordones (Figura 49).

4.2.2. Aspectos de la pared del cordón por microscopía óptica

Por medio de un análisis histológico se evaluaron los cambios que se producían en la pared del cordón, específicamente en la forma de las células MP desde el día 1 pn hasta el día 30 pn.

Cuando se observaron cortes de 1 μm por microscopía óptica se encontró que la pared de los cordones seminíferos pasaba de tener 2 o 3 capas concéntricas de células fusiformes presentes en el día 1 pn (con su eje mayor perpendicular al eje longitudinal del cordón) a tener 1 a 2 capas a partir del día 4 pn. Del día 1 pn al día 9 pn se observaron numerosas figuras mitóticas tanto de las células MP como de las células de Sertoli. Desde el día 9 pn hasta el día 15 pn no se observaron modificaciones en la pared del cordón, a pesar que en el epitelio seminífero ya se desencadenó la espermatogénesis. En el día 17 pn se notó un cambio en la forma de las células MP a partir de un mayor distanciamiento de los núcleos de las células que estaban contiguas en un corte longitudinal. Este hecho coincidió con la apertura de la luz tubular. Hacia el día 30 pn a pesar del crecimiento del epitelio seminífero por el avance de la espermatogénesis, la estructura de la pared tubular se mantuvo con las mismas características de los días previos (Figura 50).

	EDAD					
	1 dpn	8 dpn	15 dpn	17 dpn	23 dpn	30 dpn
Diámetro del cordón / TS (μm)	42,66 \pm 1,63	62,5 \pm 4,2	85,7 \pm 0,5	85,2 \pm 3,1	125,9 \pm 7,3	164 \pm 0,6
Peso Corporal (g)	6,64 \pm 0,17	13,75 \pm 1,77	19,73 \pm 0,06	24,61 \pm 2,37	41,33 \pm 4,41	45,06 \pm 6,47
Peso Testicular (mg)	3,28 \pm 0,06	12,94 \pm 0,33	31,3 \pm 0,06	44,07 \pm 0,6	99,56 \pm 0,82	129,5,15 \pm 3,27

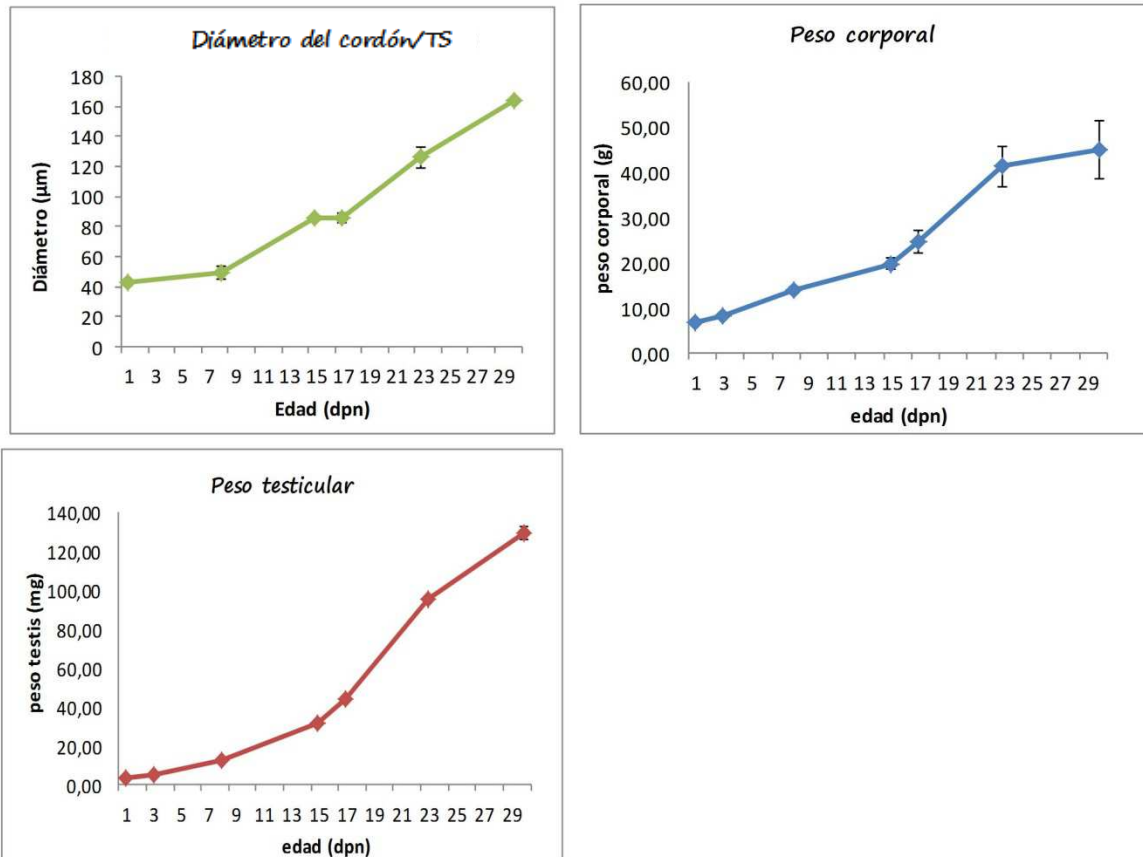


Figura 49. Variación del peso corporal, peso testicular y del diámetro de los cordones/TSs durante el desarrollo del testículo en el primer mes de vida.

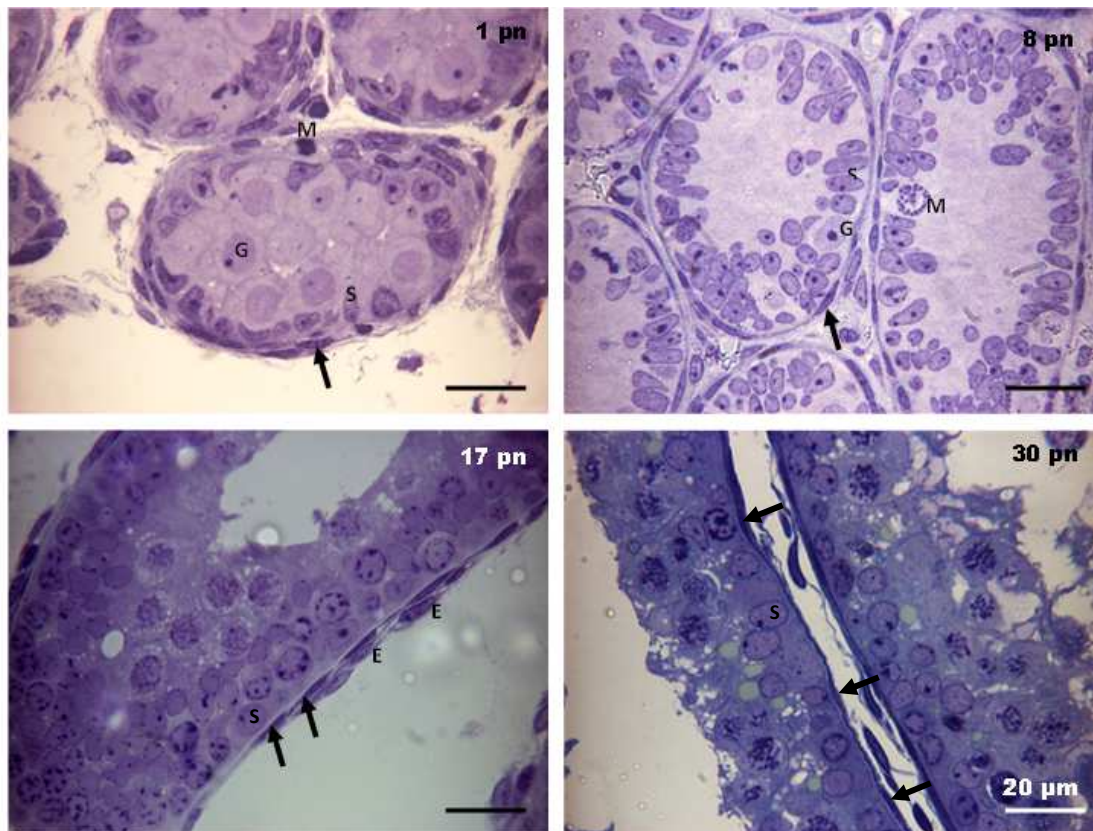


Figura 50. *Microscopía óptica de cordones/TS durante el desarrollo testicular.* G: Gonocito, S: célula de Sertoli, M: Mitosis, E: célula endotelial, Flecha: célula MP.

4.2.3. Morfología de la célula MP

En los primeros días del desarrollo posnatal del testículo la pared de los cordones seminíferos estaba constituida por varias capas de células que tenían una apariencia similar al microscopio óptico. Debido a esto se recurrió a la microscopía confocal con el fin de observar la morfología de la célula MP por medio de la marcación de α -actina.

En el período de tiempo comprendido entre el día 1 y 8 pn no fue posible distinguir la forma de las células MP por medio de esta técnica debido a la ausencia del cinturón periférico de actina que delimita a la célula MP adulta, por lo que tampoco se pudo realizar ningún tipo de medición. Del día 8 al día 15 pn las células tenían forma alargada, con su eje mayor perpendicular al del cordón. En el día 17 pn se observaron algunas células MP con forma poligonal, mientras que en el día 23 pn la mayoría de las células MP adquirieron esta forma. Hacia el día 30 pn las células mantuvieron la forma poligonal, pero sus dimensiones aumentaron (Figura 51, 52 y Tabla 7). La adaptación de la célula MP al crecimiento del cordón/TS se reflejó en los gráficos de los parámetros morfológicos, ya que los perfiles de las curvas obtenidas eran similares (Figura 52).

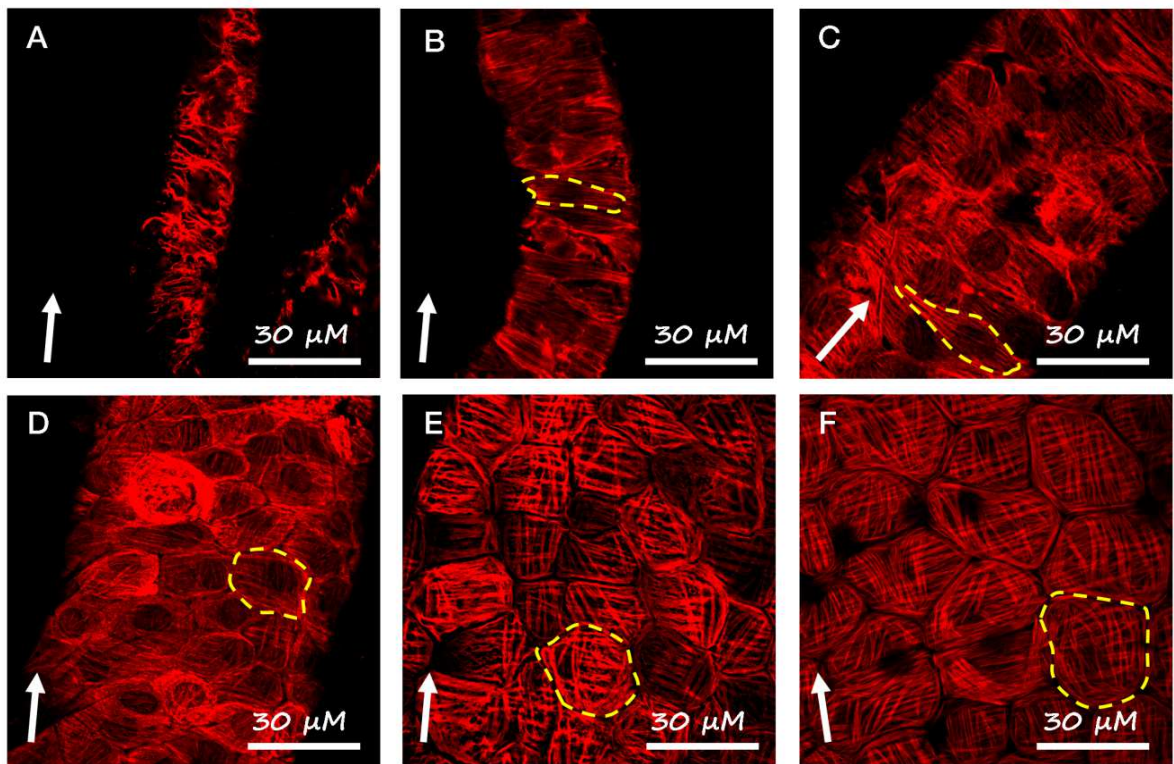


Figura 51. *Microscopía confocal de los FA de la célula MP durante el desarrollo posnatal del testículo. A: 1 dpn, B: 8 dpn, C: 15 dpn, D: 23 dpn, E: 30 dpn, F: Adulto (2 meses). Flecha: Eje principal del cordón/TS. Línea punteada: Contorno de la célula MP.*

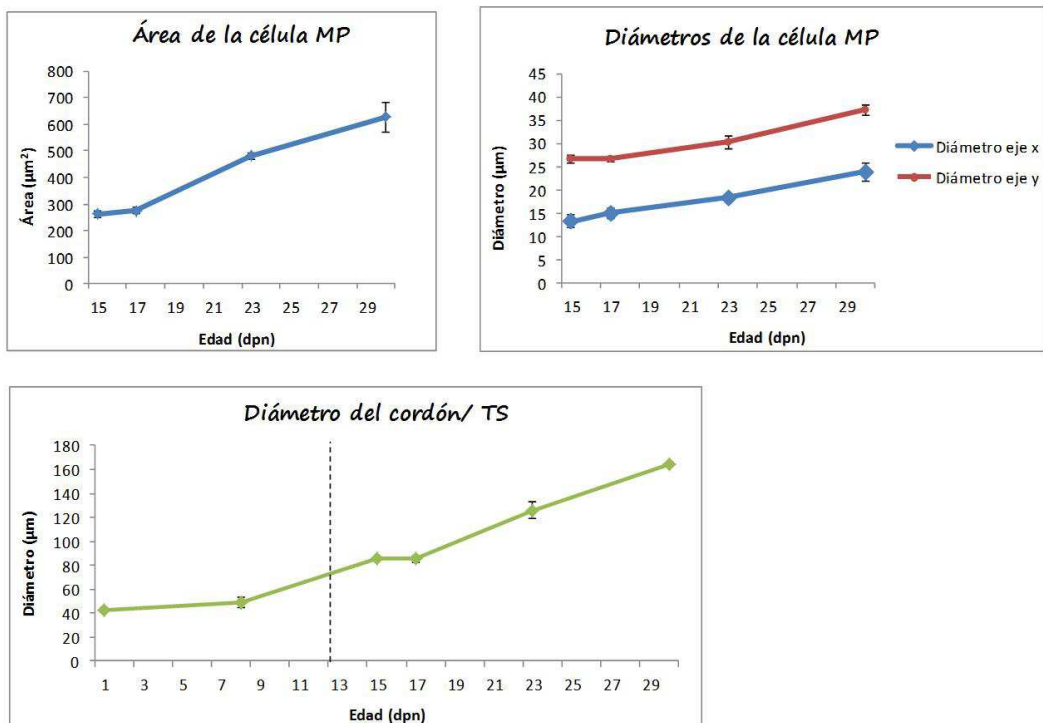


Figura 52. *Parámetros morfológicos de las células MP en el desarrollo postnatal del testículo.* La línea punteada en el gráfico del diámetro del cordón/TS indica el momento aproximado durante el desarrollo en el que es posible medir a la célula MP.

	EDAD			
	15 dpn	15 dpn	23 dpn	30 dpn
Área (μm^2)	262,6 \pm 12,6	275,3 \pm 11,2	482,2 \pm 12,2	626,2 \pm 56,2
Diámetro x (μm)	13,1 \pm 0,9	15 \pm 0,5	18,3 \pm 1,3	23,8 \pm 1,2
Diámetro y (μm)	26,6 \pm 1,4	26,6 \pm 1,1	30,2 \pm 0,8	37,1 \pm 1,9

Tabla 7. *Parámetros morfológicos de la célula MP en distintas edades del desarrollo postnatal.*

4.2.4. Disposición de los filamentos de actina

Una vez determinada la organización del aparato contráctil de la célula MP de ratas adultas y su comportamiento frente a ET-1, resultó interesante averiguar si en el momento del nacimiento ya estaban constituidas las dos capas de miofilamentos o si sus apariciones dentro de la célula MP no ocurrían simultáneamente.

4.2.4.1. Microscopía confocal

Cuando se analizó la distribución de los FA se encontró que en el día 1 pn ya había filamentos, pero éstos se encontraban distribuidos de una manera desordenada. Debido a la ausencia del anillo periférico de actina, no fue posible distinguir a qué capa de células correspondían los FA que se observaban. En el día 8 pn, en donde había una sola capa de células alrededor del cordón seminífero, las células MP mostraban únicamente FA perpendiculares al eje del cordón. En el día 15 pn en algunas células MP comenzaban a verse FA longitudinales (paralelos al eje longitudinal del cordón)

que se hicieron más evidentes hacia el día 30 pn (Figura 51). En cuanto al cinturón de actina periférico, se notó que en el día 23 pn ya era evidente, pero que en el día 30 pn éste se encontraba más reforzado.

4.2.4.2. Microscopía electrónica de transmisión

Por MET se observó que en el día 1pn la ultraestructura de las células lindantes con el cordón (posiblemente células MP) era similar a la de las células de las capas más externas. A partir del día 4 pn en adelante era posible distinguir la monocapa de las células MP cubierta a su vez por una capa de CE, planas, de menor grosor situada en proximidad al intersticio. En el día 8 pn se identificaron FA en la región citoplasmática interna de la célula MP pero éstos no estaban organizados en capas. Recién en el día 15 pn aparecía organizada la capa circular interna, con fibras en una sola dirección (transversales al cordón seminífero), mientras que en el día 30 pn se observaban las dos capas de FA totalmente organizadas y perpendiculares entre sí, con la misma disposición que se describió en la sección 4.1.3.2.5. Además, en el día 8 pn la célula MP poseía algunas caveolas, pero éstas eran más abundantes en el día 30 pn (Figura 53).

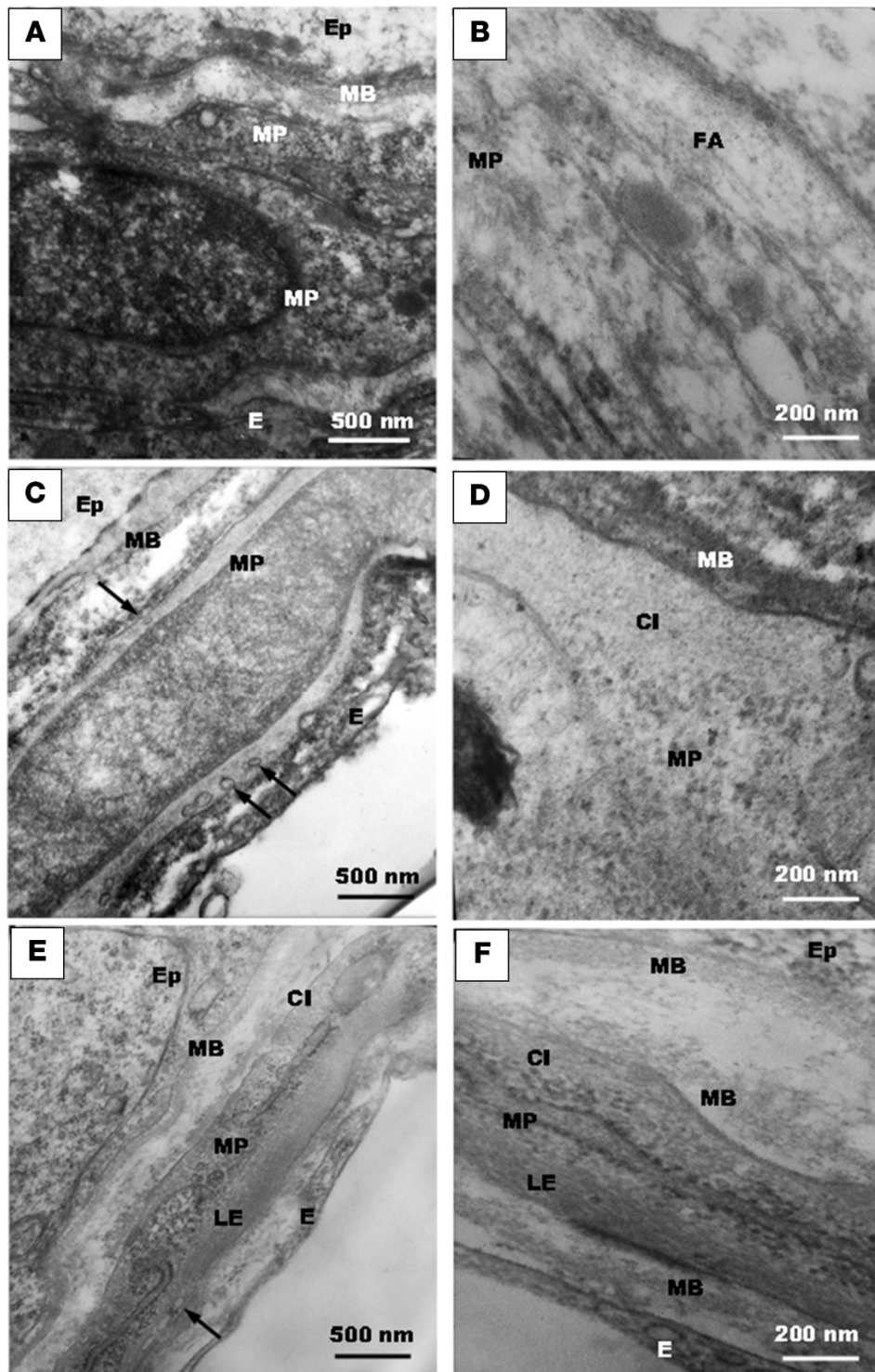


Figura 53. *Microscopía electrónica de transmisión de los cordones/TSs durante el desarrollo posnatal del testículo.* **A, B.** 8 dpn, a menor y a mayor aumento, respectivamente. **C, D:** 15 dpn, a menor y a mayor aumento, respectivamente. **E, F:** 30 dpn, a menor y a mayor aumento, respectivamente. Ep: Epitelio; E: Endotelio; MB: Membrana Basal; MP: célula MP; CI: capa circular interna; LE: capa longitudinal externa; FA: Filamentos de Actina. **Flecha:** Caveolas.

4.2.5. Distribución de Cav-1

Debido a que las caveolas se detectan por MET alrededor del día 15 pn y que en animales adultos la integridad y la organización de las caveolas son fundamentales para que la célula MP reaccione a ET-1, se analizó por inmunofluorescencia la distribución de Cav-1 durante el desarrollo testicular con el fin de determinar la relación existente entre el modo de organización de esta proteína y la respuesta de las células MP a ET-1. Para ello, muestras de cordones/TSS de cada edad se incubaron con los anticuerpos específicos para α -actina y para Cav-1.

Cuando se observaron tangencialmente los cordones/TS por microscopía confocal, se notó que en el día 8 pn Cav-1 parecía distribuirse en filas que se orientaban perpendiculares al eje del cordón seminífero. Sin embargo, en esa edad esta disposición ordenada de las caveolas no era tan evidente como en el caso de las células MP de ratas adultas. En el día 15 pn Cav-1 además de disponerse en filas perpendiculares al eje del cordón que se complementaban con los FA transversales de la capa circular interna, lo hacía también a lo largo de los FA longitudinales que estaban presentes en algunas células MP. En el día 23 y 30 pn donde todas las células MP presentaban FA transversales y longitudinales, las filas de caveolas se orientaban según la dirección de los filamentos de las capas subyacentes. Como puede verse en las imágenes, en las células MP de testículos en desarrollo la Cav-1 se distribuye de una manera complementaria a los FA pero sin estar presente en el cinturón de actina periférico (Figura 54). Este modo de distribución es similar al observado en las células MP de ratas adultas (Figura 38).

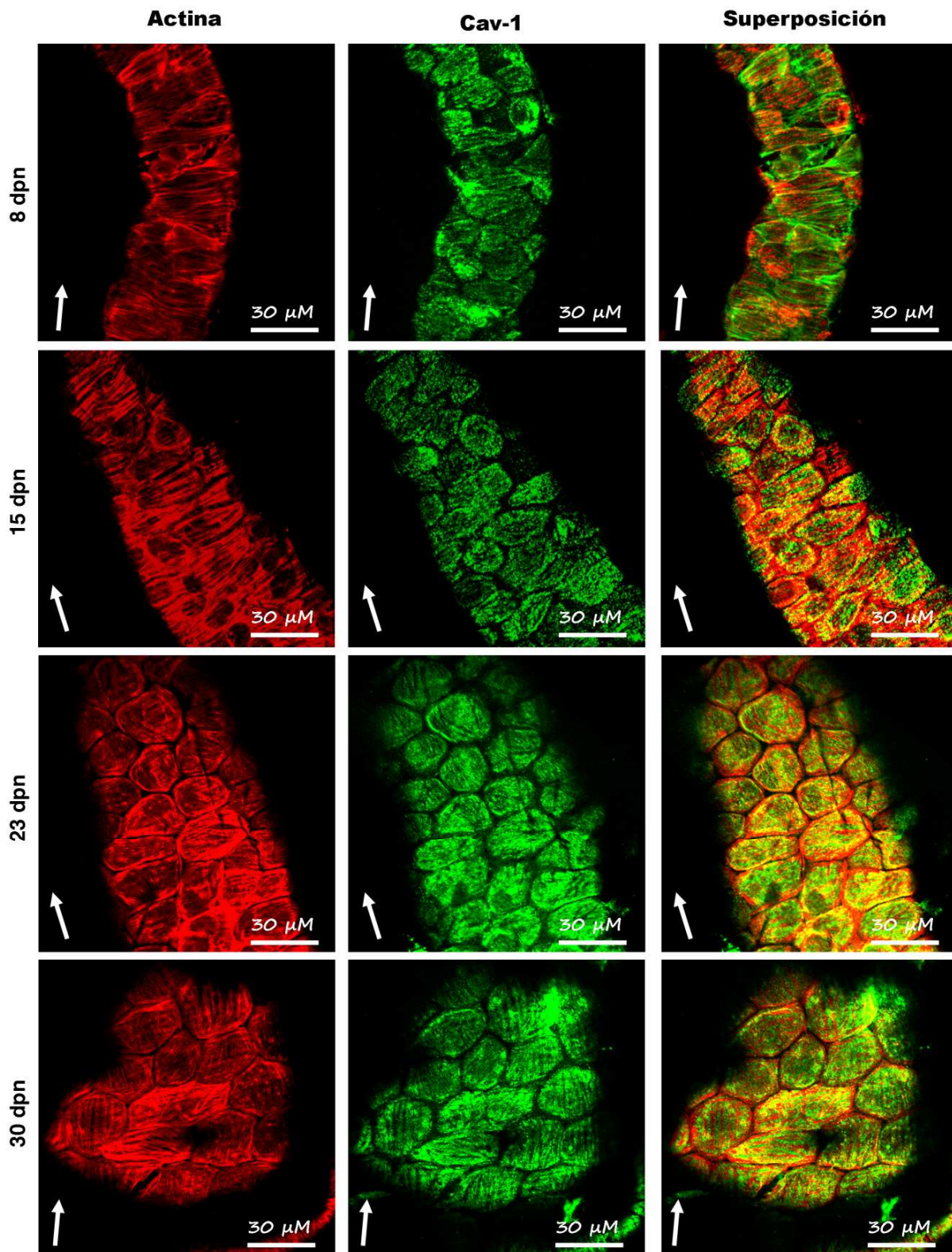


Figura 54. Microscopía confocal de Cav-1 y α -actina en las células MP durante el desarrollo posnatal del testículo. Flecha: Eje principal del cordón /TS.

4.2.6. Respuesta de los cordones/TS a ET-1

Para determinar el momento durante el desarrollo postnatal del testículo en el que la célula MP es capaz de responder a ET-1, se evaluó en diferentes edades la variación del diámetro del cordón/TS por acción de esta hormona. Así, se notó que a partir del día 13 pn aparecían estrangulamientos en algunos cordones tratados con ET-1, mientras que desde el día 15 pn en adelante este fenómeno no sólo era más evidente sino que los estrangulamientos eran más frecuentes, ya que todos los cordones respondían al estímulo contráctil (Figura 55).

Para cada muestra en estudio se midió el diámetro de los cordones/TS en fotos tomadas en el microscopio óptico antes y después del estímulo de ET-1. En las zonas donde no había estrangulamientos, el borde del cordón/TS era uniforme y el diámetro no experimentaba variaciones respecto al tiempo 0 del tratamiento. Sin embargo, en las zonas donde sí se manifestaban los estrangulamientos, la reducción del diámetro del cordón/TS era entre un 40 y un 60% independientemente de la edad estudiada (Figura 56).

Luego de haber determinado el momento en el que comienzan los efectos de la acción de ET-1 en los cordones seminíferos, se evaluaron los cambios que se manifestaron en la morfología de la célula MP y en su citoesqueleto de actina. Para ello, se recuperaron los cordones/TSs que respondieron a ET-1 y luego de la fijación con paraformaldehído se procesaron según la técnica de inmunofluorescencia para la detección de α -actina.

4.2.6.1. Dimensiones de la célula MP

Cuando se observaron las muestras en el microscopio confocal, se notó que desde el día 13 pn, los cordones/TSs presentaban estrangulamientos con células MP contraídas, El área de las células MP aparecía reducida significativamente respecto al control correspondiente. El diámetro y de las células MP disminuía por acción de ET-1, a diferencia del diámetro x que sólo manifestaba cambios significativos en el día 30 pn. Según el apartado 4.2.4, las dos capas de FA ya estaban constituidas en ese momento, por lo que se observó reducción de los diámetros celulares a lo largo de los dos ejes en los que se encuentran orientados los miofilamentos de cada capa (Tabla 8 y Figura 57).

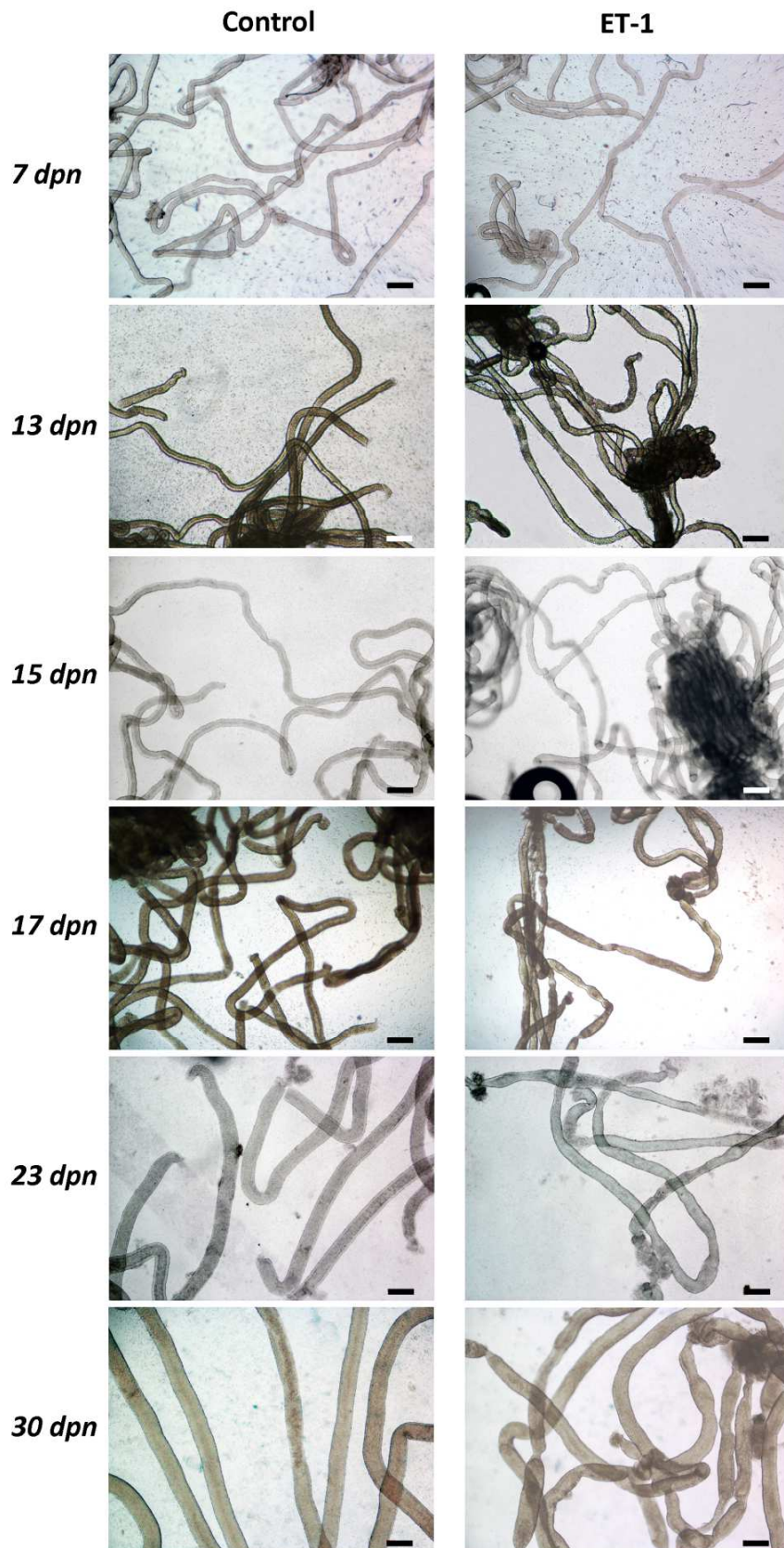


Figura 55. Cordones/TSs controles y tratados con ET-1, observados por lupa de transiluminación. Barra: 1 mm.

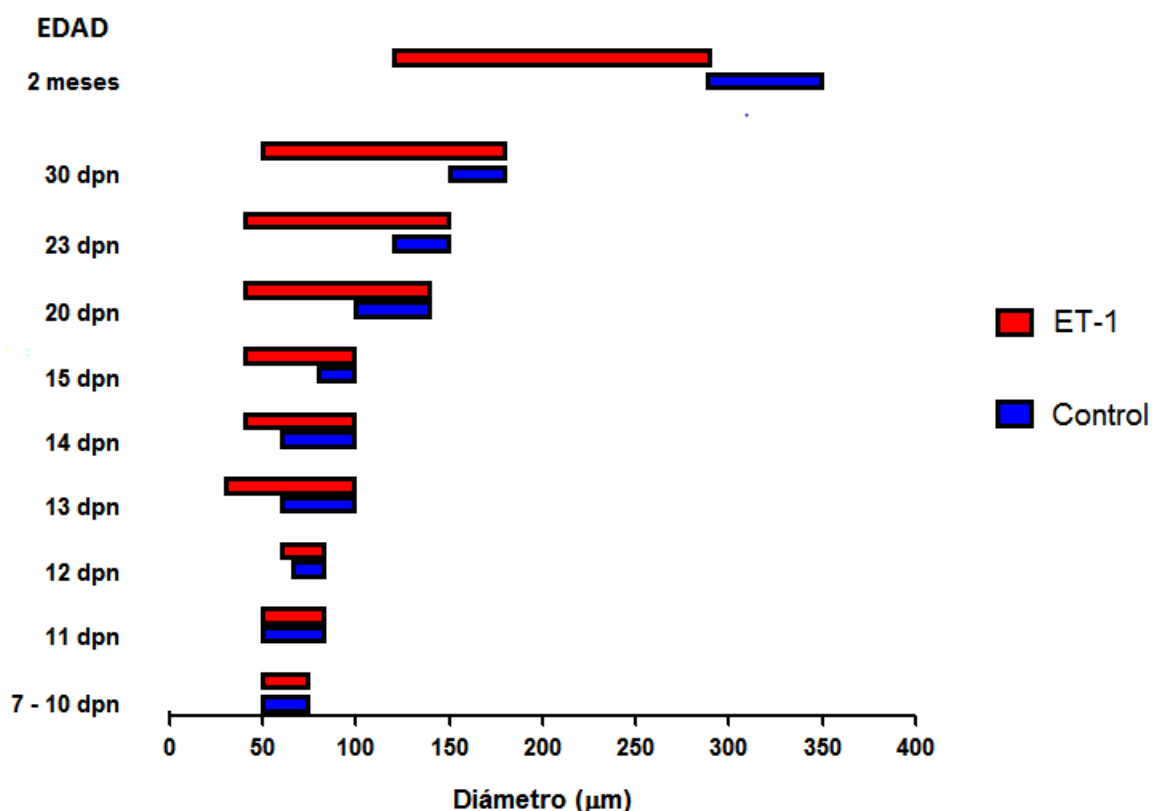


Figura 56. Rango de diámetros encontrados en los cordones/TSs controles y tratados con ET-1 para cada edad en estudio. A partir del día 13 pn en muestras tratadas con ET-1 existe un rango de diámetro que es menor al encontrado en los cordones/TSs controles y que corresponde a los estrangulamientos que se observan.

		EDAD			
		13 dpn	15 dpn	23 dpn	30 dpn
Área (μm) ²	Control	271,7 ± 17,3	262,6 ± 12,6	482,2 ± 12,2	626,2 ± 56,2
	ET-1	132,5 ± 7,8 *	106,4 ± 6,4 **	206,1 ± 8,9 **	169,2 ± 9,2 *
Diámetro x (μm)	Control	13,2 ± 0,8	13,1 ± 0,9	18,3 ± 1,3	23,8 ± 1,2
	ET-1	11,4 ± 0,6	12,3 ± 0,7	18,1 ± 0,4	14,3 ± 0,6 *
Diámetro y (μm)	Control	24,5 ± 1,5	26,6 ± 1,4	30,2 ± 0,8	37,1 ± 1,9
	ET-1	15,0 ± 0,9 *	14,2 ± 0,8 *	11,6 ± 1,6 **	15,8 ± 0,2 **

Tabla 8. Parámetros morfológicos de la célula MP relajada (control) y contraída con ET-1 en distintas edades del desarrollo postnatal. (*) $p \leq 0,01$, (**) $p \leq 0,008$ (Diferencias significativas respecto al control).

4.2.6.2. Citoesqueleto de actina.

Del análisis de los Z-stacks que se obtuvieron en cada muestra se advirtió que desde el día 13 al 23 pn la contracción de las células MP producía un abultamiento de la célula hacia el intersticio en lugar de producirse hacia el epitelio seminífero (ver sección 4.1.4.2). Cuando se observaron las SOs internas sólo se reconocían los FA próximos a la periferia de las células MP, mientras que en las

SOs subsiguientes aparecían secuencialmente los FA transversales de la capa circular interna. En los casos en los que la célula MP presentaba FA longitudinales, éstos se exhibían en las últimas SOs, sin formar bandas compactas. Sin embargo, en el día 30 pn las células MP respondían a ET-1 de una manera similar a las de los animales adultos. Cuando se analizó el Z-stack correspondiente, se notó que en las SOs más internas primero aparecían los FA de la capa circular interna que se encontraban en el “vértice” que se formaba en cada célula cuando se modificaba su forma de poligonal aplanada a cónica, mientras que en las SOs subsiguientes aparecía el resto de los FA de esa capa. En las SOs dirigidas hacia el intersticio los FA de la capa longitudinal externa aparecían en un plano y constituían bandas compactas que corrían a lo largo del TS. Al igual que en las células MP de animales adultos las bandas compactas se correspondían con las de las células MP vecinas. En la figura 57 se muestran las imágenes integradas de todas las SOs de las células MP de cada edad que se obtuvieron a través de la función Z-stack.

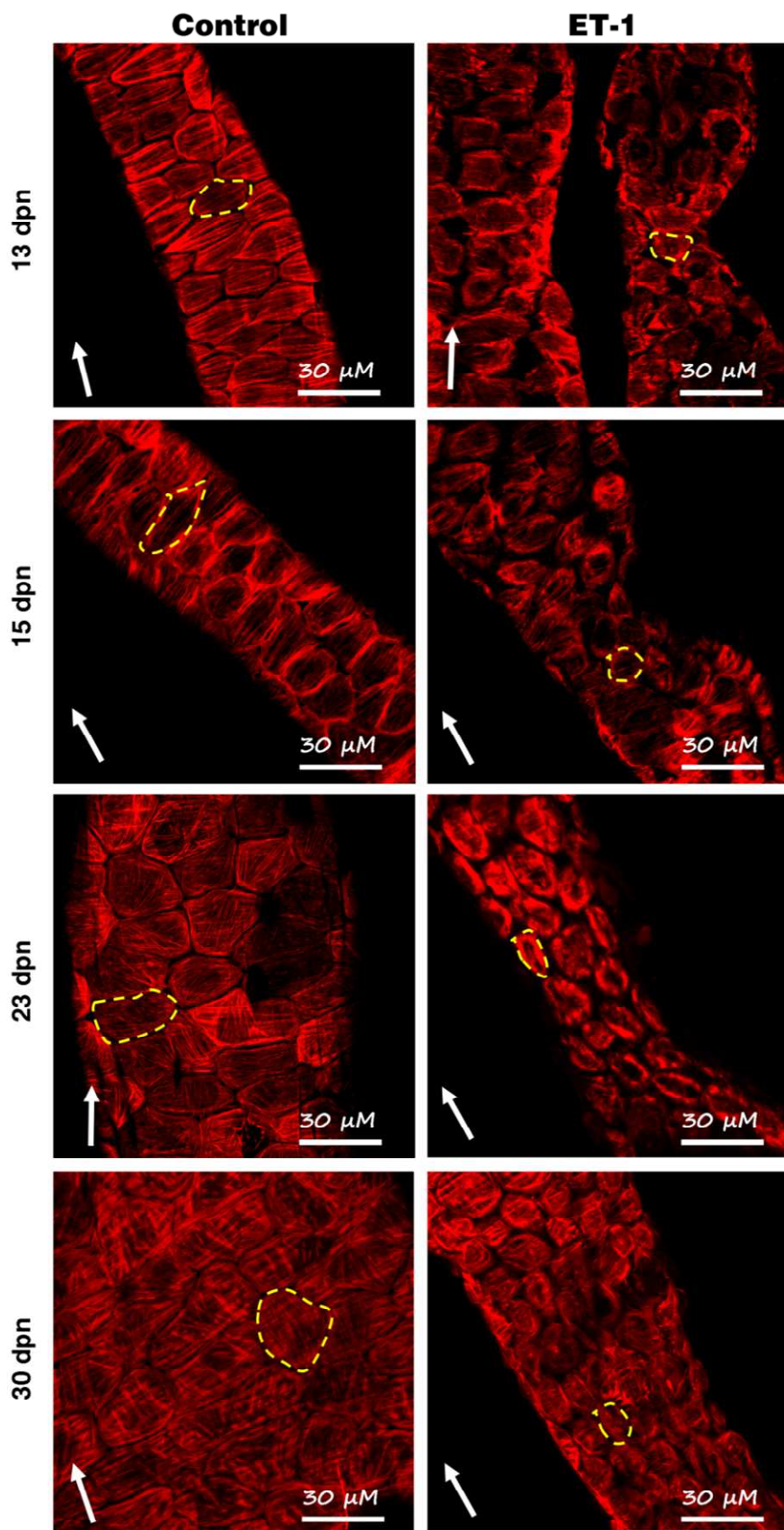


Figura 57. *Microscopía confocal de TSs controles y tratados con ET-1, marcados con el anticuerpo anti α -actina-Cy3*. Cada imagen corresponde a la integración de todas las secciones ópticas que se obtuvieron del mismo campo. **Flecha:** Eje longitudinal del cordón/TS. **Área punteada:** Contorno de la célula MP.

Capítulo 5

DISCUSIÓN

El propósito principal de esta tesis fue caracterizar la estructura contráctil de las células MP y luego ver cómo se alcanza esta complejidad desde la rata neonata a la adulta. Para poder lograrlo se abordó esta temática desde distintos tipos de microscopía: óptica, confocal, electrónica de barrido y electrónica de transmisión.

A continuación se realizará una revisión de los resultados obtenidos en respuesta de cada uno de los objetivos planteados. Primero se analizarán las características de la pared del TS y los cambios que se manifiestan en ella cuando el TS se contrae. Posteriormente, se relacionarán estos resultados con las características que convierten a la célula MP en una célula capaz de contraerse de una manera muy particular. Finalmente, se interpretará el proceso de maduración de la célula MP que tiene lugar durante el desarrollo postnatal del testículo

5.1. Características de la pared del TS

Las células MP y las CE que forman parte de la pared del TS son células planas y poligonales que tienen un aspecto similar al microscopio óptico (Figura 20). Sin embargo, cuando se observan por MET se reconocen diferencias estructurales entre estos dos tipos celulares. Las células MP presentan las características propias de las células musculares lisas: el citoplasma contiene abundantes FA, sus organelas están localizadas en el centro de la célula, poseen numerosas caveolas en la membrana plasmática y se encuentran rodeadas por una membrana basal propia. Las CE en cambio, carecen de una membrana basal propia a su alrededor, tienen un citoplasma sin FA y con escasas organelas. Al igual que las células MP, las CE poseen caveolas, pero éstas no se encuentran confinadas únicamente en la membrana plasmática sino que también aparecen en el interior de la célula para su participación en el transporte de sustancias.

5.1.1. Efectos que se producen en el TS por la contracción

La progresión del fluido testicular y de los espermatozoides (inmóviles) hacia la rete testis depende de la actividad contráctil del TS. Existen evidencias de un rol de ET-1 como un nuevo péptido regulador de la contracción en el testículo, producido y secretado por las células de Sertoli (Fantoni y col. 1993). En este trabajo observamos que el tratamiento *in vitro* de los TSs con ET-1, induce la aparición de zonas de contracción donde el diámetro tubular se reduce aproximadamente un 50%, acompañadas de zonas donde el diámetro no manifiesta variaciones. Además de la presencia de constricciones, los TSs que responden a ET-1 también experimentan un acortamiento a lo largo del eje longitudinal del TS. Probablemente como resultado de ambos procesos, en los TSs

aparecen movimientos ondulatorios que se acompañan de la expulsión del contenido tubular. Llamativamente, esta expulsión ocurre en el mismo sentido que el de progresión de la onda espermatogénica (Figura 24). Estas observaciones coinciden con las de Roosen-Runge (1951) quien confirmó que a lo largo del TS se producen contracciones que parecen trasladarse en dirección a la rete testis. A pesar que Harris y col. (1998) mencionan que las contracciones *in vitro* de los TSs no son más que un artefacto causado por la escisión y el aislamiento de los TSs, los efectos que se describen en este trabajo no se presentan en los segmentos de los TSs controles. Por lo tanto, ET-1 induce efectivamente la contracción de los TSs, lo que promueve la expulsión y el traslado del fluido testicular y de los espermatozoides recién espermiados del lumen del TS hacia la rete testis.

En los cortes histológicos transversales de los TSs tratados con ET-1 se advierte que las células MP tienen mayor grosor al adoptar una morfología cónica, cuyo vértice se encuentra orientado hacia el epitelio seminífero (Figura 25, 45 B). Por otro lado, en las imágenes tangenciales de la célula MP tomadas en el microscopio confocal, se observa que por acción de ET-1 el área celular se reduce y el contorno de las células se vuelve más redondeado que el control (Figura 44). A partir de la información aportada por el microscopio óptico y por el microscopio confocal se propone un modelo sobre la morfología que adoptan las células MP a causa de la contracción (Figura 58).

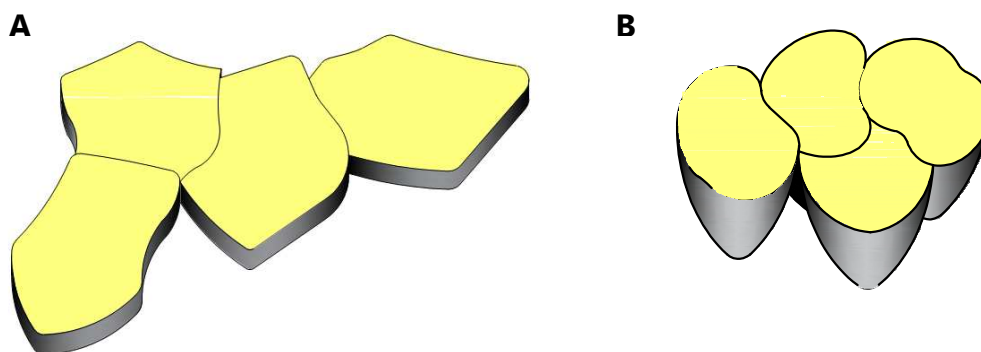


Figura 58. *Modelo de la morfología adoptada por las células MP tratadas con ET-1. A, Células MP control. B, Células MP contraídas con ET-1.*

ET-1 no sólo causa efectos en la célula MP sino también en la membrana basal del epitelio seminífero y en la capa de CE. En la célula MP la contracción de los miofilamentos provoca el plegamiento del núcleo y la deformación de la célula. Las membranas basales de la célula MP presentan múltiples ondulaciones al igual que la membrana basal del epitelio seminífero (Figura 45 y 46). El colágeno de la matriz extracelular situada entre el epitelio y la célula MP modifica su disposición respecto a las membranas basales: de encontrarse paralelo a éstas pasa a estar con mayor frecuencia perpendicular, posiblemente para transmitir al epitelio seminífero la fuerza de contracción generada por la célula MP. En cuanto a las CE, a pesar de la carencia de miofilamentos responden *pasivamente*

a la contracción al emitir hacia el intersticio prolongaciones digitiformes de su citoplasma. Probablemente ésta sea la manera en que la CE se acomode a los cambios que se producen en la célula MP, ubicada debajo de ella (Figura 46).

Hay trabajos en la bibliografía (Palombi y col. 1992; Romano y col. 2005; Tripiciano y col. 1996, 1997, 1999) que evalúan el aspecto de la superficie celular como índice de la contracción de los TSs con distintos estímulos. En nuestro modelo de estudio, para observar la superficie de la célula MP por MEB era necesario remover primero la monocapa de las CE que la cubre. Para tal fin, se puso punto un método de digestión con colagenasa. Diversos trabajos publicados aplicaron en los TSs esta metodología ya sea para separar enzimáticamente a los TSs del intersticio que los rodea (Maekawa y col. 1996; Maekawa y col. 1994; Tripiciano y col. 1996, 1997, 1998) como para observar a los TSs por MEB (Murakami y col. 1979). Sin embargo, las condiciones de digestión empleadas en algunos casos eran tan suaves que la capa de CE permanecía alrededor del TS, mientras que en otros eran demasiado agresivas. Debido a esto, resultó indispensable que la remoción de las CE se realizara por medio de una digestión controlada que no afectara la morfología y función normal de la célula MP.

Para hallar las condiciones óptimas de digestión, se analizó por microscopía confocal las muestras digeridas con concentraciones de colagenasa y tiempos de incubación diferentes. Por medio del uso de anticuerpos específicos para α -actina y para β -actina se identificaron a las células MP y a las CE presentes en la pared del TS, respectivamente. A partir de los resultados obtenidos tras la observación de cada condición experimental, se notó que en las condiciones reportadas en la bibliografía (1 mg/ml de colagenasa durante 30 minutos o más) no sólo se remueve la capa de CE sino también la monocapa de células MP. Como consecuencia de un tratamiento prolongado e intenso, la colagenasa actúa sobre el colágeno de la matriz extracelular ubicada entre la membrana basal del epitelio y la de la célula MP, lo que induce la ruptura tanto de las uniones intercelulares establecidas entre las células MP como también de aquellas uniones responsables de adherir estas células a la matriz extracelular. De esta manera, las células MP se desprenden del TS y se separan entre sí. Si bien en esas condiciones se encuentran zonas donde algunas células MP permanecen adheridas, la morfología que éstas poseen está muy alterada respecto del control (ver Figura 23). Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos por Tung y col (1975), cuyo propósito era digerir con colagenasa el TS para remover las células de la pared del TS y así obtener fragmentos únicamente con células de Sertoli y células germinales para su posterior cultivo celular. En nuestro trabajo, por medio de un seguimiento directo de las células MP y CE se pusieron a punto las condiciones óptimas de digestión de los TSs con colagenasa (0,5 mg/ml, durante 5 minutos). De esta manera fue

posible observar la superficie de la célula MP en el MEB, requisito indispensable al momento de analizar los cambios que se producen en ella a causa de la contracción.

Cuando se analizaron por MEB los TSs cuya capa de CE había sido digerida óptimamente, se notó que por acción de ET-1 la superficie de la célula MP deja de tener un aspecto liso para pasar a tener pliegues que están orientados principalmente en la misma dirección del eje longitudinal del TS (Figura 27).

Por otro lado, en los TSs intactos (sin digestión enzimática previa), se notó que la superficie poligonal y plana de las CE relajadas se cubre de numerosas prolongaciones digitiformes pequeñas e irregulares cuando los TSs se contraen por acción de ET-1 (Figura 26). Esas proyecciones son las mismas que se aprecian tanto en el microscopio óptico como en el MET (Figura 25 y 46). Estos resultados coinciden con lo publicado en arteria pulmonar, donde la superficie del endotelio exhibe múltiples prolongaciones, que son la característica distintiva de la capa interna de los vasos sanguíneos de todas las especies (Smith y col. 1971). Así, a partir de esta nueva característica que en el TS es propia de las CE, es posible identificar en los TSs intactos las zonas que efectivamente responden a ET-1.

Debido a que la superficie plegada de la pared del TS ha sido considerada como un signo de contracción causado por diferentes estímulos, es importante reconocer los cambios particulares que cada célula muestra en su superficie: la célula MP exhibe pliegues que corren paralelos al eje tubular, mientras que la CE tiene numerosas proyecciones digitiformes que no siguen ninguna dirección.

Todos estos resultados en conjunto muestran la importancia que tiene la contracción del TS en el transporte del fluido testicular y de espermatozoides hacia la rete testis. En la pared del TS se manifiestan grandes modificaciones por acción ET-1, donde la célula MP con todas las características estructurales que posee hace posible que TS se contraiga, mientras que las membranas basales y las fibras de colágeno se encargan de transmitir al epitelio seminífero y a las CE la fuerza generada por ellas.

5.2. Características de células MP

Como se mencionó previamente, de los componentes celulares que constituyen la pared del TS, la célula MP como toda célula muscular lisa, dispone de las proteínas y estructuras necesarias para la contracción. Por lo tanto, el conocimiento de la organización del citoesqueleto y de las pro-

teínas que están implicadas en la regulación de la actividad contráctil de la célula MP es crucial para comprender el rol que cumple esta célula en la contracción del TS.

5.2.1. Organización del aparato contráctil

Debido a que la organización del aparato contráctil influye en el modo en que una célula muscular desarrolla la fuerza, uno de los objetivos de esta tesis fue determinar la disposición de los FA y los FM en las células MP de los TSs de ratas machos adultas, ya que en condiciones de madurez sexual, las células MP poseen un fenotipo contráctil apto para su estudio.

Mediante microscopía confocal se demostró por primera vez la existencia de FM en las células MP, característica que es fundamental para el desempeño de su rol contráctil en el TS. A diferencia de la miosina II de músculo liso, el isotipo de miosina de la célula MP es sensible a las bajas temperaturas (Fernández y col. 2008). Es por ello que para conservar los filamentos armados es necesario mantener la temperatura a 37°C tanto durante el aislamiento de los TSs como también durante su procesamiento y fijación. Esto explicaría el motivo por el cual los FM no se han observado anteriormente en las células MP, lo que ha llevado a pensar a que estos filamentos se ensamblan únicamente en el instante previo a la contracción (Fernández y col. 2008). Sin embargo, como puede verse en la figura 29, las células MP tienen las moléculas de miosina ensambladas en filamentos aún en los TSs relajados.

Los resultados que se obtuvieron por microscopía confocal sobre la disposición de los FA y los FM se complementaron con los que se obtuvieron por MET (Figura 28, 29, 34 y 35). Así, se encontró que en las células MP los miofilamentos se disponen en dos capas bien diferenciadas e independientes: una circular interna (dirigida hacia el epitelio seminífero) y otra longitudinal externa (dirigida hacia el intersticio). La capa circular interna contiene filamentos con una orientación perpendicular al eje principal del TS, mientras que la capa longitudinal externa posee filamentos que se encuentran paralelos al eje tubular. En cada capa, muchos de los filamentos se corresponden con aquellos que tienen la misma orientación en las células MP vecinas. De esta manera, el conjunto de FA y de FM de la capa interna de todas las células MP forma una vaina continua que ciñe circularmente al TS, mientras que el de la capa externa forma cintas longitudinales que corren paralelas al eje tubular. En adición a las dos capas de filamentos, alrededor de la célula se distingue un cinturón periférico formado únicamente por FA (Figura 59).

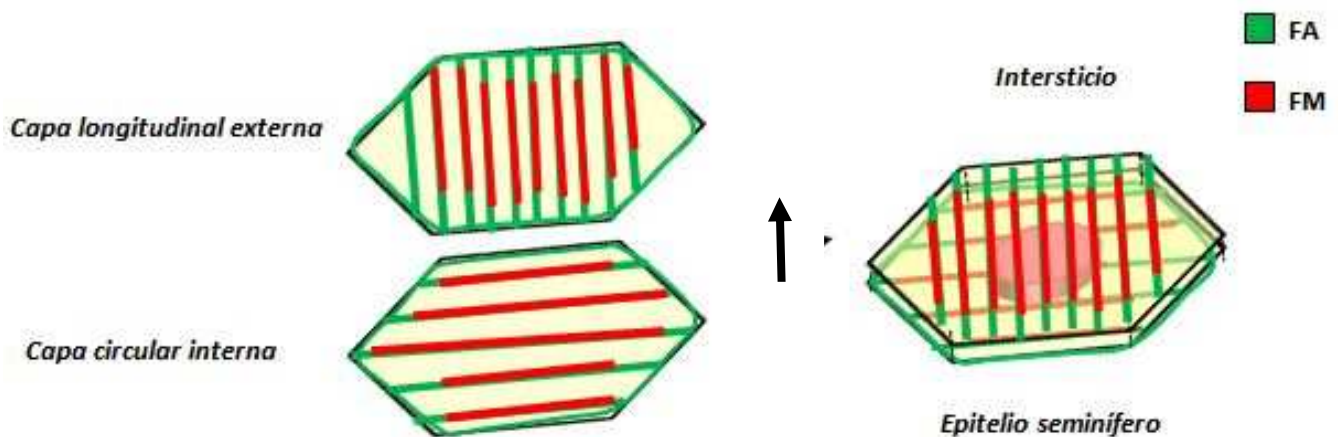


Figura 59. Modelo de organización de los FA y FM en las células MP del TS de rata adulta. **Flecha:** eje longitudinal del TS.

Este modo de organización de los FA en las células MP difiere de lo observado por Maekawa y col. (1996) y por Vogl y col. (1985), quienes describieron al citoesqueleto de actina de estas células como una red o malla ortogonal entretrejida. Probablemente en esos trabajos se hayan tomado fotografías del citoesqueleto de actina en una SO intermedia de la célula MP. Debido a que esta célula tiene apenas 1,9 μm de espesor y la resolución axial de un microscopio confocal es de 200 a 500 nm, existe una zona intermedia donde se detecta la fluorescencia de los filamentos de las dos capas, lo que da lugar a una imagen con el citoesqueleto en forma de red. Al momento de describir un proceso, es muy importante analizar lo que ocurre en toda la profundidad de la célula e integrar la información aportada por cada microscopio.

Por otro lado, se analizó la célula muscular de la pared de la arteria testicular como un ejemplo de célula muscular lisa convencional. En este modelo, las células con forma de huso se disponen con su eje principal perpendicularmente al eje de la arteria mientras que los FA y los FM que contienen se orientan únicamente a lo largo del eje celular. Como se esperaba, los FA y los FM colocan (Figura 30). Estos resultados demuestran que las técnicas utilizadas para visualizar a los miofilamentos y para cuantificar la colocación que existe entre ellos sirven para reflejar lo que sucede con estas dos proteínas, cuyo comportamiento en el músculo liso es conocido.

En la célula MP la distribución de los FA y los FM es similar, de tal manera que si se superponen las imágenes de los canales correspondientes a actina y a miosina en los ensayos de colocación, se obtiene una coloración amarilla que indica que en ambas capas los FA y los FM colocan (Figura 33). Al igual que en el músculo liso, la colocación de los miofilamentos favorecería la

interacción que se requiere para que los FM se deslicen sobre los FA y así se produzca la contracción celular.

La organización de los FA y de los FM en dos capas independientes y ortogonales entre sí dentro de la misma célula es propia de las células MP. Este hecho las diferencia de las células de músculo liso conocidas, en las que los FA y los FM sólo se disponen a lo largo del eje longitudinal de la célula, y son las células las que adoptan una determinada orientación dentro de una capa muscular (Figura 3) que refleja sus acciones fisiológicas (Kuo y Seow 2004; Longtine y col. 1985, Pollard y col. 2007). Hasta el momento no existen trabajos que mencionen este modo de distribución en otras células musculares.

5.2.2. Distribución de las caveolas

En el capítulo de introducción se mencionó el rol clave que tienen las caveolas en orquestar la activación de las vías de señalización que controlan la proliferación, la migración y la contracción. En las células musculares lisas con un fenotipo contráctil las caveolas adoptan una organización espacial muy ordenada: se disponen en filas a lo largo del eje longitudinal de la célula, en una estrecha proximidad a los miofilamentos y a las organelas que están implicadas en la homeostasis de Ca^{+2} (RE y mitocondria) (Kuo y Seow 2004; Popescu y col. 2006). Debido a que en la célula MP los miofilamentos se organizan en dos capas independientes y ortogonales entre sí, resultó interesante estudiar cómo se distribuyen las caveolas. Por MET se observó que al igual que otras células musculares lisas, estas estructuras se encuentran reclutadas en la membrana plasmática de la cara interna y externa de la célula MP. El citoplasma, en cambio, se encuentra libre de caveolas, por lo que a diferencia de lo que ocurre en las CE, estas estructuras posiblemente no participan en el transporte de sustancias (Figura 36). Estos resultados se contraponen con lo descrito por Leeson y Leeson (1963) quienes observaron que las caveolas (en ese momento denominadas como vesículas micropinocíticas) se encontraban no sólo en la membrana de la cara interna y externa de la célula MP, sino también en las membranas laterales y en el citoplasma. A partir del trabajo de Popescu y col. (2006), en donde se realizó la reconstrucción tridimensional de las imágenes obtenidas por MET del músculo liso de miometrio, vejiga, estómago y aorta, se comprobó que las caveolas intracelulares libres no eran más que una imagen falsa que se obtenía de los cortes tangenciales del músculo o de una simple sección que no reflejaba lo que ocurría en toda la profundidad de la célula. Debido a esto, es necesario tener recaudo en el momento de determinar la dirección del corte en todas las muestras analizadas por MET para poder describir correctamente el posicionamiento de las estructuras.

Cuando se observan tangencialmente a las células MP por microscopía confocal se nota que Cav-1 (proteína estructural de las caveolas) forma filas que se disponen de dos maneras: transversales (en la membrana plasmática de la cara interna) y longitudinales (en la membrana plasmática de la cara externa), en relación al eje principal del TS. Al no haber Cav-1 en las proximidades del cinturón periférico de FA, se confirma que las caveolas no aparecen en las membranas laterales de la célula (Figura 37). Luego de analizar el grado de colocalización de actina y Cav-1 se advirtió que si bien estas dos proteínas no colocalizan, adoptan una distribución complementaria de tal manera que las filas de caveolas se orientan alternadas con los FA (Figura 60).

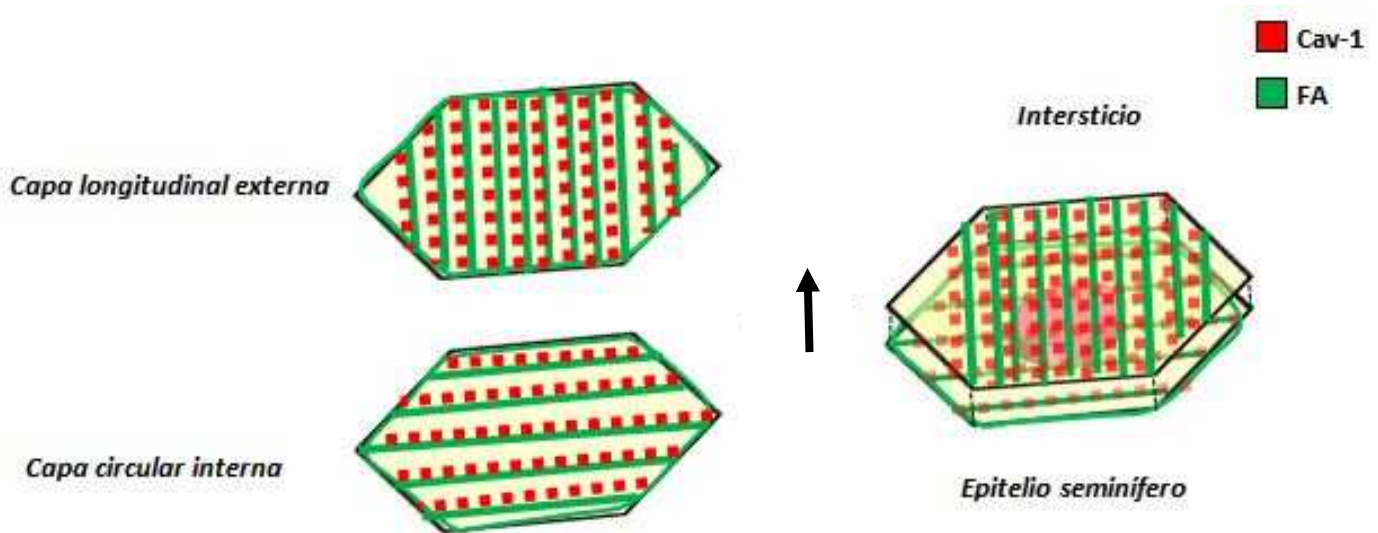


Figura 60. Modelo de distribución de Cav-1 en relación a los FA de las células MP del TS de rata adulta según la sección óptica observada en el microscopio confocal. **Flecha:** eje longitudinal del TS.

El hecho de que el modo de distribución de Cav-1 se asemeje al de los FA puede explicarse a partir de la información que se tiene sobre su estructura: Cav-1 se une a la cola intracelular de β -dístroglicano (subunidad transmembrana del complejo distrofina-glicoproteína, DGC), y por medio de distrofina se une a la actina.

Los resultados descriptos coinciden con los del trabajo de Popescu y col. (2006) en donde se demostró la cercanía de las caveolas a los FA. Por otro lado, Sharma y col. (2010), caracterizaron las consecuencias ultraestructurales asociadas a la disrupción del citoesqueleto de actina con Latrunculina A (sustancia que se une a los monómeros de actina y previene su adición para la formación de los FA). Ellos observaron que los miocitos del tejido muscular liso de tráquea exhibían la disposición característica de las caveolas en la membrana, mientras que los miocitos de las muestras expuestas a Latrunculina A presentaban un número reducido de caveolas en sus membranas plasmática y numerosas vesículas con doble membrana en el citoplasma que eran similares ultraestructural-

mente a las caveolas. Sus resultados sugirieron que la pérdida de la integridad del citoesqueleto de actina promovía la internalización de las caveolas porque se destruía la asociación de los filamentos con el DGC.

5.2.3. Distribución de los receptores de ET-1

Diversas observaciones sostienen que los ET_AR y ET_BR se localizan en los complejos de la membrana plasmática que contienen caveolina (Yamaguchi y col. 2003). Sakaguchi y col. (1992) demostraron por autoradiografía sobre cortes transversales del testículo de rata adulta, que los sitios de unión a ET-1 se concentran en la capa de células MP y en las células de Leydig del intersticio. En este trabajo de tesis se muestra por primera vez la distribución de los receptores de ET-1 de la célula MP en imágenes tangenciales del TS tomadas en el microscopio confocal. Así, se observó que en la célula MP tanto ET_AR como ET_BR están dispuestos en filas que se orientan perpendiculares y paralelas al eje tubular, de la misma manera que se disponen los FA (ver Figura 40). Si se analiza el patrón de colocalización entre actina y ET_AR o ET_BR en la célula MP relajada, se observa que la colocalización es casi completa (Figura 41 y 61). Si se tiene en cuenta que Cav-1 y actina no colocan sino que tienen una distribución complementaria, estos resultados indicarían que los receptores de ET-1 en la célula MP aparentemente no se encuentran reclutados en las caveolas. Quedan por realizar dos ensayos para concluir si los receptores de ET-1 están presentes o no en esas estructuras: por un lado el estudio de colocalización entre Cav-1 y los receptores de ET-1 y por el otro, el aislamiento de las membranas enriquecidas en colesterol (y por lo tanto ricas en caveolas) con el subsiguiente ensayo de western blot para Cav-1, ET_AR y ET_BR.

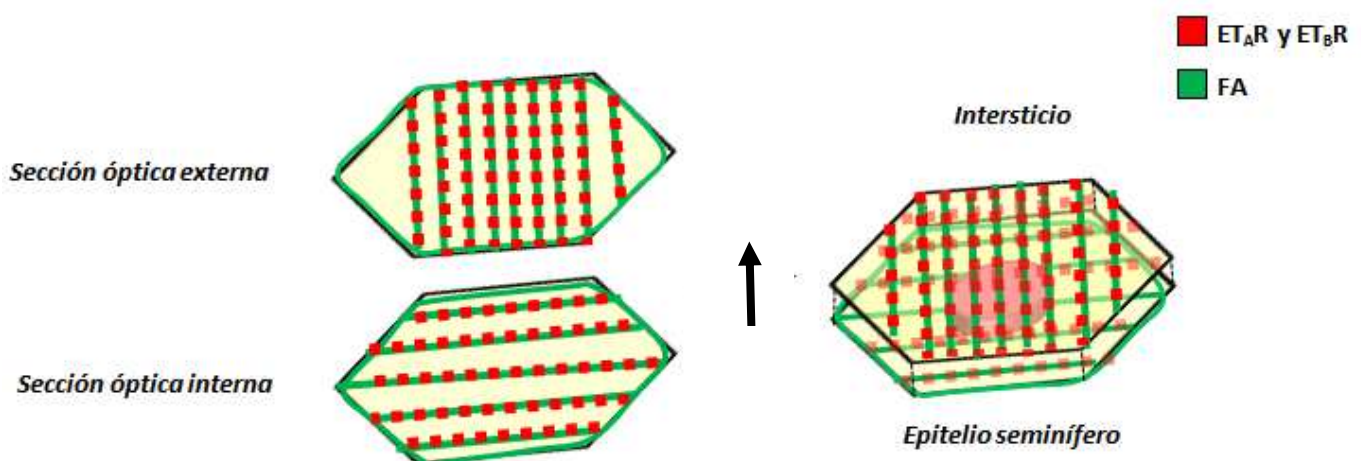


Figura 61. Modelo de distribución de los receptores de ET-1 (ET_AR y ET_BR) en relación a los FA de las células MP del TS de rata adulta según la sección óptica observada en el microscopio confocal. **Flecha:** eje longitudinal del TS.

De ser cierto que los receptores están en la membrana plasmática por encima de los FA y no en las caveolas, se plantea una diferencia con lo publicado por Chun y col. (1994) para fibroblastos en cultivo, donde se afirma que los receptores de ET-1 sí se encuentran en esas invaginaciones de membrana. Sin embargo, nuestro modelo es distinto al de ellos, ya que en las células musculares lisas las caveolas son fijas y no móviles. Además, el estudio de la célula MP en el TS en lugar del cultivo celular, se acerca más a lo que ocurre fisiológicamente en el testículo. Por lo tanto, de no estar los receptores en las caveolas, sería de gran importancia analizar si luego de la unión del ligando los receptores de ET-1 se translocan a las caveolas, como sucede con los receptores muscarínicos de acetilcolina.

5.3. Contracción de la célula MP

La organización de los miofilamentos en dos capas independientes y ortogonales entre sí, le permite a la célula MP producir fuerza contráctil en dos direcciones (paralela y perpendicular al eje del TS), lo que contribuye a que tanto el diámetro x como el diámetro y de la célula MP se reduzcan una vez que se desencadena la contracción. Nuevamente, esto difiere de las otras células musculares conocidas, que se contraen sólo a lo largo del eje longitudinal de la célula (Figuras 3, 28, 29 y 44).

En cuanto al citoesqueleto de actina y miosina, el tratamiento con ET-1 no modificó su organización en dos capas independientes. Si se analiza el Z-stack de las células contraídas se puede notar que en las SOs más internas primero aparecen los filamentos de la capa circular que están en el “vértice” del cono en el que se transforma la célula, mientras que en las SOs subsiguientes aparece el resto de los miofilamentos de la capa circular interna. Cuando se alcanza la SO más externa, se puede ver la base plana de las células cónicas donde los filamentos de la capa externa forman bandas compactas en la zona central de la célula. Estas observaciones se contraponen a lo descrito por Tripiciano y col. (1996), quienes sugirieron que la contracción con ET-1 induce la desaparición de la “malla” regular de FA para dar lugar a la formación de anillos de FA que rodean al núcleo. Posiblemente, los anillos a los que se refiere Tripiciano sean los FA que se observan en las SOs más internas de las células MP contraídas. Como se mencionó previamente, en el estudio de la contracción es fundamental estudiar lo que sucede en toda la profundidad de la célula y no lo que ocurre en una sola SO.

Si se comparan las imágenes obtenidas en el microscopio confocal (Figura 44) con las del MEB (Figura 27) se puede inferir que los pliegues que se distinguen en la superficie de la célula MP contraída se corresponden con las bandas compactas de miofilamentos de la capa longitudinal externa. Posiblemente los pliegues se generen como consecuencia del anclaje de los miofilamentos a

las placas y cuerpos densos de la membrana plasmática y de la envoltura nuclear. De esta manera, una vez que se desencadena el deslizamiento de los FM sobre los FA, se generan fuerzas de tracción en esos puntos que producen la deformación de la célula.

En las células contraídas el cinturón periférico de actina se engrosa. Este hecho lleva a pensar que al igual que otros tejidos de músculo liso, las uniones intercelulares establecidas por las células MP son muy importantes para que la fuerza contráctil generada en una célula se propague por toda la pared del TS. El refuerzo de las uniones intercelulares en las que interviene actina (uniones adherentes) es indispensable no sólo para que las células resistan la separación durante actividades contráctiles sino también, para que la contracción sea un evento coordinado (Kuo y col. 2004).

Diversos trabajos sugieren que la organización espacial de las caveolas y del repertorio de proteínas que se localizan en ellas son determinantes fundamentales de la respuesta contráctil del músculo liso. Debido a esto se evaluaron las consecuencias de la depleción de colesterol con β -mCD en la organización de las caveolas y en la respuesta funcional de las células MP al estímulo contráctil de ET-1. Por microscopía confocal se observó que en los TS tratados con β -mCD la Cav-1 no forma filas como describimos previamente sino que se distribuye en toda la célula. Como consecuencia del tratamiento aparecen zonas de alta concentración de esta proteína alrededor del núcleo que posiblemente se deban a un cambio parcial en la distribución de Cav-1 hacia el aparato de Golgi (Figura 39). Estos resultados se asemejan a lo observado por Thyberg (2000) en miocitos que presentan un fenotipo proliferativo y no contráctil donde las caveolas tampoco aparecen alineadas. La modificación en la distribución de Cav-1 se confirmó con el análisis de colocalización entre Cav-1 y actina, donde quedó demostrada la pérdida de la distribución complementaria entre estas dos proteínas. Cuando se analizó el efecto de la desestabilización de las caveolas en la respuesta a ET-1, se notó que aquellos TSs que tienen células MP sin caveolas organizadas no responden al estímulo contráctil, ya que no se advierte ningún cambio en los parámetros morfológicos del TS y de la célula MP (diámetro tubular, área y diámetros de la célula MP) (Figura 47). De la misma manera, Gossens y col. (2007) demostraron que el tratamiento de las células musculares lisas de la arteria pulmonar con β -ciclodextrina (análogo de β -mCD) provoca la pérdida de las caveolas en la membrana plasmática de la célula con la consecuente disrupción de los nanoespacios de Ca^{+2} que contribuyen a la respuesta contráctil, lo cual está íntimamente relacionado con la reducción observada en la movilización del Ca^{+2} citosólico que se desencadena en respuesta a la acetilcolina.

Por lo tanto, es probable que en la célula MP la depleción de colesterol provoque la pérdida de los nanoespacios que favorecen que los pequeños incrementos en los niveles de Ca^{+2} que se pro-

ducen luego del estímulo de los receptores de ET-1 se concentren (en lugar de disiparse en el citoplasma de la célula) y así desencadenen una señal. Además, como consecuencia de la desintegración de las caveolas se perdería también la organización espacial de las proteínas que están reclutadas en esas estructuras membranosas y que participan en diferentes vías de señalización.

5.3.1. Efecto del bloqueo diferencial de los receptores de ET-1 en la contracción

Interesantemente, Tripiciano y col. (1997) proponen una analogía entre la contracción del TS y la peristalsis intestinal. Como se mencionó en la introducción, las células musculares lisas del intestino están dispuestas en 2 capas que se orientan circulares (capa interna) o longitudinales (capa externa) en relación al eje del tubo digestivo. La contracción de la capa longitudinal del intestino es activada a través de la movilización de Ca^{+2} intracelular que depende de la estimulación por ADPRC de los canales de Ca^{+2} sensibles a rianodina e insensibles a IP_3 . Este mecanismo de contracción difiere del de la capa circular adyacente, el cual es mediado por la liberación de Ca^{+2} vía canales de Ca^{+2} sensibles a IP_3 e insensibles a rianodina (Kuemmerle & Makhlouf, 1995). Debido a que los ET_A R y ET_B R activan vías de señalización diferentes, es posible que en la célula MP la contracción en una dirección u otra sea operada a través de ET_A R o de ET_B R. El hecho que los miofilamentos estén organizados en dos capas independientes que se contraen en direcciones opuestas permite pensar en la posibilidad que cada receptor de ET-1 medie la contracción de una de las capas.

Para determinar si un estímulo produce la contracción diferencial de una capa de miofilamentos en la célula MP, se trataron los TSs sin y con ET-1, en presencia o no de los antagonistas que bloquean específicamente la actividad de ET_A R (BQ-123) o de ET_B R (BQ-788). Si se compara la morfología adquirida por las células MP y los valores del área y de los diámetros celulares en los grupos estudiados (*sin ET-1*; *ET-1*, *ET-1+ BQ-123*; *ET-1+ BQ-788*; *ET-1+ BQ-123+ BQ-788*), se observa que ambos receptores son necesarios para que la célula MP alcance su máxima capacidad de contracción (Figura 48). Sin embargo, la contracción celular a lo largo del eje x (en dirección al eje longitudinal del TS) se desencadenaría principalmente por la activación de la vía del ET_A R, mientras que la del eje y (perpendicular al eje tubular) se realizaría principalmente a través de la vía del ET_B R y en menor medida por el ET_A R. Esto coincide con los cambios observados en el diámetro y en la longitud de los TSs preincubados con los antagonistas y posteriormente expuestos a ET-1. En estas condiciones, cuando se bloquea ET_A R se reduce en mayor medida el diámetro tubular, mientras que cuando se bloquea ET_B R, el mayor efecto que se produce por la contracción con ET-1 es el acortamiento de la longitud del TS. Por lo tanto, semejante a lo que ocurre en el intestino, aparentemente en la célula MP la contracción de las dos capas de miofilamentos se con-

trola por receptores asociados a vías diferentes, aunque no ocurre en forma exclusiva. Sin embargo, en contraposición con lo que sucede en el intestino, ET_AR regularía la contracción de la capa longitudinal externa en lugar de hacerlo sobre la capa circular interna, la cual dependería principalmente de la actividad de ET_BR.

Gambara y col. (2008) propusieron que es fundamental que las elevaciones de Ca⁺² en el citoplasma sean altamente localizadas para obtener respuestas fisiológicas específicas a ET-1. Por lo tanto, para que esto ocurra en la célula MP donde las dos capas de miofilamentos comparten el mismo entorno, es necesario que los receptores de ET-1, u otro componente de la vía de señalización de Ca⁺² tengan una localización diferencial dentro de la célula, de tal manera que se desencadene la contracción de la capa de miofilamentos más próxima. En el caso de los receptores de ET-1, por microscopía confocal no se encontró un patrón de distribución preferencial respecto a la membrana plasmática de la célula MP a lo largo de la cual se distribuyen, por lo que posiblemente algún segundo mensajero o los canales de Ca⁺² del RE se encuentren polarizados en la célula MP respecto de las capas de miofilamentos.

En este trabajo, se muestra por primera vez la localización que adoptan los transportadores de Ca⁺² del RE en la célula MP. Cuando se analizaron las imágenes obtenidas en el microscopio confocal, se encontró que el IP₃R se distribuye homogéneamente en el interior de la célula (Figura 42). Como consecuencia de la limitación de la resolución axial de este microscopio, no se diferencia si este receptor se distribuye de una manera polarizada, es decir, si se localiza próximo a la capa interna o a la capa externa de FA. Por otro lado, cuando se analizó la localización del RyR3 se notó que este receptor adopta un modo de distribución particular, ya que algunos receptores se distribuyen de una manera homogénea mientras que la mayoría se orienta en filas transversales al eje principal del TS (Figura 43). Si bien la limitación de la resolución axial del microscopio confocal tampoco permite diferenciar si este receptor se localiza próximo a la capa interna o a la capa externa de FA, a partir de la observación de una mayor distribución del RyR3 a lo largo de los FA transversales se puede inferir que este receptor se localiza en la cercanía de la capa interna de miofilamentos, lo cual coincidiría con la hipótesis de que la vía de señalización del ET_BR regula principalmente la contracción de esa capa. Queda por determinar si el RyR3 forma un complejo con alguna proteína de unión a actina para organizarse de esa manera.

Debido al RE plano y central que posee la célula MP, por medio del inmunomarcado con anticuerpos específicos y unidos a partículas de oro coloidal de diferentes tamaños, se podría analizar por MET la localización de los transportadores de Ca⁺² del RE con mayor exactitud.

Los resultados descritos hasta el momento constituyen un claro ejemplo de la manera en que se complementan diferentes técnicas de microscopía, lo que permite realizar interpretaciones más certeras acerca de la célula. A pesar de tener un espesor de 1,9 μm , la célula MP dispone de una maquinaria contráctil altamente organizada y especializada, en la que estructuras implicadas en el control de la contracción (caveolas y receptores de ET-1) se orientan según las dos capas de miofilamentos que coexisten en la misma célula. La contracción de cada capa sería responsable de los efectos que se observan en los TSs tratados con ET-1, donde la reducción del diámetro y de la longitud del TS promueve la expulsión del contenido tubular.

5.4. Cambios fenotípicos de la célula MP en el desarrollo

Una vez determinada la organización del aparato contráctil en la célula MP de ratas adultas, resultó interesante conocer qué fenotipo manifiesta la célula MP en el momento de nacimiento y si ya se encuentran establecidas las dos capas independientes de miofilamentos o si su aparición ocurre asincrónicamente.

A partir del análisis histológico de los cordones /TSs se notó que la pared de los cordones seminíferos pasa de tener 2 o 3 capas concéntricas de células presentes en el día 1 pn, a tener 1 a 2 capas a partir del día 4 pn. Durante ese período no existen diferencias ultraestructurales entre las células que conforman la pared tubular, probablemente como consecuencia de un origen embrionario común. Las futuras células MP (aquellas que se encuentran en la capa celular interna de la pared tubular, próxima al epitelio germinativo) y las futuras CE (aquellas que se encuentran en la capa celular externa de la pared tubular, contigua al intersticio) comparten las mismas características: tienen un aspecto fusiforme (con su eje mayor perpendicular al eje longitudinal del cordón), no poseen caveolas en sus membranas plasmáticas y tampoco una membrana basal propia a su alrededor. Por inmunofluorescencia se encontró que en el día 1 pn ya hay filamentos de α -actina en las células de la pared de cordón seminífero, distribuidos en forma desordenada. Debido a la ausencia de un anillo de actina periférico, no se distingue a qué capa de células corresponden los FA que se advierten. Estas observaciones se contraponen con lo publicado por Ross (1967), quien describió que recién en el día 13 pn la célula MP muestra algunos FA en su citoplasma. La expresión de α -actina por sí sola, sin la existencia de caveolas y sin una membrana basal alrededor de las células, son indicios de que la célula MP en el comienzo del desarrollo postnatal no tiene un fenotipo contráctil. El hecho que desde el día 1 pn al día 9 pn se encuentran numerosas figuras mitóticas en la capa celular interna, indicarían que las “células MP” presentan en realidad un fenotipo proliferativo.

Llamativamente los cambios que se producen en la estructura de la célula MP durante el desarrollo del testículo están muy relacionados con los eventos que ocurren dentro del epitelio seminífero. Como mencionamos previamente en el día 9 pn cesa la proliferación de las células MP y de las células de Sertoli, momento en el cual se activa la meiosis de las células germinales y se da inicio así a la espermatogénesis.

A medida que progresa la espermatogénesis cambia la organización de los FA de la célula MP. En el día 8 pn se observa que alrededor del cordón seminífero hay una sola capa de células MP con

morfología rectangular, cuyos FA se encuentran perpendiculares al eje longitudinal del cordón sin constituir una capa compacta. En el día 15 pn ya es posible reconocer por MET la capa circular interna de filamentos con la misma disposición que se observa en los testículos de rata adulta. En el día 17 pn las células MP muestran FA longitudinales al eje principal del cordón pero éstos no constituyen una capa compacta. Curiosamente, en ese día además de producirse la aparición de los FA longitudinales, se abre la luz tubular. Recién en el día 30 pn, se pueden distinguir por MET que están constituidas las dos capas de FA, con la misma disposición que se observa en la célula MP de testículos de rata adulta. De aquí en más, la célula MP tiene que aumentar de tamaño hasta alcanzar las dimensiones de una célula adulta.

Si se comparan los datos de la variación del peso testicular, del diámetro de los cordones/Ts y de las dimensiones de la célula MP junto con los datos obtenidos del análisis histológico de los cortes transversales y longitudinales de los cordones/ Ts se interpreta que durante el desarrollo testicular las células MP atraviesan por tres etapas definidas: proliferación, cambio morfológico y estiramiento. En la primera etapa, comprendida desde el día 1 al día 8 pn, el peso testicular aumenta significativamente. Sin embargo, en ese período no se observa ninguna variación del diámetro del cordón a pesar que se encuentra el mayor número de células MP y células de Sertoli en proliferación. Esto es debido al crecimiento en longitud de los cordones, que no se refleja en los cortes transversales. En la primera semana de vida, además de encontrarse un gran número de células en proliferación, se produce una disminución en el número de capas que conforman la pared tubular, tal vez como consecuencia de una redistribución de células. Este hecho favorecería la adaptación de las células a los cambios de tamaño del cordón. Del día 9 pn en adelante, en el epitelio germinativo se desencadenan dos eventos que repercuten en el incremento del diámetro del cordón/Ts, tales como el inicio de la espermatogénesis y la apertura de la luz tubular. La segunda etapa por la que atraviesa la célula MP queda establecida con la apertura de la luz tubular, aquí se produce el cambio de forma de la célula MP, que pasa de ser fusiforme a poligonal. A medida que progresa la espermatogénesis aumenta la altura del epitelio y por lo tanto el diámetro tubular, lo que conlleva a un incremento en las dimensiones de la célula MP (tercera etapa).

Al comparar las imágenes obtenidas en el microscopio confocal con las de MET, se comprueba que se logró mayor eficacia para reconocer los FA por inmunofluorescencia que con el MET. A partir de los resultados que se obtuvieron se determinó con mayor precisión el tiempo en que aparecen los FA en cada capa respecto a lo que se había publicado anteriormente por medio de MET donde sólo se consideró la orientación de los FA (Russell y col. 1989, Dym y Fawcett 1970; Leeson y Leeson 1963; Ross 1967).

5.5. Respuesta de la célula MP a ET-1 durante el desarrollo testicular

Cuando se analizó el inicio de la respuesta de las células MP a ET-1 se observó que a partir del día 13 pn la célula MP es capaz de responder a esta hormona, ya que a lo largo del cordón seminífero aparecen zonas con estrangulamientos. Desde ese día en adelante, los estrangulamientos se hacen más evidentes y se presentan con mayor frecuencia. En todos los cordones/TSs que responden a ET-1 hay una marcada reducción en los valores del área de las células MP. Con respecto a las variaciones de los diámetros celulares, desde el día 13 al día 23 pn, únicamente se reduce el diámetro y , mientras que en el día 30 pn se reducen tanto el diámetro y como el diámetro x . Como se mencionó en el comienzo de este capítulo (ver sección 5.2.1), la organización del aparato contráctil influye en el modo en que una célula muscular desarrolla la fuerza. De esta manera, es lógico encontrar que la célula MP se contrae a lo largo del eje y en aquellos casos en los que tiene organizada sólo la capa circular interna de miofilamentos, mientras que va a ser capaz de contraerse en dos direcciones cuando disponga de la organización del aparato contráctil en dos capas independientes y ortogonales entre sí. Es necesario hacer hincapié en la importancia que tiene la constitución de cada capa de miofilamentos, ya que la simple aparición de algunos filamentos de actina y miosina en el citoplasma no es suficiente para que las células generen fuerza de contracción. Esto puede explicar el motivo por el cual la célula MP a los 8 días pn a pesar de poseer FA transversales al eje principal del cordón y algunas caveolas dispuestas en filas a lo largo de las membranas plasmáticas, no es capaz de contraerse con ET-1, ya que en este tiempo no están presentes todos los elementos que deben intervenir (Ross, 1967).

Curiosamente, entre los días 13 y 23 pn, la contracción con ET-1 produce un abultamiento de la célula MP hacia el intersticio, mientras que en el día 30 pn, cuando ambas capas de miofilamentos están constituidas y activas, la célula se abulta hacia el epitelio germinativo de la misma manera que sucede en animales adultos. Probablemente este modo de contracción hacia el epitelio seminífero sea consecuencia de la tensión generada por las bandas compactas de FA de la capa longitudinal externa que se forman cada vez que la célula MP se contrae.

El hecho que en los testículos en desarrollo, los cordones/TSs contraídos tengan pequeñas zonas con estrangulamientos, mientras que en los testículos de ratas adultas aparecen zonas extensas con el diámetro reducido podría deberse por lo menos a dos motivos. Por un lado, a que en los cordones/TSs todas las células MP no adquieran madurez al mismo tiempo, mientras que por el otro lado tal vez ese comportamiento sea consecuencia de que no se desencadenen las señales res-

ponsables de transmitir hacia las células MP vecinas la fuerza generada por las células que responden al estímulo contráctil. Así, los estrangulamientos que se observan serían producto de una contracción local y no de la propagación que conduce a una contracción global, la cual depende de la participación tanto de la matriz extracelular como de las uniones intercelulares (Kuo y Seow, 2004).

Debido a que en el testículo de ratas adultas coexisten dos capas de miofilamentos dentro de la misma célula MP sin encontrarse separadas por alguna estructura, resulta difícil estudiar la vía de señalización que opera en una capa sin experimentar la influencia de los eventos de contracción que se desencadenan en la otra capa. Por lo tanto, la disponibilidad de un modelo fisiológico donde la célula MP tiene un período ventana de 3 días con una sola capa de miofilamentos, facilita el estudio no sólo de las propiedades contráctiles sino también del modo de regulación de la contracción que posee cada capa en particular.

Todos los resultados en conjunto contribuyen a dilucidar con mayor exactitud cómo es el proceso de aparición y organización de los miofilamentos en el desarrollo posnatal. A partir de los datos obtenidos hasta el momento, se puede inferir que existe una estrecha relación entre las células MP y las células de Sertoli que influye en los eventos que conducen a la maduración de la célula MP y que la convierten en una célula muscular altamente organizada, con un citoesqueleto particular y con un rol crucial en la contracción.

Capítulo 6

PERSPECTIVAS

Para continuar con la caracterización de la célula MP proponemos los siguientes experimentos:

En animales adultos:

- *Evaluar in vivo la movilización de Ca^{+2} intracelular en las células MP a lo largo del TS luego del estímulo contráctil, para determinar cómo se producen y propagan las oscilaciones de Ca^{+2} en un modelo celular con un aparato contráctil organizado en dos capas independientes y ortogonales entre sí.*
- *Analizar la colocalización existente entre Cav-1 y los subtipos de receptor a ET-1 en las células MP relajadas y contraídas con ET-1, para comprobar si $ET_A R$ y $ET_B R$ no se encuentran reclutados en las caveolas y para determinar si la unión al ligando modifica la localización de estos receptores en la membrana plasmática.*
- *Observar por medio del inmunomarcado con anticuerpos específicos unidos a partículas de oro coloidal de diferentes tamaños, la localización de los receptores de ET-1 y de los transportadores de Ca^{+2} del RE por MET.*

En animales en desarrollo:

- *Analizar por microscopía óptica, MET y MEB los cambios morfológicos que se producen en las células MP contraídas con ET-1 a diferentes edades.*
- *Evaluar cómo es la aparición de los receptores de ET-1 en las células MP.*
- *Analizar en diferentes edades, la respuesta de las células MP a ET-1 en combinación con antagonistas de $ET_A R$ y $ET_B R$.*
- *Evaluar in vivo la movilización de Ca^{+2} intracelular en las células MP a lo largo de los cordones/TSS luego del estímulo contráctil, para evaluar cómo se producen y propagan las oscilaciones de Ca^{+2} en situaciones donde la célula MP tenga organizada sólo una capa de miofilamentos y en condiciones en las que las dos capas estén constituidas.*

Capítulo 7

BIBLIOGRAFÍA

- Arnon, A., Hamlyn, J. M., y Blaustein, M. P. (2000). Na⁽⁺⁾ entry via store-operated channels modulates Ca⁽²⁺⁾ signaling in arterial myocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 278(1), C163–73.
- Blaustein, M. P., Juhaszova, M., Golovina, V. A., Church, P. J., y Stanley, E. F. (2002). Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 976, 356–66.
- Bolte, S., y Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(Pt 3), 213–32.
- Chun, M., Liyanage, U. K., Lisanti, M. P., y Lodish, H. F. (1994). Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), 11728–32.
- Clark, R. V. (1976). Three-dimensional organization of testicular interstitial tissue and lymphatic space in the rat. *The Anatomical Record*, 184(2), 203–25.
- Combes, A. N., Wilhelm, D., Davidson, T., Dejana, E., Harley, V., Sinclair, A., y Koopman, P. (2009). Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Developmental Biology*, 326(1), 112–20.
- Cui, S., Ho, W.-K., Kim, S.-T., y Cho, H. (2010). Agonist-induced localization of Gq-coupled receptors and G protein-gated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels to caveolae determines receptor specificity of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41732–9.
- Dym, M., y Fawcett, D. W. (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction*, 3(3), 308–26.
- Fantoni, G., Morris, P. L., Forti, G., Vannelli, G. B., Orlando, C., Barni, T. y Maggi, M. (1993). Endothelin-1: a new autocrine/paracrine factor in rat testis. *The American Journal of Physiology*, 265(2 Pt 1), E267–74.
- Fawcett, D. W., Heidger, P. M., y Leak, L. V. (1969). Lymph vascular system of the interstitial tissue of the testis as revealed by electron microscopy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 19(1), 109–19.
- Fernández, D., Bertoldi, M. V., Gómez, L., Morales, A., Callegari, E., y Lopez, L. A. (2008). Identification and characterization of Myosin from rat testicular peritubular myoid cells. *Biology of Reproduction*, 79(6), 1210–8.
- Filippini, A., Tripiciano, A., Palombi, F., Teti, A., Paniccia, R., Stefanini, M., y Ziparo, E. (1993). Rat testicular myoid cells respond to endothelin: characterization of binding and signal transduction pathway. *Endocrinology*, 133(4), 1789–96.
- Hadley, M. A., y Dym, M. (1987). Immunocytochemistry of extracellular matrix in the lamina propria of the rat testis: electron microscopic localization. *Biology of Reproduction*, 37(5), 1283–9.

- Halayko, A. J., Tran, T., y Gosens, R. (2008). Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolins. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(1), 80–8.
- Harris, G. C., y Nicholson, H. D. (1998). Stage-related differences in rat seminiferous tubule contractility in vitro and their response to oxytocin. *The Journal of Endocrinology*, 157(2), 251–7.
- Juhaszova, M., y Blaustein, M. P. (1997). Na⁺ pump low and high ouabain affinity alpha subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1800–5.
- Juhaszova, M., Shimizu, H., Borin, M. L., Yip, R. K., Santiago, E. M., Lindenmayer, G. E., y Blaustein, M. P. (1996). Localization of the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger in vascular smooth muscle, and in neurons and astrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 779, 318–35.
- Kilsdonk, E. P., Yancey, P. G., Stoudt, G. W., Bangerter, F. W., Johnson, W. J., Phillips, M. C., y Rothblat, G. H. (1995). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(29), 17250–6.
- Kormano, M., y Hovatta, O. (1972). Contractility and histochemistry of the myoid cell layer of the rat seminiferous tubules during postnatal development. *Zeitschrift Für Anatomie Und Entwicklungsgeschichte*, 137(3), 239–248.
- Kuemmerle, J. F., y Makhlof, G. M. (1995). Agonist-stimulated cyclic ADP ribose. Endogenous modulator of Ca⁽²⁺⁾-induced Ca²⁺ release in intestinal longitudinal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(43), 25488–94.
- Kuo, K.H., y Seow, C. Y. (2004). Contractile filament architecture and force transmission in swine airway smooth muscle. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 8), 1503–11.
- Lacy, D., y Rotblat, J. (1960). Study of normal and irradiated boundary tissue of the seminiferous tubules of the rat. *Experimental Cell Research*, 21, 49–70.
- Leeson, C. R., y Leeson, T. S. (1963). The postnatal development and differentiation of the boundary tissue of the seminiferous tubule of the rat. *The Anatomical Record*, 147, 243–59.
- Longtine, J. a., Pinkus, G. S., Fujiwara, K., y Corson, J. M. (1985). Immunohistochemical localization of smooth muscle myosin in normal human tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 33(3), 179–184.
- Losinno, A. D., Morales, A., Fernández, D., y Lopez, L. a. (2012). Peritubular myoid cells from rat seminiferous tubules contain actin and myosin filaments distributed in two independent layers. *Biology of Reproduction*, 86(5), 150, 1–8.
- Maekawa, M., Kamimura, K., y Nagano, T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of Histology and Cytology*, 59(1), 1–13.

- Maekawa, M., Nagano, T., y Murakami, T. (1994). Comparison of actin-filament bundles in myoid cells and Sertoli cells of the rat, golden hamster and mouse. *Cell and Tissue Research*, 275(2), 395–8.
- Murakami, M., Hamasaki, M., Okita, S., y Abe, J. (1979). SEM surface morphology of the contractile cells in the rat seminiferous tubules. *Experientia*, 35(8), 1099–101.
- Niemelä, M., y Kormanen, M. (1965). Contractility of the seminiferous tubule of the postnatal rat testis and its response to oxytocin. *Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiæ Fenniae*, 43, 40–2.
- Nixon, G. F., Mignery, G. A., y Somlyo, A. V. (1994). Immunogold localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 15(6), 682–700.
- Palombi, F., Salanova, M., Tarone, G., Farini, D., y Stefanini, M. (1992). Distribution of beta 1 integrin subunit in rat seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction*, 47(6), 1173–82.
- Popescu, L. M., Gherghiceanu, M., Mandache, E., y Cretoiu, D. Caveolae in smooth muscles: nanocontacts. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(4), 960–90.
- Rasband, W. Image J. Bethesda, Maryland, USA: U. S. National Institutes of Health.
- Romano, F., Tripiciano, A., Muciaccia, B., De Cesaris, P., Ziparo, E., Palombi, F., y Filippini, A. (2005). The contractile phenotype of peritubular smooth muscle cells is locally controlled: possible implications in male fertility. *Contraception*, 72(4), 294–7.
- Roosen-Runge, E. (1951). Motions of the seminiferous tubules of rat and dog. *Anatomical Record*, 109, 413.
- Ross, M. H. (1967). The fine structure and development of the peritubular contractile cell component in the seminiferous tubules of the mouse. *The American Journal of Anatomy*, 121(3), 523–57.
- Sakaguchi, H., Kozuka, M., Hirose, S., Ito, T., y Hagiwara, H. (1992). Properties and localization of endothelin-1-specific receptors in rat testicles. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 263(1), R15–18.
- Sekido, R., Bar, I., Narváez, V., Penny, G., y Lovell-Badge, R. (2004). SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Developmental Biology*, 274(2), 271–9.
- Sharma, P., Ghavami, S., Stelmack, G. L., McNeill, K. D., Mutawe, M. M., Klonisch, T., y Halayko, A. J. (2010). beta-Dystroglycan binds caveolin-1 in smooth muscle: a functional role in caveolae distribution and Ca²⁺ release. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 18), 3061–70.
- Shmygol, A., y Wray, S. (2004). Functional architecture of the SR calcium store in uterine smooth muscle. *Cell Calcium*, 35(6), 501–8.

- Smith, U., Ryan, J. W., Michie, D. D., y Smith, D. S. (1971). Endothelial projections as revealed by scanning electron microscopy. *Science (New York, N.Y.)*, 173(4000), 925–7.
- Söderström, K. O. Scanning electron microscopy of mechanically isolated seminiferous tubules of the rat testis. *Andrologia*, 13(2), 155–61.
- Svingen, T., y Koopman, P. (2013). Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes & Development*, 27(22), 2409–26.
- Taggart, M. J. (2001). Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins? *News in Physiological Sciences* □: *An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 16, 61–5.
- Thyberg, J. (2000). Differences in caveolae dynamics in vascular smooth muscle cells of different phenotypes. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 80(6), 915–29.
- Tripiciano, A., Filippini, A., Ballarini, F., y Palombi, F. (1998). Contractile response of peritubular myoid cells to prostaglandin F2 alpha. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 138, 143–150.
- Tripiciano, A., Filippini, A., Giustiniani, Q., y Palombi, F. (1996). Direct visualization of rat peritubular myoid cell contraction in response to endothelin. *Biology of Reproduction*, 55(1), 25–31.
- Tripiciano, A., Palombi, F., Ziparo, E., y Filippini, A. (1997). Dual control of seminiferous tubule contractility mediated by ETA and ETB endothelin receptor subtypes. *FASEB Journal* □: *Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(4), 276–86.
- Tripiciano, A., Peluso, C., Morena, A. R., Palombi, F., Stefanini, M., Ziparo, E., y Filippini, A. (1999). Cyclic expression of endothelin-converting enzyme-1 mediates the functional regulation of seminiferous tubule contraction. *The Journal of Cell Biology*, 145(5), 1027–38.
- Tung, P. S., Dorrington, J. H., y Fritz, I. B. (1975). Structural changes induced by follicle-stimulating hormone or dibutyryl cyclic AMP on presumptive Sertoli cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), 1838–42.
- Tung, P. S., y Fritz, I. B. (1990). Characterization of rat testicular peritubular myoid cells in culture: alpha-smooth muscle isoactin is a specific differentiation marker. *Biology of Reproduction*, 42(2), 351–65.
- Virtanen, I., Kallajoki, M., Närvänen, O., Paranko, J., Thornell, L. E., Miettinen, M., y Lehto, V. P. (1986). Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filaments. *The Anatomical Record*, 215(1), 10–20.
- Vogl, A. W., Soucy, L. J., y Lew, G. J. (1985). Distribution of actin in isolated seminiferous epithelia and denuded tubule walls of the rat. *The Anatomical Record*, 213(1), 63–71.
- Wilhelm, D., Martinson, F., Bradford, S., Wilson, M. J., Combes, A. N., Beverdam, A., y Koopman, P. (2005). Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and

through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Developmental Biology*, 287(1), 111–24.

Yamaguchi, T., Murata, Y., Fujiyoshi, Y., y Doi, T. (2003). Regulated interaction of endothelin B receptor with caveolin-1. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 270(8), 1816–27.

Yazama, F., Esaki, M., y Sawada, H. (1997). Immunocytochemistry of extracellular matrix components in the rat seminiferous tubule: electron microscopic localization with improved methodology. *The Anatomical Record*, 248(1), 51–62.