



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estudios morfológicos e inmunohistoquímicos en testículos de verracos
azoospermicos

Morphological and immunohistochemical studies in testicles of azoospermic
boars

Autor/es

Pedro Alejandro Lorenz Calvo

Director/es

Bernardino Moreno Burgos
Raquel Ausejo Marcos

Facultad de Veterinaria

2024

ÍNDICE

I. RESUMEN/ABSTRACT	3
II. INTRODUCCIÓN	4
III. APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO	5
IIIa. ASPECTOS ANATÓMICOS.....	5
IIIa1. CÉLULAS DE SERTOLI	5
IIIa2. CÉLULAS DE LEYDIG	7
IIIa3. CÉLULAS GERMINALES.....	7
IIIa4. BARRERA HEMATOTESTICULAR.....	8
IIIa5. EPIDÍDIMO	8
IIIa6. CONDUCTO DEFERENTE	9
IIIa7. PENE	9
IIIa8. GLÁNDULAS ACCESORAS.....	9
IIIb. ASPECTOS FISIOLÓGICOS	10
IIIb1. ESPERMATOGENESIS.....	10
IV. INFERTILIDAD	11
IVa. TIPOS.....	11
IVb. ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS.....	12
IVc. CAUSAS.....	14
IVd. UTILIDAD DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL ESTUDIO DE LA INFERTILIDAD.....	17
V INFERTILIDAD EN VARIAS ESPECIES	20
Va. CERDOS	20
Vb. HOMBRE.....	23
Vc. PERROS.....	24
VI. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	25
VII. METODOLOGÍA	26
VIII. RESULTADOS	29
VIIIa. GRUPO CONTROL	29
VIIIb. GRUPO CON HIPOESPERMATOGÉNESIS	30
VIIIc. GRUPO AZOOSPERMICO	33
IX. DISCUSIÓN.....	33
X. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	35
XI. VALORACIÓN PERSONAL.....	37
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	37

I. RESUMEN/ABSTRACT

El sector Porcino se encuentra en una gran fase de desarrollo y se buscan nuevos métodos para poder optimizar la producción. Un correcto manejo de los machos reproductores puede ayudar a mejorar la productividad de manera considerable.

El aparato reproductor masculino del macho está compuesto por el pene, glande y prepucio, testículos, epidídimos, y glándulas bulbouretrales. La espermatogénesis se define como los cambios ocurridos en la morfología y función de las células germinales, que finaliza con la producción de espermatozoides. Dentro del testículo encontramos además 2 tipos celulares importantes: Las células de Leydig situadas en el intersticio de los túbulos seminíferos, y las células de Sertoli situadas en el interior de los túbulos. Ambas proporcionan soporte estructural y metabólico a las células germinales para que la espermatogénesis funcione de manera correcta.

La infertilidad en los machos de la especie porcina puede suceder de manera total o parcial. Cuando la presencia de espermatozoides en el eyaculado es nula, se denomina azoospermia, y puede ser de dos tipos: obstructiva y no obstructiva. El objetivo de este trabajo es determinar los cambios descritos en cortes histológicos de testículos azoospermicos con diferentes marcadores inmunohistoquímicos, para poder compararla con la literatura ya descrita y tratar de encontrar cuales son los mecanismos que causan este problema. Los hallazgos encontrados son el aumento del grosor de la membrana basal, la hiperplasia de las células de Leydig, la menor densidad del epitelio germinal, diferentes tipos de azoospermia, como patrón Sertoli y arrestos madurativos en diferentes grados así como presencia de células multinucleadas. Los marcadores utilizados revelaron diferentes patrones lesionales, pero sería necesario utilizar un abanico mayor para comprender las causas precisas de la azoospermia.

ABSTRACT

The Swine sector is in a significant phase of development, and new methods are being sought to optimize production. Proper management of breeding males can help improve productivity considerably.

The male reproductive system consists of the penis, glans, prepuce, testicles, epididymides, and bulbourethral glands. Spermatogenesis is defined as the changes occurring in the morphology and function of germ cells, culminating in the production of sperm. Within the testicle, we also find two important cell types: Leydig cells located in the interstitial space of the seminiferous tubules, and Sertoli cells located inside the tubules. Both provide structural and metabolic support to germ cells to ensure proper spermatogenesis.

Infertility in male pigs can occur partially or totally. When there is no presence of sperm in the ejaculate, it is called azoospermia, which can be of two types: obstructive and non-obstructive. The aim of this study is to determine the lesion changes described in histological sections of azoospermic testicles using different immunohistochemical markers, in order to compare them with existing literature and attempt to identify the mechanisms causing the problem. The findings include thickening of the basal membrane, hyperplasia of Leydig cells, lower density of the germinal epithelium, different types of azoospermia, such as Sertoli cell-only pattern and maturation arrest at various stages besides the the presence of multinucleated cells. The markers used in study revealed different lesion patterns, but a broader range of markers would be necessary to understand the precise causes of azoospermia.

II. INTRODUCCIÓN

La producción de carne de cerdo, a diferencia de otras especies, se mantiene en aumento en nuestro país, consolidándose como la segunda carne más consumida, con 8,61kg de consumo per cápita, después del pollo (MAPA, 2022). Esto se debe a la mejora del sistema de producción, entre las que destacan los avances en reproducción. Por parte de la hembra, se busca una mayor prolificidad, menor intervalo entre partos, y por parte del macho, mayor calidad seminal. Todo esto con el objetivo de tener el mayor número de lechones vivos y destetados sanos.

La reproducción en cerdos se realiza a través de la inseminación artificial, donde el semen utilizado proviene de granjas de centros de inseminación donde hay machos seleccionados genéticamente que cumplen la función de sementales. A estos machos se les denomina verracos. Antes de mandar el semen a las explotaciones de madres, se realizan controles de calidad, en los que se analizan diferentes parámetros tanto microscópicos como macroscópicos.

El uso de la inseminación artificial, ha producido grandes avances en fertilidad, labores genéticas y salud y bienestar de los animales. El cambio en la industria sobre usar métodos de monta natural a inseminación artificial, se remonta a 1960, donde Reino Unido es líder en este proceso de transición. Más tarde, se unirá el resto de países europeos. Los centros de inseminación en la especie porcina empiezan a ser mayoritarios en 1980, y para la década de los 90, la mayoría de carne de cerdo en Europa es obtenida a partir de la inseminación artificial (Knox RV, 2016). Esto conduce a que cada vez cobren más importancia las patologías reproductivas que puedan aparecer en los cerdos, y de todas ellas, la infertilidad es la más destacable.

III. APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO

IIIa. ASPECTOS ANATÓMICOS

El aparato reproductor masculino del macho está compuesto por el pene, glande y prepucio, testículos, epidídimos, y glándulas bulbouretrales.

Las gónadas en el aparato reproductor masculino son los testículos, los cuales poseen una función endocrina como formadores de hormonas, y función productora de espermatozoides y el líquido seminal. En lo que se refiere a su orientación, se encuentran en la región del anillo inguinal, en dirección oblicua vertical y con el epidídimo en disposición craneal (The pig site).

Están formados por las siguientes capas, nombradas de la más interna a la más externa: Albugínea, Túnica vaginal (visceral y parietal), fascia espermática interna, músculo cremaster, fascia espermática externa, túnica dartos y la piel. De estas dos capas, la dartos y el cremaster son musculares. Su función es alejar o contraer los testículos al abdomen, para poder así regular la temperatura a la que se produce la espermatogénesis, los cuales se deben mantener a 32-34°C, unos cuantos grados menos a la temperatura normal del cerdo, 37°C (Magapor).

Además, existen otras dos estructuras que participan en la termorregulación; el escroto, que al tener una densa pero fina capa de pelo crea una capa de aire protegiéndole del frío, y el plexo pampiniforme. En este lugar, las arterias crean trazados sinuosos, haciendo que la sangre pierda temperatura cuando llegue al testículo (Williams, 2013).

La túnica albugínea es la capa más interna que cubre cada testículo, y de ella parten hacia el interior del testículo septos, que dividen el testículo en estructuras llamadas pirámides o lobulillos testiculares. Cada lobulillo está formado por varios túbulos seminíferos muy enrollados, la unidad productora de espermatozoides, además de un estroma donde se encuentran las células de Leydig. Cada túbulo dentro del lobulillo forma asas, y a medida que se acercan al interior del testículo se disponen de forma recta formando los túbulos rectos (Wojciech *et al.*, 2019).

El epitelio seminífero se encuentra sostenido mediante una lámina basal, y una capa de células peritubulares que rodea el túbulo seminífero (Wojciech *et al.*, 2019).

Por tanto, encontramos 3 tipos de células:

IIIa1. CÉLULAS DE SERTOLI

También denominadas células de sostén, se encuentran de manera contigua y ocupando espacios entre las células espermátogénicas (Wojciech *et al.*, 2019). Se tiñen con hematoxilina-

eosina, pero esta disposición tan unida a las células germinales hace que sea difícil poder diferenciar ambas al corte (Lunstra *et al.*, 1986).

Su función es estimular la espermatogénesis, proporcionando protección y nutrición para el desarrollo de las células germinales, secretando fluidos, proteínas y factores de crecimiento. También participan en la fagocitosis de células y de exceso de citoplasma proveniente del espermatozoides producido (França *et al.*, 2005).

Las células de Sertoli desempeñan un papel clave en diferentes etapas del proceso de espermatogénesis al secretar muchos factores inmunomoduladores y de crecimiento. Entre todos ellos, se destaca el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de células madre (ligando de c-kit), el factor neurotrófico derivado de células de la glía (GDNF) e interleucinas (IL) 1 y 6 (Panahi *et al.*, 2019).

Además, también secretan una serie de hormonas, entre las que se encuentra la hormona anti-Mülleriana (AMH), la cual va a participar en la diferenciación sexual. La regulación del hipotálamo-hipófisis se encuentra regulada, entre muchos otros factores, por inhibina y actina, dos hormonas también producidas por estas células (Panahi *et al.*, 2019).

La proteína ligada a los andrógenos también es muy importante en el transporte de los mismos debido a sus características lipofílicas, ayudando por tanto al transporte de hormonas androgenas y permitiendo que actúen fuera del testículo (Gpe, 2016).

El número de células de Sertoli está relacionado con la capacidad de producción de espermatozoides (Franca *et al.*, 2005). Durante los primeros meses de vida, se produce el desarrollo y maduración de estas células debido a la acción de hormona FSH, y la maduración continua hasta el momento que se forma la barrera hemato-testicular, a los 4 meses de edad (Gpe, 2016).

De esta forma, el número de células formadas durante la etapa pre-puberal será determinante para el peso del testículo, ya que una vez alcanzada la pubertad, las células pasan de una fase de mitosis a una de no-mitosis por la acción de la hormona tiroidea T3. Por tanto, el número de células germinales que pueden aparecer es limitado por el espacio que queda disponible (Almeida *et al.*, 2006).

Existen uniones entre las células de Sertoli adyacentes, que generan dos compartimentos: uno basal y otro adluminal. En el compartimento basal se encuentran las espermatogonias y espermatozoides primarios. Los espermatozoides primarios generados por mitosis tienen que atravesar el complejo de uniones para desplazarse hasta la zona adluminal. Aquí se producirá la

diferenciación a espermátidas y la continuación de su evolución a espermatozoides. Por tanto, esta barrera preserva las células germinales haploides de la sangre y del sistema autoinmune, permitiendo a las células germinales en desarrollo entrar en el compartimento adluminal para su diferenciación mediante el desensamblaje y reensamblaje de los complejos de unión de la membrana (Lysiak *et al.*, 2012).

IIIa2. CÉLULAS DE LEYDIG

Se sitúan en el intersticio celular, rodeando a los túbulos seminíferos. Son células grandes y eosinofílicas, que contienen gotas lipídicas en su interior. Como característica de estas células, destaca su elaborado retículo endoplasmático liso, así como mitocondrias con crestas tubulovesiculares, lo que explica su eosinofilia. La función de estas células es la elaboración de testosterona a partir de colesterol, hormona clave en diferentes funciones a lo largo de la vida del animal (Wojciech *et al.*, 2019).

En el embrión, se encarga del correcto desarrollo de las gónadas, además del descenso de los testículos, que en la especie porcina al igual que en rumiantes es prenatal. En la pubertad es la responsable de la aparición de los caracteres sexuales secundarios, la secreción por parte de las glándulas accesorias y el inicio de la producción espermática. Durante la etapa como semental, la testosterona es indispensable para mantener la espermatogénesis (Gpe, 2016).

De esta manera, las células de Leydig participan activamente en el mantenimiento de las células de Sertoli, y de forma indirecta, en la espermatogénesis. La cantidad de retículo endoplasmático rugoso de estas células se usa como indicador de la producción de testosterona (Gpe, 2016).

Estas células sufren un largo proceso de evolución a lo largo de su vida. El cerdo es la única especie con un patrón bifásico de evolución de las mismas (França *et al.*, 2000). Se sitúan cerca de vasos sanguíneos, permitiendo acceder al torrente sanguíneo a los esteroides creados (Wojciech *et al.*, 2019).

IIIa3. CÉLULAS GERMINALES

Se encuentran en el interior de los túbulos seminíferos, alrededor de la luz. Derivan de las células germinales primordiales originadas en el saco vitelino que coloniza las crestas gonadales durante el desarrollo temprano de los testículos (Wojciech *et al.*, 2019), (López y Quiroga, 2015).

El número de células germinales aumenta continuamente en el testículo, alcanzando su máximo nivel de proliferación a los 4-5 meses de edad, y estabilizándose cuando el verraco cumple la edad de 7 meses. Esto genera que a su vez aumente gradualmente la longitud de los túbulos

seminíferos. Existe una correlación entre el diámetro de los túbulos seminíferos y el número de células germinales existentes (França *et al.*, 2000).

IIIa4. BARRERA HEMATOTESTICULAR

Se trata de una barrera que crea un compartimento fisiológico dentro del epitelio seminífero. Aísla las células germinales haploides del sistema inmunitario. Además, en la luz de los túbulos seminíferos, se concentran gran cantidad de productos de secreción por parte de las células de Sertoli, entre ellos la proteína fijadora de andrógenos, la cual tiene especial afinidad por la testosterona, y su función es mantener en este lugar altas concentraciones, para mantener el correcto desarrollo del espermatozoide. La característica fundamental que le confiere la capacidad de permitir la migración de las células germinales, se debe a que la barrera está compuesta por los tipos de uniones: Estrechas y adherentes. Estas proteínas integrales de membrana no llegan a interactuar entre sí, pero están vinculadas a través de adaptadores periféricos. Dicha característica lo diferencia de otras barreras como la hematonecefálica o hematorretiniana, y de esta forma, suceden cambios estructurales que permiten el paso de las células germinales mientras que la integridad de la membrana no se encuentra comprometida (Yan y Cheng, 2005).

IIIa5. EPIDÍDIMO

Se trata de un conducto de más con una longitud de 50 a 60 metros, condensado en 20 cm, situado en la parte dorsal de los testículos, cuya función es el transporte, maduración y almacenamiento espermático. Es un conducto único muy contorsionado, que une los conductos eferentes al conducto deferente. Presenta 3 partes: cabeza, cuerpo y cola (Gpe, 2016).

En la especie porcina, la cabeza, cuerpo y cola se pueden subdividir en cuatro, tres y dos segmentos respectivamente. En todas estas zonas, el conducto presenta un epitelio formado principalmente por células basales, además de otro tipo con diferentes funciones (França *et al.*, 2005).

- Células principales: secreción y absorción de proteínas
- Células claras: Endocitosis, eliminación de material del lumen
- Células Halo: Actividades secretoras responsables de la acidificación del medio
- Células basales: Producción de antioxidantes, defensa inmunitaria y fagocitosis

En el cuerpo del epidídimo los espermatozoides se vuelven móviles y adquieren capacidad fecundante. Los cambios ocurridos no solo son de tipo morfológico, sino también bioquímico y fisiológico, producido por las secreciones generadas (Williams, 2013).

IIIa6. CONDUCTO DEFERENTE

Se trata de un tubo muscular que impulsa a los espermatozoides de la cola del epidídimo a la uretra pélvica, donde se unen a las vías urinarias. Forma parte del cordón espermático (Williams, 2013)

IIIa7. PENE

El pene de los verracos es largo y rígido y su longitud varía de 300 a 500 mm de longitud. Se divide en 3 partes: raíz, cuerpo y glande. Es de tipo fibroelástico, y cuando está en reposo se describe la flexura sigmoidea, ya que dentro del abdomen se posiciona en forma de S (the pig site).

El saco prepucial del pene tiene la función de albergar una serie de fluidos viscosos que ayudan durante la reproducción, además de feromonas, y una alta cantidad de bacterias potencialmente patógenas. Vaciar el saco durante la monta natural puede provocar que gran cantidad de estas bacterias se introduzcan en el útero de la hembra (the pig site).

IIIa8. GLÁNDULAS ACCESORAS

Su función es la producción de la función no espermática del eyaculado, el plasma seminal. Varían en función de la especie, y en el cerdo nos encontramos con:

- Próstata: Situada sobre la vejiga, con la mayoría de su cuerpo incrustada en la capa muscular que rodea la uretra pélvica (Magapor, 2020). Su función es neutralizar las secreciones vaginales ácidas, por lo que estas secreciones contienen, entre otros componentes, calcio y fosfatasa alcalina, de forma que el pH resultante es alcalino. Además, aportan el olor característico a cerdo (William, 2013).
- Vesículas seminales: Se encuentran laterales a la parte terminal de cada conducto deferente. Se trata de un órgano par pero unido entre sí, con forma lobulada, grande y difusa, que son responsables de la mayoría de la fracción no espermática del eyaculado (Magapor 2020). En su secreción, se detectan altos niveles de ácido cítrico, fructosa, ergotionina y varios aminoácidos, que protegen a los espermatozoides de variaciones bruscas de pH (William, 2013).
- Glándula bulbouretral o de Cowper: Son órganos pares situados cerca del arco de la pelvis, en la porción más caudal de la uretra pélvica, a ambos lados de la uretra. Su forma es larga y cilíndrica, y su función es la secreción de la fracción gelatinosa del eyaculado, la tapioca (William 2013). El contenido es rico en mucina, la cual limpia la uretra, formando parte de la primera fracción del eyaculado. Además, posee otros componentes que favorecen la motilidad espermática (Magapor, 2020).

El volumen normal que un verraco puede eyacular oscila de los 100-500 cm³, con una concentración normal de 200-400x10⁶ espermatozoides/ml (Valverde, 2021).

IIIb. ASPECTOS FISIOLÓGICOS

IIIb1. ESPERMATOGENESIS

La espermatogénesis se define como un proceso regulado de diferenciación y cambios en la morfología, que finaliza con la producción en el epitelio seminífero de los túbulos testiculares de espermatozoides, los cuales se generan en 2 fases bien diferenciadas.

Por una parte, la espermatocitogénesis consigue transformar una espermatogonia (diploide) en una espermátida (haploide). Esto se consigue debido a una serie de divisiones meióticas para reducir los cromosomas, y mitoicas para que sufran multiplicación (López y Quiroga, 2015)

Se distinguen 2 tipos de espermatogonia: Las espermatogonia tipo A se dividen por mitosis y su función es repoblar las células del epitelio y generar células progenitoras, las cuales serán las que se sometan a espermatogénesis. Por otro lado, las espermatogonia tipo B serán las que darán lugar a los espermatozoides, y serán las que sufran las divisiones meióticas y mitoicas correspondientes (López y Quiroga, 2015).

A partir de una sola espermatogonia (2n) podemos obtener muchas células espermátidas(n). Las espermatogonias tipo B comenzaran con la primera división meiótica, generando dos espermatoцитos primarios, con número cromosómico 2n4c. En la siguiente fase, la meiosis 2, se generan 4 células haploides, denominadas espermátidas, con número cromosómico n. Se distinguen 2 tipos en base a su morfología: Espermátidas redondas y elongadas, aunque otros autores describen numerosos tipos de espermátidas en base a su morfología. Cada ciclo espermatogénico tiene una duración de 8,6-9 días, siendo la duración total de la espermatogénesis de 38-40 días (França *et al.*, 2005)

Como característica de la especie porcina, los cambios que suceden en la célula germinal durante la espermatogénesis se pueden agrupar en tres fases en relación a la meiosis: fase pre-meiótica (formación de dos espermatoцитos y una espermátida), fase meiótica, y fase post-meiótica (formación de dos espermátidas y un espermatoцитo). Además, También se distinguen 4 tipos de espermatogonia: Espermatogonia tipo A indiferenciada, espermatogonia tipo A diferenciada, espermatogonia intermedia, espermatogonia tipo B (Franca *et al.*, 2005)

Por otra parte tenemos las espermiogénesis, que sucede posteriormente a la espermatocitogénesis, y en la que a partir de las espermátidas se consigue espermatozoides. El proceso dura 15 días, y en él se suceden una serie de cambios morfológicos divididos en 5 fases

diferenciadas en el caso del humano. En el caso del cerdo, existe cierta división en cuanto a la clasificación de las fases que ocurren en esta etapa (López y Quiroga, 2015).

Se trata, por tanto, de una serie de cambios morfológicos de espermatidas a espermatozoides con flagelo. Se produce la formación del acrosoma, flagelo, y separación del cuerpo residual.

Existen diferencias entre especies en lo que concierne a la espermiogénesis. En el caso del cerdo, la característica más representativa de la morfología del espermatozoide es el tamaño del flagelo y su forma ovalada. Este proceso tiene una duración de 15 días, y por tanto, la formación del eyaculado dura entre 50 y 55 días (Franca *et al.*, 2005)

Finalmente, los espermatozoides que se acaban de formar, se transportan hacia el epidídimo gracias a la acción del tejido ciliado de los conductos eferentes y a la propia actividad peristáltica del conducto (Gpe, 2016).

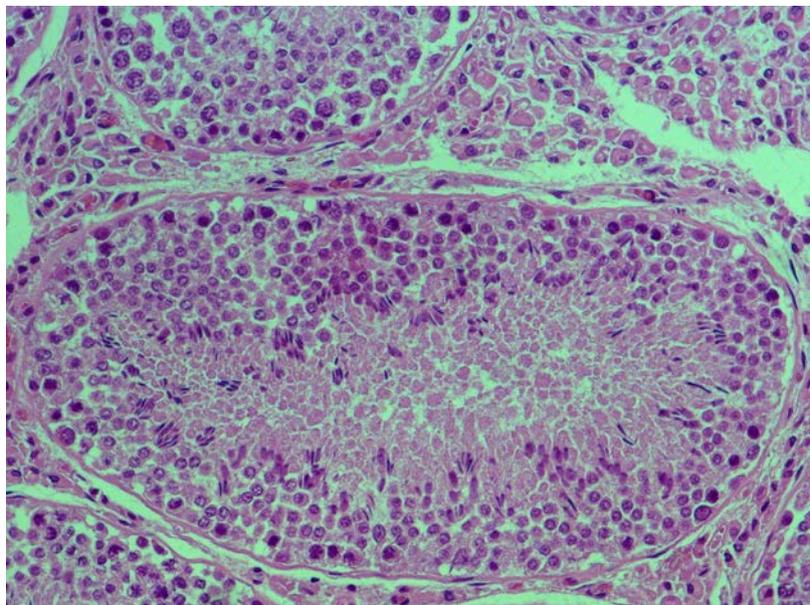


Figura 1: Corte histológico de un túbulo seminífero normal. H-E. x200. Fuente: Directores.

IV. INFERTILIDAD

IVa. TIPOS

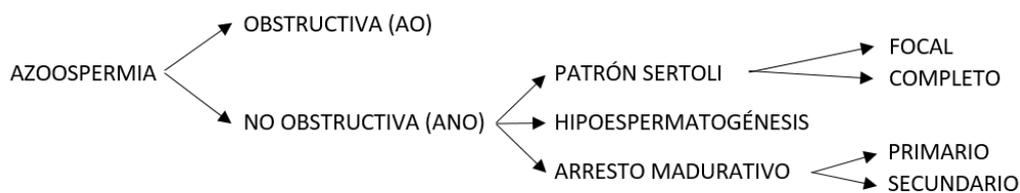
La infertilidad, definida como la dificultad para concebir, puede ser debida a problemas en el macho o en la hembra. En el macho, obedece a un déficit en la producción de espermatozoides, la cual puede ser parcial o total (Sharma *et al.*, 2020). En la especie humana, la infertilidad debida al hombre representa aproximadamente un 50% (Sharma *et al.*, 2020), sin embargo, en el cerdo no está bien definida.

Existen diferentes técnicas diagnósticas para el estudio de la infertilidad y el espermiograma es uno de ellos (Sharma *et al.*, 2020). El espermiograma revela las características del eyaculado y puede mostrar la presencia de formas anormales (teratospermia) o la cantidad de espermatozoides, con casos en los que haya disminución (oligospermia) o casos extremos, en los que la ausencia de espermatozoides sea total (azoospermia). En el cerdo con teratospermia, los animales son eliminados cuando las formas anormales superan el 30%. Los animales oligospermicos son aquellos en los cuales la concentración es menos de 150×10^6 mL.

La hipoespermatogénesis es aquella en la que se observan células germinales en todas las fases, pero en menor número (Witherspoon y Flannigan, 2019). En este tipo de infertilidad se incluyen diferentes tipos de arrestos en el epitelio germinal. Éste puede ocurrir a diferentes niveles del ciclo espermático, con bloqueos a nivel de espermatogonia, espermatocito primario, espermatidas o espermiogénesis (McLachlan *et al.*, 2006).

La azoospermia, por otra parte, se puede dividir en primaria, cuando el problema es a nivel testicular, o secundaria, cuando el origen es externo a los órganos reproductivos. La azoospermia primaria se divide en obstructiva (AO) y no obstructiva (ANO), dependiendo de las causas. La obstructiva es aquella relacionada con lesiones que impiden el flujo seminal a través de los conductos mientras que la no obstructiva puede relacionarse con diferentes lesiones testiculares (Figura 2).

Figura 2: Clasificación de la azoospermia.



IVb. ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS

El estudio histopatológico continúa siendo una de las técnicas más apropiadas para el estudio de la infertilidad, especialmente en casos de lesión testicular primaria (McLachlan *et al.*, 2006). Estos se han realizado especialmente en el hombre (McLachlan *et al.*, 2006) y en animales de experimentación de modelos de infertilidad, principalmente roedores (Fijak *et al.*, 2018; Riken *et al.*, 2024). No obstante, el carácter altamente invasivo de la biopsias en humana, hace que los modelos animales sean especialmente apreciados (Riken *et al.*, 2024).

En la azoospermia no obstructiva, encontramos dos grandes categorías histológicas: aplasia de las células germinales, en la cual no existen células germinales en los túbulos seminíferos, y sólo se encuentran células de Sertoli, denominándose síndrome de solo Sertoli o patrón Sertoli (PS); y por arresto madurativo (AM), donde existen células germinales pero no son capaces de convertirse en espermatoцитos primarios (Abdel-Hamid *et al.*, 2018).

Dentro del PS, encontramos una subclasificación, en la que se diferencia el PS focal, en la que existen áreas de espermatogénesis residuales en el testículo, y PS completo, que se debe a una falsa migración de los gonocitos a las gónadas durante el desarrollo embrionario, produciendo falta de desarrollo de la capa germinal (Ghanami Gashti *et al.*, 2021).

De la misma forma, dentro de AM se puede clasificar en función de cuando se produce el arresto madurativo. En la detención temprana, solo se observarán espermatogonias o espermatoцитos, y en la detención tardía, al ocurrir después de la meiosis, se pueden detectar espermátidas. En la actualidad, se están llevando a cabo estudios para poder clasificar cuantos tipos de detención meiótica existen. Se trata de estudios de gran complejidad, al estar involucrados múltiples genes que controlan la espermatogénesis. Es necesario no solo para establecer un enfoque diagnóstico, sino también para poder comparar entre investigaciones científicas. Witherspoon y Flannigan (2019) proponen una subclasificación en la que se distingue una parada en la pre-metafase y post-metafase, pero dado el pequeño número de sujetos analizados en el estudio, no se puede generalizar esta distribución (Witherspoon y Flannigan, 2019).

En pacientes humanos con ANO, el diámetro de los túbulos seminíferos suele ser menor respecto al de un testículo sano. Sin embargo, en algunos pacientes, estos se encuentran dilatados respecto al resto de túbulos atróficos que los rodean. Además, estas áreas logran mantener una espermatogénesis activa. Estudios con inmunofluorescencia demuestran que el microambiente de ambos tipos de túbulos es distinto, existiendo una mayor proporción de células germinales inmaduras en los túbulos no dilatados. Por tanto, los marcadores celulares para los distintos tipos de ANO muestran una expresión diferente.

Sin embargo, en pacientes con arresto madurativo, los túbulos seminíferos dilatados muestran una cantidad de células germinales parecidas a los de un testículo sano. Se aprecia también un mayor grosor de la pared tubular en pacientes con PS, que afecta negativamente a la contractibilidad del túbulo en su propulsión del contenido hacia la rete testis. La producción de hormona antimülleriana AMH aparece en pacientes con PS y en testículos normales, aunque la expresión es mayor en los testículos normales (Jensen *et al.*, 2022).

IVc. CAUSAS

Las causas de la infertilidad son variadas y, a veces, desconocidas, con un cierto porcentaje de casos considerados como idiopáticos. Las causas en el hombre se han dividido en tres grandes categorías (Sharma *et al.*, 2021), con aquellas en las que se produce un hipogonadismo primario por déficit hormonal debido a un fallo en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, un hipogonadismo secundario por daño testicular o las debidas a una obstrucción en el flujo seminal, también denominadas azoospermias obstructivas.

Las causas de cada tipo también pueden obedecer a diferentes orígenes. Así, la azoospermia no obstructiva puede ser el resultado de defectos en la espermatogénesis, desordenes del cromosoma Y, defectos genéticos, infecciones, tumores y quimioterapia. Una causa importante de ANO en ciertas especies como el perro es la exposición a factores tóxicos ambientales, como podría ser el caso de los microplásticos, enfermedades sistémicas como diabetes, deficiencias nutricionales e inflamaciones e infecciones testiculares, como la orquitis autoinmune (England *et al.*, 2010). En el cerdo, sin embargo, no está definida.

La azoospermia obstructiva es debida a una obstrucción mecánica del tracto reproductivo, como en casos de granulomas espermáticos, los cuales son más importantes en los animales. Estos suceden cuando, debido a la rotura de los túbulos seminíferos, los espermatozoides formados salen de los mismos y entran en contacto con el sistema inmune del animal, desencadenando una reacción inflamatoria (Kawakami *et al.*, 2003). Finalmente, el término referido como azoospermia pre-testicular engloba todos los desequilibrios endocrinos a nivel extra-gonadal, como es el caso del hipotálamo o la glándula pituitaria (Wu *et al.*, 2022).

El arresto madurativo puede deberse a causas primarias, como componentes genéticos, secundarias (factores endocrinos, nutrición, infecciones, torsiones testiculares, criptorquidia o varicocele) o idiopáticas. Sucede que las células germinales son incapaces de desarrollarse de forma completa. Puede ocurrir que se detenga el desarrollo en fases tempranas, donde solo se detectarán espermatogonias o espermatoцитos, o que se detenga el desarrollo completo de estas células en fases más tardías, observándose espermátidas sin espermatozoides. Por su parte, las causas de testículos con PS pueden tener distintas etiologías, como la criptorquidia, tratamientos estrogénicos, quimioterapia o hipogonadismo (Abdel-Hamid *et al.*, 2018). Los problemas que generan el PS puede deberse a un fallo en la migración de las células primordiales del saco vitelino a las crestas gonadales (Wu *et al.*, 2022).

La membrana basal tubular y las células y componentes mesenquimales del tejido peritubular son considerados importantes en los problemas de fertilidad. Las células de la membrana basal

son similares a las células musculares lisas, con capacidad de contracción y relajación. Además, son esenciales para mantener la estructura y regulación del microambiente del tejido testicular. También desempeñan un papel en la producción y secreción de ciertos factores y proteínas que son importantes para el desarrollo y la función de las células germinales, incluidas las células madre espermatogénicas. Se distinguen 2 capas: una de células musculares lisas que proporcionan el soporte estructural, y otra de células epiteliales que proporciona soporte metabólico a las células basales y a las de Sertoli. Además, tienen una posición anatómica única, ya que comunican tanto con el espacio intersticial como el espacio peritubular (Mayerhofer *et al.*, 2018).

La pared del túbulo seminífero en el hombre tiene varias capas, sin embargo, en el cerdo y ratón, especie en la cual se han realizado la mayoría de los estudios, el número de capas es menor. A menudo, las células peritubulares se denominan células mioideas, por su labor de contracción para impulsar los espermatozoides a través de los túbulos, pero, como anteriormente se ha descrito, también tienen una importante función secretora. Son capaces de secretar diversos componentes de la matriz extracelular (MEC), que se depositan en la pared de los túbulos seminíferos. En humanos, destacamos la decorina y el biglicano que, aparte de tener funciones estructurales, interfieren con la señalización de factores de crecimiento y roles en la inflamación. En testículos con la espermatogénesis alterada, se encuentra aumentada la pared tubular debido a un engrosamiento fibrótico, además de encontrar depósitos de biglicano. Este proteoglicano puede ser la causa de activación de macrófagos y mastocitos, fomentando una respuesta inflamatoria, aunque aún está por descubrir (Mayerhofer *et al.*, 2018).

Además, en la especie humana, las células peritubulares también producen una serie de componentes implicados en la renovación de las células germinales. Es el caso del factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF). Esto evidencia que no solo las células de Sertoli se encargan de controlar el mecanismo de las células germinales, sino también las peritubulares, y una disminución en la continuidad o grosor de la barrera afecta a la espermatogénesis (Mayerhofer *et al.*, 2018).

Los factores secretados por las células de Sertoli tienen efecto directo sobre las células precursoras musculares, sosteniendo la proliferación de los mioblastos C2C12 e inhibiendo el estrés oxidativo y la apoptosis en la fase temprana del proceso de diferenciación. Además, estimulan la fusión de los mioblastos en miotúbulos y la expresión de marcadores de diferenciación miogénica en la fase tardía, sin afectar al potencial miogénico. Este estudio sugiere que, gracias al potencial reparador y su relación con las células musculares, el uso del

cóctel de factores producido por estas células podría ser usado en terapias de regeneración muscular (Chiappalupi *et al.*, 2022).

El receptor de andrógenos (AR) se expresa en las células peritubulares (CPTs), además de en las células de Leydig, por lo que también existe una regulación paracrina por parte de las hormonas generadas en las Leydig. Estudios en ratones han demostrado que las células de Leydig regulan las células peritubulares del ratón y estas, a su vez, la renovación de las células madre germinales. Este fenómeno se basa en la estimulación con dihidrotestosterona de los AR en las CPTs. Se observó que al estimular dichos receptores, aumenta los niveles de los mismos en las células peritubulares, además de proteínas típicas del músculo liso, pero en cambio, no se describe un aumento en el GDNF. Otros estudios se basan en la eliminación genética de GDNF en las CPT, lo que consecuentemente produce infertilidad (Mayerhofer, 2019).

La orquitis también es una causa de infertilidad. En el cerdo se ha observado un aumento de macrófagos y mastocitos alrededor de los túbulos seminíferos. Marcadores como el c-kit revelan su agregación en el intersticio de testículos azoospermicos. Estudios revelan los mecanismos que ocurren en los mastocitos para que la espermatogénesis se vea afectada. Sin embargo, se desconoce las causas exactas del aumento de su número y su activación (Himmelreich-Perić *et al.*, 2022).

Los mastocitos en el cerdo doméstico tienen una distribución similar a la del testículo humano. Se encuentran en el área adyacente a los túbulos seminíferos y más alejados, en el tejido intersticial, entre las células de Leydig, aunque en menor cantidad. En cuanto a su desarrollo, los mastocitos aparecen en el área adyacente a los túbulos seminíferos al nacer y gradualmente colonizan el tejido intersticial (área interlobular, rete testis, áreas peritubulares) a partir de los 1,5 meses de edad, incluso antes de alcanzar la madurez sexual a los 4,5 meses (Himmelreich-Perić *et al.*, 2022).

Marcadores como la tripsina son capaces de detectar los mastocitos. La localización inmunohistoquímica de los mastocitos mediante anticuerpos anti-triptasa ha demostrado ser altamente específica para la cuantificación de los mastocitos (Ganesh *et al.*, 2018). El c-kit también es un buen marcador de mastocitos.

En pacientes infértiles, la localización y el número de mastocitos es distinta. Se encuentran entremezclados con la pared de los túbulos y su número aumenta. Estudios de microscopía electrónica han revelado que llegan incluso a estar en contacto con la lámina basal. Los mastocitos producen múltiples moléculas como la triptasa, la quimasa o la enzima sintetizadora de histamina, histidina descarboxilasa. La proximidad de los mastocitos a las células vecinas

sugiere que pueden verse afectadas a través de los productos secretados. Un aumento de histamina genera el aumento de concentración de los niveles de calcio intracelulares, desestabilizando el equilibrio intracelular afectando de esta forma a las CPTs (Mayerhofer *et al.*, 2018).

La quimasa es una proteasa encargada de transformar la angiotensina I en angiotensina II. Dado que la expresión de AT1R se mostró mediante inmunohistoquímica en las células de la pared tubular en biopsias de testículos humanos con azoospermia obstructiva, se exploró la posibilidad de un vínculo con la inflamación. Aplicada a CPTs-Humanas cultivadas, la Ang II aumentó los niveles de IL-6 y la subsecuente secreción en el medio de cultivo a través de AT1R. Se considera, por tanto, que la quimasa producida por los mastocitos está vinculada a reacciones inflamatorias de las células peritubulares (Mayerhofer *et al.*, 2018).

Otra de las formas en las que los mastocitos afectan a las células peritubulares es a través del ATP. Estas células en pacientes infértiles expresan receptores prurigénicos, cuyo ligando es el ATP extracelular. Este puede venir de varias fuentes, incluidas las células de Sertoli, pero también de los mastocitos. Este estudio demuestra que, *in vitro*, un aumento del ATP conlleva una mayor expresión de moléculas proinflamatorias, las cuales pueden condicionar la espermatogénesis (Mayerhofer *et al.*, 2018).

IVd. UTILIDAD DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL ESTUDIO DE LA INFERTILIDAD

Las células germinales inmaduras distribuidas en los túbulos seminíferos, dependiendo del estado en el que se encuentren, pueden ser un valor pronóstico respecto a cómo se lleva a cabo la espermatogénesis. La diferenciación a través del uso de métodos inmunohistoquímicos de los distintos estados en los que se encuentran las CG (células germinales), permite obtener una prueba diagnóstica para el manejo de la azoospermia no obstructiva (Eghbali *et al.*, 2014).

El número de marcadores que se pueden utilizar es elevado, sin embargo, en este TFG se estudiaron 4 marcadores para detectar posibles cambios en la composición o actividad celular en los testículos. Por ello, la revisión se ha centrado más en estos marcadores. Los marcadores son vimentina, actina de músculo liso (α -sma), c-kit, ki-67.

La vimentina es un tipo de filamento intermedio, que forma parte del citoesqueleto de las células, y tiene numerosas funciones relacionadas con la morfología y motilidad de las células. A través de estudios inmunohistoquímicos e inmunocitoquímicos se ha demostrado que existe una menor cantidad en las células germinales indiferenciadas, llegando a haber una cantidad nula en las células basales, aunque conforme se van diferenciando, la cantidad aumenta. A

través de otro marcador, el SOX9, que permite distinguir entre las células de Sertoli y las basales, se aprecia su expresión negativa en las células de Sertoli, apareciendo marcadas las basales. Por tanto, la cantidad de vimentina es mayor conforme más diferenciadas se encuentran las células germinales, es decir, su aumento está asociado a la diferenciación celular (Niazi Tabar *et al.*, 2022).

Estudios en humanos y ratones demuestran que el citoesqueleto de las células de Sertoli participan activamente en la espermatogénesis, y son un blanco perfecto para agentes tóxicos que disminuyen la reproducción masculina. Los microtúbulos (MTs) y filamentos de actina son estructuras polarizadas, donde el extremo con polaridad + se sitúa cerca de la membrana basal, y el – cerca del lumen. Ambos se extienden, especialmente los MTs en mayor medida que los F-actina, a lo largo de todo el epitelio, alineados con la membrana basal. Las “pistas” creadas por estas estructuras sirven para el transporte de desechos celulares, mitocondrias, fagosomas, o vacuolas, además de transportar espermátidas, siendo apoyadas por las proteínas motoras asociadas a microtúbulos, que funcionan como “vehículos de transporte” (Wu *et al.*, 2022).

En muestras de testículos azoospermicos se observan fallos en la organización a lo largo del epitelio seminífero, los MTs aparecen truncados y no logran extenderse a lo largo de todo el epitelio y en su lugar, colapsan y no mantienen el diámetro del túbulo seminífero. También aparecen fallos en la expresión de las proteínas motoras como dineina 1 y KIF 15, y las proteínas estabilizadoras que se encargan de anclar los microtúbulos en los extremos como EB1. En concreto, se destaca el papel de dineina 1 como causante de defectos en el transporte de espermátidas a través del epitelio seminífero, generando espermátidas atrapadas dentro de la célula y múltiples espermatozoides defectuosos en el epidídimo. Aun así, no se proporcionan pruebas concluyentes sobre la relación entre un citoesqueleto defectuoso e infertilidad, pero se considera un gran condicionante (Wu *et al.*, 2022).

Las células de Leydig producen testosterona, hormona fundamental para el desarrollo del sistema reproductivo masculino, así como de los caracteres sexuales secundarios, pero también afecta al desarrollo de las células germinales y su maduración. El c-kit, un receptor de la tirosina-kinasa Kit, es expresado por estas células, además de otros marcadores como la anoactina 1 (ANO 1), el cual se encuentra en los canales de cloro dependientes del calcio de estas células. La LH produce un incremento en la concentración de calcio intracelular, generando la secreción por parte de las células al exterior de testosterona. De esta forma, existe una relación entre la despolarización de los canales de Cl⁻ dependientes de calcio y la liberación de testosterona, en los que la ANO 1 estaría implicada. Además, existen otros canales que participan en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo, como los TASK-1, canales de K⁺,

encontrados en mayor medida en las células de Leydig, pero también en las Sertoli. Sin embargo, estos no están relacionados con la secreción de testosterona, sino con la viabilidad y supervivencia de la célula (Woo *et al.*, 2023).

El parénquima está formado por muchos túbulos seminíferos, separados por tejido intersticial, donde se encuentran las células de Leydig, unos pocos fibroblastos, y vasos sanguíneos y linfáticos. Este tejido intersticial es mayor en los lobulillos afectados, y parece haber una mayor proliferación de las células de Leydig. El aumento en el número de células de Leydig en testículos azoospermicos se debe a una combinación de mecanismos hormonales compensatorios, inflamación, alteraciones en la BHT y respuestas celulares a la apoptosis y el estrés oxidativo. Estos cambios reflejan un intento del tejido testicular de mantener la homeostasis y la producción hormonal en condiciones de daño o disfunción. Sin embargo, no siempre se describe aumento celular (Hauptman *et al.*, 2021).

La medición de testosterona como marcador para evaluar la proliferación de las células de Leydig puede servir para evaluar el daño de las mismas. Pacientes humanos con espermatogénesis alterada tiene niveles más bajos de testosterona y/o niveles elevados de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), o a veces están en el límite inferior del rango normal. En la azoospermia idiopática, niveles significativamente elevados de LH con una testosterona en el límite inferior normal, desvela un fallo funcional de las células de Leydig (Hauptman *et al.*, 2021).

Encontramos otro marcador, en este caso el estradiol E2. Los niveles elevados de E2 pueden causar una bloqueo autocrino de la enzima 17 alfa-hidroxilasa, implicada en la producción de testosterona y situada en el citoplasma de las células de Leydig. La hiperestimulación de las células de Sertoli con FSH conlleva un aumento de la producción de estrógenos por parte de las mismas y, consecuentemente, a la disfunción de las células de Leydig (Hauptman *et al.*, 2021).

Este estudio demuestra que en la biopsia testicular de pacientes con ANO, encontramos desde grupos regulares de células de Leydig, grupos significativamente hipertrofiados de células de Leydig incluso una disminución de estas células debido a la fibrosis intersticial. Esta fibrosis se caracteriza por presencia de un gran número de fibroblastos, fibrocitos y sustancia fundamental de tejido conectivo, además de un menor número de células de Leydig, las cuales tenían un menor citoplasma. También se han descrito infiltrados mononucleares de disposición peritubular, que podían llegar a invadir la lámina propia, aunque también pueden encontrarse alrededor de los vasos (Hauptman *et al.*, 2021).

El Ki-67 es un marcador que muestra el estado proliferativo de las células. Ni en pacientes con azoospermia obstructiva ni con ANO, se encontró este marcador en las células de Leydig, a pesar de encontrarse la presencia ocasional de grandes grupos de las mismas en el intersticio. Lo que sí se observó gracias a un análisis morfométrico, es que la densidad del volumen de las células es mayor en pacientes con ANO. En los casos de túbulos con patrón Sertoli, los casos más graves, se describe un mayor número de grupo de células de Leydig hipertrofiadas, pero sin embargo, la densidad numérica de estas no aumentó significativamente. En el conjunto de todo el órgano, sí que existe una diferencia significativa respecto al número de células (menor en pacientes con ANO), pero el volumen total no es menor en comparación con AO (Hauptman *et al.*, 2021).

En el testículo humano, encontramos 3 tipos de células de Leydig: progenitoras, inmaduras y maduras. En un testículo normal conviven estas 3 poblaciones, con predominancia de las maduras. Sin embargo, existen alteraciones genéticas, como el síndrome de Klinefelter, caracterizado por grandes acumulaciones de células de Leydig y un crecimiento de los tipos de células progenitoras e inmaduras. De esta forma, se corrobora que diferentes factores pueden influir en el equilibrio de estas poblaciones. De hecho, en el estudio, al encontrar grandes grupos de células de este tipo, se puede especular sobre un mayor número de células progenitoras e inmaduras en estos acúmulos (Hauptman *et al.*, 2021). No se encuentran estudios tan detallados en la especie porcina, pero se pueden extrapolar estos resultados a nuestro estudio, en busca de una explicación para nuestros hallazgos.

V INFERTILIDAD EN VARIAS ESPECIES

Va. CERDOS

El cerdo es una especie muy sensible al manejo, y un gran porcentaje de los problemas reproductivos que pueden tener los verracos son secundarios a un mal manejo de los sementales. Una frecuencia de eyaculados muy alta puede generar un descenso en el número de espermatozoides, y aparecer subfertilidad. Esto se puede evitar llevando un control del número de montas por semana, adecuado a la edad del animal. Otra de las causas que puede producir un alto estrés a los animales, y por tanto influir de manera negativa en la espermatogénesis, es el estrés por calor (Althouse *et al.*, 2019).

A continuación, nos centraremos en problemas adquiridos que pueden causar infertilidad en cerdos, y los cuales podrían ser la causa de la infertilidad en nuestras muestras observadas.

Los machos sometidos a altas temperaturas durante largos periodos de tiempo, tienden a reducir su ingesta calórica y el peso. Entre los cambios hormonales, se produce la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, generando un aumento de la hormona liberadora de

corticotropina (CRH), que actúa estimulando la parte anterior de la hipófisis para liberar ACTH u hormona adrenocorticotrópica. Esta última, finalmente, estimula la liberación de glucocorticoides por parte de la corteza adrenal a la sangre, entre ellos el cortisol. Toda esta cadena de procesos desencadena que los niveles normales de hormonas LH y FSH varíen, reduciendo la producción de testosterona e influyendo de manera negativa en la producción espermática (Romo-Valdez *et al*, 2022).

La alimentación en el cerdo es un factor que puede influir de manera muy significativa en la vida reproductiva. Además de establecer una ganancia calórica acorde a las necesidades del animal, se debe prestar atención a las posibles micotoxinas que pueden aparecer en el pienso. Se trata de esporas de contaminación por hongos en el pienso. Factores como una alta humedad y temperaturas altas en el lugar de almacenamiento de los piensos contribuyen a su aparición. Existen diferentes toxinas dependiendo del hongo que las produce, además de que una misma toxina puede estar producida por distintos tipos de hongos (Althouse *et al.*, 2019).

De todas las micotoxinas existentes, destacamos la zearalenona por su interacción con las células de Sertoli. Se encuentra presente en el maíz, trigo y sorgo. Se considera un análogo estrogénico que, a nivel reproductivo, genera una disminución en la producción de esperma y una disminución en la concentración de testosterona sérica y de los niveles de progesterona. La importancia de esta micotoxina radica en que puede afectar a las células de Sertoli, encargadas de formar la barrera hemato-testicular y la producción normal de esperma. Es altamente tóxica, produciendo estrés oxidativo, autofagia, y apoptosis celular de las mismas. Estudios sugieren que este aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), es el causante del arresto celular y apoptosis (Ma *et al.*, 2023).

Un aumento del estrés oxidativo por parte de los ROS afecta mayoritariamente a las mitocondrias y retículo endoplasmático de las células de Sertoli. Las mitocondrias son orgánulos que se encargan de proporcionar energía a las células, mientras que el retículo es responsable de la síntesis y modificación de proteínas. Se trata de dos orgánulos estrechamente relacionados a través de la membrana asociada a las mitocondrias del retículo (MAM). Estudios de toxicidad con zearalenona demuestran que esta afecta a la MAM, aumentando la distancia existente entre las mitocondrias y el retículo, además de dañar su estructura. El retículo se encarga del control del calcio dentro de la célula, observándose también un aumento de los niveles intracelulares de calcio. Todos estos cambios son los que, consecuentemente, afectan a la integridad de las células de Sertoli, y de manera directa se ve afectada la espermatogénesis. Se están buscando nuevas estrategias para mitigar el efecto tóxico de las zearalenona, y las nuevas estrategias se

basan en comprender la relación entre dichos orgánulos para desarrollar técnicas eficaces contra esta y otras micotoxinas (Ma *et al.*, 2023).

Los virus pueden ser otro de los muchos factores que pueden influenciar en la capacidad reproductiva de los verracos. De todos ellos, destacamos el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) por su alta prevalencia actual en nuestro país, tanto en explotaciones de cebo como de madres, además de la existencia de literatura sobre esta enfermedad. Se caracteriza por disfunción respiratoria, aborto tardío y una alta incidencia de lechones nacidos muertos, momificados y debilitados (Sur *et al.*, 1997). Pertenece a la familia de los arterivirus, y al igual que el resto de virus de este grupo, se puede transmitir por vía venérea a través del semen. La replicación testicular del PRRSV en los testículos sucede en células germinales epiteliales de los túbulos seminíferos, principalmente espermatidas y espermatoцитos, y en los macrófagos del intersticio. Respecto a las células germinales, se produce la muerte de las mismas por apoptosis, impidiendo su diferenciación y generando hipoespermatogénesis. Sin embargo, el virus no afecta a espermatozoides maduros (Sur *et al.*, 1997).

Han *et al.*, 2001, demuestran en su estudio que las células germinales son las principales contribuyentes del PRRS asociado a células en el eyaculado. La diseminación del virus se produce por vía hematogénea, llegando a través de monocitos infectados al intersticio testicular. De esta manera, el PRRS se localiza predominantemente en espermatogonias y su descendencia.

Este virus tiene tropismo por los macrófagos alveolares porcinos, ingresando en los mismos por endocitosis mediada por receptor. Se plantea la posibilidad de que la presencia de estos mismos receptores se encuentre también en las células germinales, siendo esta la forma de infectarse (Han *et al.*, 2013).

El varicocele es una patología que afecta de forma bilateral a los testículos y que se ha relacionado con infertilidad (Gat *et al.*, 2010). La explicación fisiológica de esta patología radica en que el aumento de presión hidrostática de las venas espermáticas internas, genera un gradiente de presión invertido entre los sistemas venular y arteriolar de la microcirculación. El fallo de las válvulas de no retorno del sistema venular de drenaje produce que la sangre se acumule en el escroto, impidiendo su circulación de forma eficaz. Esta deficiencia en el transporte sanguíneo de oxígeno da lugar a cambios en la pro succión de esperma y testosterona debido a la hipoxia generada (Gat *et al.*, 2010).

Los tumores testiculares se han asociado con infertilidad en el hombre, sin embargo, en el verraco los tumores testiculares son infrecuentes, debido principalmente a la edad de sacrificio. Su asociación con problemas de infertilidad, por ello, es incierta. En un estudio reciente (Ausejo

et al., 2024), de 333 cerdos con problemas de fertilidad estudiados, en 19 se encontraron tumores, correspondiéndose la mayoría con seminomas. En la mayoría de los tumores con gran extensión se observó degeneración tubular y alteración de la espermatogénesis.

Vb. HOMBRE

El porcentaje de parejas con problemas de infertilidad afecta al del 8-12% de la población mundial, considerándose uno de los grandes problemas a nivel de la salud de la población mundial (Bhattacharya *et al.*, 2024). La calidad del semen humano ha ido empeorando a lo largo de los últimos 20 años de manera alarmante. Esta infertilidad puede deberse a causas adquiridas, como por ejemplo, la criptorquidia, anorquia, mutaciones genéticas como la fibrosis quística y anomalías cromosómicas como es el caso del síndrome de Klinefelter; pero además existen numerosos factores ambientales que afectan negativamente a la producción de esperma, como tóxicos contaminantes, estrés oxidativo, obesidad, el hábito de fumar, alcoholismo o estrés psicológico (Bhattacharya *et al.*, 2024).

Sin embargo, existe un 40-50% de casos que son idiopáticos, en los cuales no se encuentra una causa concreta. Se cree que en estos casos, la clave se encuentra en la producción y secreción de hormonas por parte de las células formadoras de los túbulos seminíferos, en concreto, las células de Sertoli (Bhattacharya *et al.*, 2024).

La clamidia es la infección de transmisión sexual con mayor prevalencia a nivel mundial, con alrededor de 106 millones de nuevas infecciones anuales, afectando tanto a hombres como a mujeres, con una prevalencia equivalente (Sobinoff *et al.*, 2015). Esta bacteria se ha relacionado con problemas de fertilidad, estando bien definidos en la mujer. Sin embargo, en el hombre, los efectos no están tan bien documentados.

Puede causar ureteritis, epididimitis y orquitis, pero problemas como prostatitis o los efectos sobre la infertilidad masculina siguen siendo desconocidos (Sobinoff *et al.*, 2015). Se ha descrito reducción de la motilidad espermática, aumento de las anomalías espermáticas, disminución de la viabilidad de los espermatozoides o reducción de la densidad del semen, pero la asociación entre la espermatogénesis deteriorada y la infección es objeto todavía de investigación (Sobinoff *et al.*, 2015).

Hay estudios que describen la fragmentación del ADN espermático (Sobinoff *et al.*, 2015). Otros sugieren que la infección por *C. trachomatis* produce daños inflamatorios en el epitelio del tubo seminífero y, como resultado, aparecería una espermatogénesis alterada.

Filardo *et al.* (2019) investigaron la posible implicación de la infección por *C. trachomatis* en las células de Sertoli y observaron que, tras la infección, el citoesqueleto de estas células se veía

afectado, provocando una pérdida de la funcionalidad de la BHT. Dicho estudio sí que demostró una reestructuración de los filamentos intermedios de vimentina y los microtúbulos de α -tubulina, pudiendo afectar negativamente a la espermatogénesis.

Otros autores describen cómo llega *C. trachomatis* al testículo a través de estudios en ratones vasectomizados. Al igual que el PRRS, la clamidia es capaz de infectar macrófagos y viajar al testículo por vía hematógica, infectando a células de Sertoli, Leydig y germinales, y dañando los túbulos seminíferos en un plazo de 4-8 semanas post infección. También se describe el daño en el ADN del espermatozoide, así como una reducción de las uniones gap, lo que contribuye al aumento de anticuerpos antispermatozoide (Bryan et al., 2020).

El cáncer testicular en hombres representa solo entre el 1 y 1,5% de todos los cánceres. Se clasifican en tumores que afectan a las células germinales, los más comunes con un 95% de prevalencia, y los que afectan al cordón sexual, es decir, los que no afectan a las células germinales. Los tumores de células germinales son la causa más común de cáncer entre jóvenes de 15-35 años (Instituto nacional del cáncer EEUU).

Dentro de los tumores de células germinales, encontramos los seminomas (seminoma clásico y seminoma espermatocítico) y no seminomas (carcinosoma embrionario, carcinoma de saco citelino, coriocarcinoma y teratoma). Los tumores que no afectan a las células germinales, los denominados tumores estromales, se clasifican en tumores de las células de Leydig y tumores de las células de Sertoli. Por último, encontramos un grupo de cánceres testiculares secundarios, los cuales se originan en un lugar distinto a los testículos: el linfoma y la leucemia (Instituto nacional del cáncer EE.UU).

Vc. PERROS

Al igual que en personas, en perros, la azoospermia constituye una causa importante de infertilidad, con una prevalencia del 35% en perros con problemas reproductivos. En perros, se ha descrito la orquitis autoinmune espontánea (OAE), la cual se define como azoospermia no obstructiva en la que no se encuentran síntomas clínicos, pero sí hay daño histopatológico del tejido testicular e infiltración de células inmunitarias (Pröbstl *et al.*, 2022). Esta enfermedad aparece también en humanos y cerdos, aunque no está bien definida.

Estudios en perros revelan que, de forma natural, existen células inmunitarias en tejidos testiculares caninos sanos, en su mayoría linfocitos T y macrófagos, pero solo unas pocas células. Al igual que en otras especies como ratas, ratones y testículos humanos, solo linfocitos T y macrófagos estaban presentes en el testículo canino sano, restringidos únicamente al compartimento intersticial y los vasos sanguíneos (Pröbstl *et al.*, 2022).

Sin embargo, en pacientes afectados con orquitis autoinmune, numerosas células inmunitarias invaden los tejidos testiculares caninos afectados, y a diferencia de los pacientes sanos, la presencia de células inmunitarias llega hasta el compartimento tubular, lo que indica una disrupción de la barrera hemato-testicular (BHT) (Pröbstl *et al.*, 2022).

La patogénesis de la OAE todavía se desconoce de manera exacta y está siendo objeto de estudio. Posiblemente tenga un enfoque multifactorial, pero se ha demostrado que un trauma testicular puede inducir a las células T a la fabricación de citoquinas proinflamatorias, alterando la continuidad de la BHT (Lysiak *et al.*, 2012). Estos autores, demuestran mediante inmunohistoquímica, la discontinuidad en la BHT causada por infiltración de linfocitos. Para ello, se utilizó CX43, que en condiciones normales tiñe la BHT y entre las células de Leydig, en testículos con OAE. En los túbulos infiltrados con linfocitos, se describe un patrón discontinuo de tinción, además de coincidir con una expresión reducida de CX43, lo que sugiere que la OAE puede ser una causa subyacente de azoospermia e infertilidad en perros. Sin embargo, todavía queda por resolver si las alteraciones observadas en la pared tubular y en la composición de la BHT en los túbulos infiltrados fueron la causa o la consecuencia de la migración de linfocitos.

La forma que tienen ambos estudios de describir los hallazgos encontrados es a través de modelos de orquitis autoinmune experimental, aplicada a testículos de roedores. Los hallazgos histológicos incluyen infiltración linfocítica intersticial, células GC apoptóticas y desprendimiento de GC dentro del lumen tubular. Además, los túbulos seminíferos afectados muestran arresto en la maduración en todos los niveles (espermatogonias, espermátocitos o espermátidas redondas) y patrón Sertoli (Lysiak *et al.*, 2012).

Por tanto, el enfoque de esta enfermedad y la descripción de la interacción entre las células inflamatorias con los diferentes tipos celulares presentes en el testículo pueden servir de ayuda para comprender el mecanismo que produce infertilidad en porcino.

VI. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los problemas de fertilidad son importantes en el hombre y en diferentes especies animales. En el cerdo supone un problema económico importante. Por ello, su estudio puede revelar información importante para comprender mejor su patogenia y, con ello, la búsqueda de posibles tratamientos.

El objetivo general de este trabajo es el estudio microscópico y, con ello, la valoración lesional de testículos de cerdos azoospermicos y con subfertilidad. Los objetivos específicos son: estudiar las características microscópicas de testículos de cerdos sanos, las características microscópicas

de testículos de cerdos azoospermicos y con subfertilidad así como utilizar técnicas inmunohistoquímicas para definir los cambios morfológicos y/o inmunológicos.

VII. METODOLOGÍA

Este estudio ha sido realizado en el Centro de Encefalopatías y Enfermedades transmisibles Emergentes de la Facultad de veterinaria de Zaragoza y ha sido aprobado por la Comisión de Garantía de la Calidad del grado de veterinaria, a fecha de 20 de febrero de 2024.

Para este estudio, se han consultado diferentes bases de datos, como Pubmed, Google académico, Alcorze o Dialnet, con el objetivo de aunar información sobre infertilidad en diferentes especies animales y en el hombre, tanto a nivel lesional como de diagnóstico inmunohistoquímico.

El estudio experimental se ha realizado utilizando muestras de testículo, tanto de animales sanos como con problemas de fertilidad, eliminados como reproductores en centros de inseminación. Se han incluido cerdos azoospermicos y con subfertilidad, diagnosticados previamente, tanto clínicamente como histopatológicamente (Tabla 1).

Tabla 1. Información epidemiológica de los cerdos. Fuente: Directores.

Cerdo	Raza	Causa de eliminación	Edad eliminación
1	Pietrain	Falta de libido	1,9 años
2	Pietrain	Selección genética	1,9 años
3	Pietrain	Artritis	1,9 años
4	Pietrain	Azoospermia	0,8 años
5	Pietrain	Azoospermia	0,8 años
6	Pietrain	Azoospermia	0,8 años
7	Pietrain	Teratozoospermia	0,9 años
8	Pietrain	Orquitis leve	3,4 años
9	Pietrain	Selección genética	1,5 años

10	Pietrain	Selección genética	1,4 años
11	Pietrain	Selección genética	0,8 años
12	Pietrain	Oligospermia	1,1 años

En todos los testículos se han revisado las características microscópicas de los testículos seleccionados, comparándolas con cerdos sanos y se ha realizado los estudios inmunohistoquímicos.

Para el estudio inmunohistoquímico, se han utilizado los siguientes marcadores y condiciones (Tabla 2): Actina de músculo liso (α -sma), C-kit, Ki-67 y Vimentina. En todos ellos, se han utilizado un control positivo y un control negativo:

- Actina de músculo liso (α -sma): Control positivo: Tinción de la paredes vasculares de los vasos e intersticio.
Control negativo: sustitución del primer anticuerpo por buffer de lavado.
- c-kit: Control positivo: control interno de espermatogonias y mastocitos.
Control negativo: sustitución del primer anticuerpo por buffer de lavado.
- Ki-67: Control positivo: Núcleos celulares de células basales.
Control negativo: sustitución del primer anticuerpo por buffer de lavado.
- Vimentina: Control positivo: control interno de tejido conjuntivo de intersticio y pared de vasos sanguíneos.
Control negativo: sustitución del primer anticuerpo por buffer de lavado.

Para la realización de la inmunohistoquímica, se ha procedido al corte de las muestras con un micrótopo, con un espesor de 4 μ m. Para una mayor fijación y con el objetivo de evitar el desprendimiento de las muestras, se utilizaron portas gelificados. Pasos:

1. Desparafinación de los cortes: Sumergir las muestras en xileno, y rehidratar con etanol a concentraciones decrecientes durante 5 minutos.
2. Desenmascaración de los epítomos: Se realiza en una máquina automática (PT LINK Dako), y consiste en sumergir los cortes en soluciones liberadoras de antígenos, que en este caso serán soluciones a pH alto, ya que los anticuerpos utilizados lo hacen a este pH. Duración: 20 minutos a 96 grados.

3. Enfriar la muestra en el propio aparato y sumergir en buffer de lavado durante 5 minutos.
4. A partir de este punto, el resto de la técnica se realiza en un teñidor automático (Autostainer PLUS). Durante este procesado, se llevan a cabo distintos pasos, entre los cuales se realizan lavados con un buffer específico, en períodos de 10 minutos. El primer paso consiste en bloquear la peroxidasa endógena, para lo cual los cortes se sumergen en una solución de peróxido de hidrógeno y metanol durante 5 minutos. Luego, se procede a la aplicación de los anticuerpos primarios mencionados previamente, dejándolos incubar durante un lapso de 30 minutos. Seguidamente, se agrega el complejo polimérico y se incuba también durante 30 minutos. La reacción se visualiza mediante el uso del cromógeno DAB durante 5 minutos, lo cual proporciona una coloración marrón a la muestra. El último paso en el proceso de tinción implica un contraste con hematoxilina durante 5 minutos, que permite la diferenciación del tejido al teñir ligeramente los núcleos de un tono azulado.
5. Por último, se deshidratan las muestras en alcoholes a concentración creciente y se deja reposar en xilol durante 5 min. Finalmente se coloca el cubreobjetos, depositando un par de gotas de DPX, colocar cubreobjetos y mirar al microscopio.

Tabla 2. Marcadores y procedimientos para la inmunohistoquímica. Fuente: Directores.

Anticuerpo	Dilución	Incubación	pH de desenmascaramient o	Tipo de anticuerpo	Sistema de detección
Actina de músculo liso (α -sma)	Sin diluir	30	pH \uparrow	Dako agilent (monoclonal mouse anti-human, code A4502)	Envision+ HRP-labeled polymer anti-mouse
C-kit	1:400	30	pH \uparrow	Dako agilent (polyclonal rabbit anti-human, code A4502)	Envision+ HRP-labeled polymer anti-rabbit
Ki-67	Sin diluir	30	pH \downarrow	Dako agilent (monoclonal mouse anti-human, Clone V9, code GA630)	Envision+ HRP-labeled polymer anti-mouse

Vimentina	Sin diluir	30	pH ↑	Dako agilent (monoclonal mouse anti-human, Clone V9, code GA630)	Envision+ HRP-labeled polymer anti-mouse
-----------	------------	----	------	--	--

Nota: Fuente: Datos aportados por los directores

VIII. RESULTADOS

A continuación se exponen los resultados de los casos estudiados, separándolos por categorías: grupo control, testículos con hipoespermatogénesis y testículos azoospermicos, tanto en arresto madurativo como con síndrome de Sertoli solo.

VIIIa. GRUPO CONTROL

Las características microscópicas se correspondían con un testículo normal (Figs. 2A-C), en el cual podían observarse varios túbulos seminíferos con un epitelio germinal de una densidad y altura adecuada y un intersticio con células de Leydig (Fig. 2A). Con mayor detalle (Fig. 2B), pueden apreciarse las diferentes células del epitelio germinal en diferentes etapas, predominando en éste las espermatidas redondeadas y las elongadas. En esta fase del ciclo, los espermatozoides primarios son escasos. En el intersticio (Fig. C), se observaban abundantes células de Leydig, las cuales se caracterizaban por poseer núcleo excéntrico, nucléolo evidente y abundante citoplasma eosinófilo.

El estudio inmunohistoquímico (Figs. 2D-I) con diferentes marcadores reveló que la vimentina (Figs. 2D-E) teñía el citoplasma de las células de Sertoli, destacando su forma piramidal (Figs. 2D-E), el de las células de Leydig, con su característico citoplasma poligonal (Fig. 2E) y la membrana basal. Esta presentaba un patrón de tinción irregular e intensidad moderada. El grosor de la misma se correspondía con una capa de células peritubulares que presentaban un núcleo aplanado, no teñido y con el citoplasma fusiforme teñido irregularmente (Fig. 2E). La vimentina marcó además la pared de los vasos sanguíneos y el tejido conjuntivo de diferentes localizaciones testiculares, como el intersticio o la albugínea.

El marcador Ki-67 (Figs. 2F-G) demostró el estado proliferativo del epitelio germinal en un testículo normal, el cual mostraba una gran variabilidad zonal del tipo celular en proliferación. En alguno de los túbulos, se observaba una proliferación exclusiva de espermatogonias (Fig. 2F), mientras que en otros predominaban los espermatozoides primarios (Fig. 2F) y en otros las espermatidas redondeadas (Fig. 2G).

El marcador c-kit (Fig. 2H) se utilizó para la inmunotinción de las espermatogonias, las cuales aparecían en estrecho contacto con la membrana basal y de los mastocitos del intersticio (no visibles en esta Figura).

Finalmente, la actina de músculo liso (Fig. 2I) se utilizó para delimitar la membrana basal y las células peritubulares, observándose que la membrana basal en cerdos es fina, con una sola capa de células. Este marcador teñía también, de forma intensa, la pared de los vasos sanguíneos del intersticio.

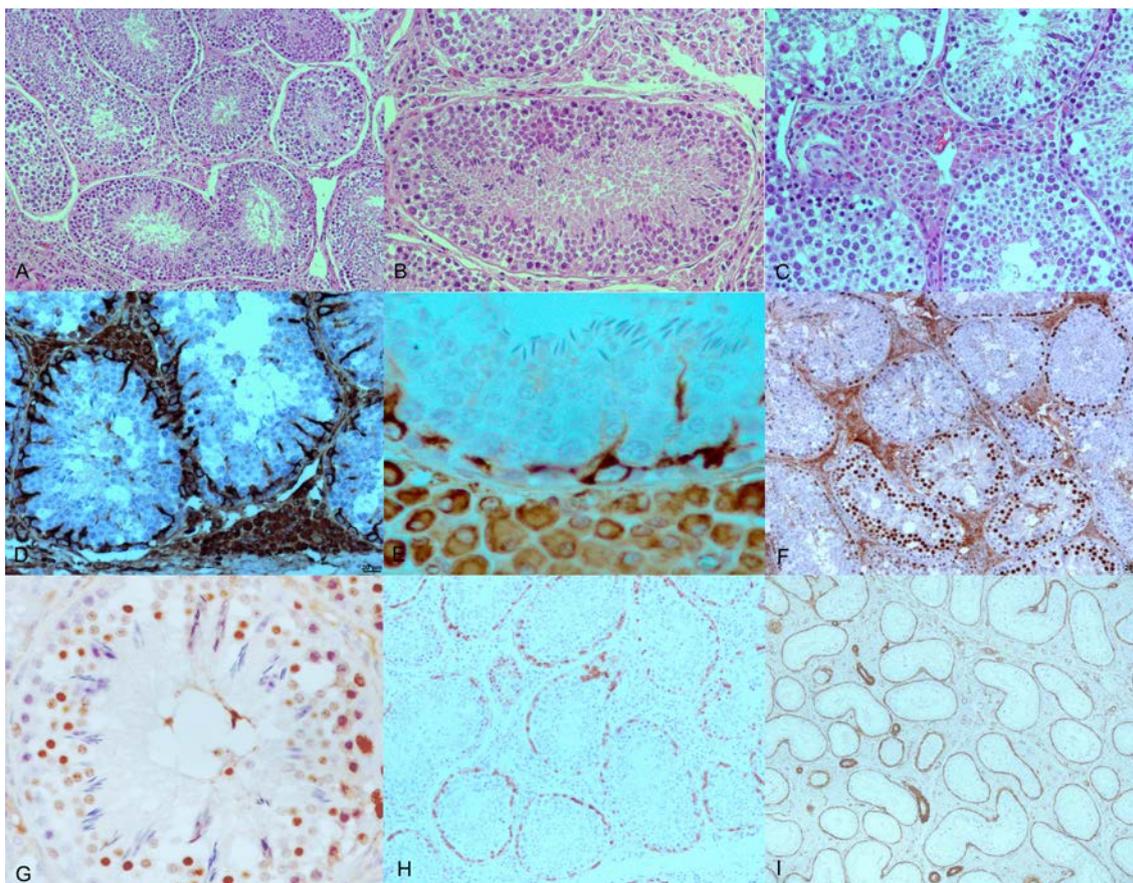


Figura 2: Testículos del grupo control. Tinción de H-E (A-C) e inmunohistoquímica (D-I). Fuente: Directores del TFG.

VIIIb. GRUPO CON HIPOESPERMATOGÉNESIS

Microscópicamente, en los testículos de los verracos con hipoespermatogénesis se observaron diferentes lesiones tubulares, afectando a un número variable de túbulos y lóbulos (Figs. 3A-F).

Habitualmente, la imagen era de túbulos afectados mezclados con túbulos normales, clasificados como hipoespermatogénesis mixta (Fig. 3A). En estos casos, se observaban túbulos con patrón Sertoli, es decir, aquellos en los solo se encontraba este tipo celular (Fig. 3B), túbulos con menor densidad en el epitelio, aunque podían apreciarse todos los tipos celulares (Fig. 3C),

túbulos con espermatogénesis alterada, caracterizada por la presencia de células multinucleadas (Fig. 3D). En algunos túbulos las lesiones eran segmentales (Fig. 3E), con zonas en las que la espermatogénesis era completa y zonas con pérdida celular, con arresto en espermatide redondeada y presencia de células multinucleadas. En otros túbulos, se observaba arresto espermatogénico a diferentes niveles como el observado en la Fig. 3F, a nivel de espermatocito primario. Es destacable que no era infrecuente encontrar túbulos o lóbulos aislados con estos cambios en testículos normales, pero, que habitualmente los testículos con arrestos en la espermatogénesis tendían a ser difusos. Estos arrestos se producían, sobre todo, en las fases más iniciales de la espermatogénesis, con arrestos en espermatogonia o en espermatocito primario.

El estudio inmunohistoquímico (Figs. 3G-L) reveló marcadas diferencias con respecto a los testículos normales, las cuales variaban según el tipo de afección tubular. En los túbulos con patrón Sertoli, la vimentina evidenció la alteración estructural de las células de Sertoli, las cuales habían perdido las prolongaciones hacia la luz y presentaban una mayor densidad de este filamento intermedio en la base, próxima a la membrana basal (Fig. 3G). Además, este marcador demostró un leve a moderado engrosamiento de la lámina basal, que provocaba la separación de las células de Leydig, las aparecían típicamente en contacto con ella en los testículos normales (Figs. 3G y L). Este engrosamiento de la lámina basal también se observó con el marcador de α -sma (Fig. 3H), indicando que este fenómeno se debía, al menos, a un mayor depósito de filamentos intermedios como la vimentina y la actina de músculo liso.

En algunos testículos con hipoespermatogénesis, los túbulos con menor densidad celular y con arrestos, la vimentina mostró la pérdida de las proyecciones de las células de Sertoli hacia la luz tubular, perdiendo su característica estructura piramidal (Fig. 3I).

Con c-kit se observó que las espermatogonias se encontraban presentes en todos los túbulos con diferentes lesiones, incluso en algunos con patrón Sertoli (Fig. 3J), sin embargo, la densidad de la población celular fue menor que en los testículos control. Este marcador no demostró un aparente aumento de mastocitos.

En cuanto a las células de Leydig, la vimentina mostró alteraciones variadas, especialmente en zonas en las que predominaban los túbulos en patrón Sertoli. El intersticio de algunos lóbulos con este patrón presentaba una aparente hiperplasia de células de Leydig (Fig. 3K), aunque en algunos casos parecía deberse a un efecto del menor diámetro de los túbulos afectados. En algunas zonas, se apreció una cierta atrofia de estas células, las cuales mostraban

un citoplasma reducido. La vimentina también permitió visualizar la pérdida de contacto de las células de Leydig con los túbulos seminíferos por el engrosamiento de la lámina basal (Fig. 3L).

La tinción con K-67 (imagen no mostrada) demostró la disminución de la proliferación de las células del epitelio germinal en la mayoría de los túbulos con hipoespermatogénesis, excepto en las espermatogonias y algunos espermatoцитos primarios. En los túbulos con patrón Sertoli solo se observó marcación esporádica de algunas espermatogonias.

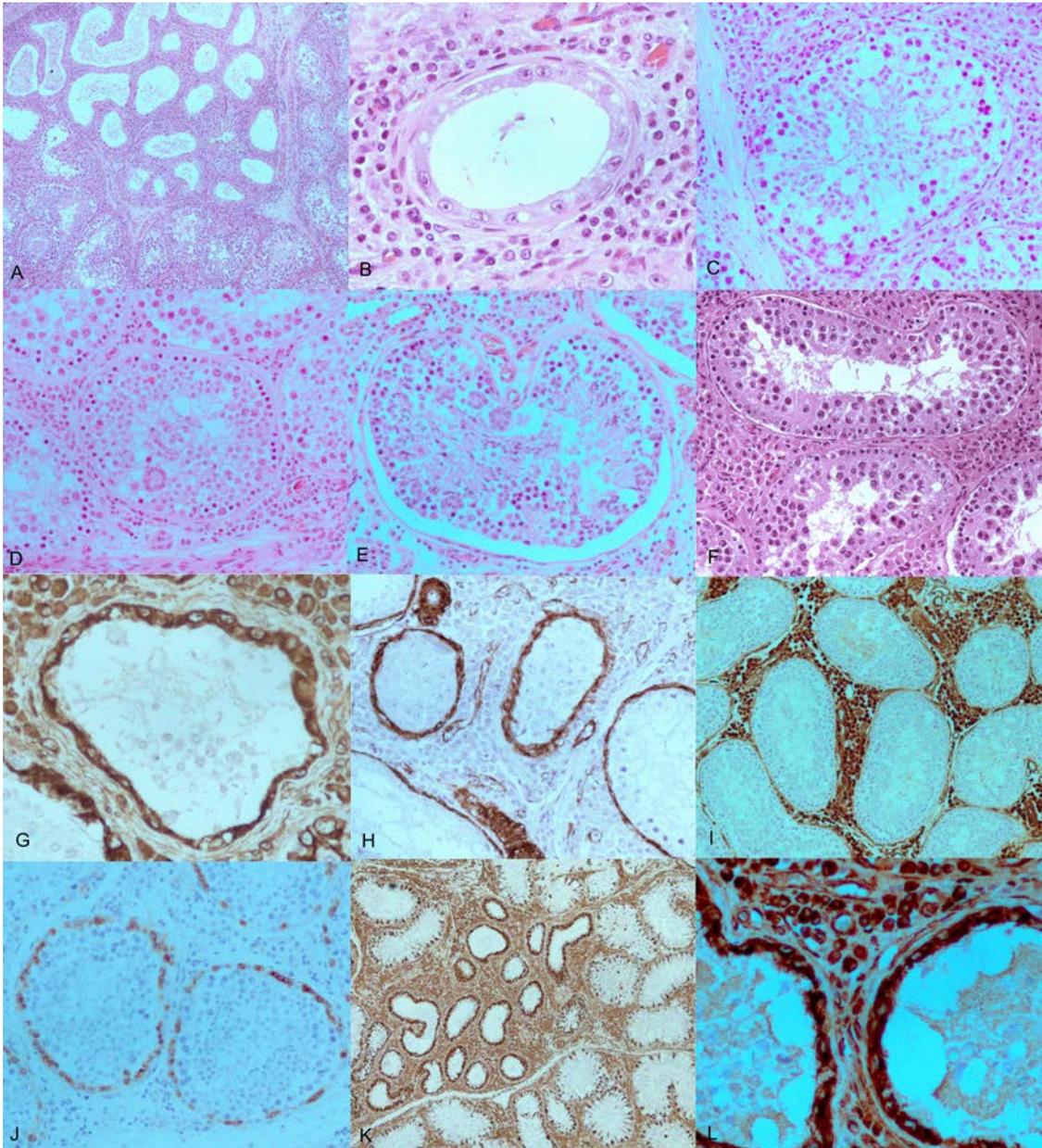


Imagen 3: Cortes histológicas de testículos hipoespermatogénicos y azoospermicos. Fuente: Directores del TFG.

VIIIc. GRUPO AZOOSPERMICO

Los testículos de los machos azoospermicos se caracterizaron todos ellos por la presencia difusa de túbulos en patrón Sertoli. Esporádicamente, se observaron algunos túbulos con espermatocitos primarios o incluso espermatidas. Las características eran semejantes a las descritas en el grupo anterior.

Los hallazgos inmunohistoquímicos fueron semejantes para los descritos en los machos con hipoespermatogénesis, en lo referente a los túbulos con patrón Sertoli.

IX. DISCUSIÓN

La infertilidad es un problema creciente en el hombre y en los animales y cuya etiología y patogenia todavía son inciertas en muchos casos. Además de la importancia de los factores hormonales en el sistema reproductor, la complejidad anatómica de los diferentes órganos que lo componen, especialmente el testículo, motiva la gran complejidad del problema. Entre sus componentes, la membrana basal de los túbulos seminíferos parece jugar un papel importante en la homeostasis testicular. Esta se sitúa en una posición estratégica, separando las células de Sertoli y de Leydig, pero a su vez permite el intercambio de información entre las mismas (Mayerhofer *et al.*, 2018). Además, debido a su capacidad de contraerse al estar formada por células musculares lisas, facilita el impuso de los espermatozoides hacia los túbulos rectos (Jensen *et al.*, 2022). En las muestras estudiadas, se ha observado que la membrana basal se encuentra engrosada, tanto en la tinción con H-E, como en la IHQ frente a vimentina y actina de músculo liso. Se ha descrito que el engrosamiento de la membrana basal por depósito de tejido conjuntivo y músculo liso, además de proteínas como decorina y biglicano (Mayerhofer *et al.*, 2018), desencadena una respuesta inflamatoria al atraer a los mastocitos. Sin embargo, en este TFG no se ha observado tal proliferación de mastocitos descrita en la literatura, lo que sugiere que en cerdos, quizás, los mastocitos no estén relacionados con infertilidad. No obstante, sería recomendable el estudio de los mastocitos con otros marcadores y hacer recuento de los mismos.

El engrosamiento de la pared tubular es frecuente en hombres con espermatogénesis alterada, que además de los depósitos de matriz extracelular, existen cambios morfológicos de las células peritubulares, alterando su funcionalidad (Zhou *et al.*, 2019). Sin embargo, en la especie porcina no existe literatura al respecto, pero se observan los cambios descritos en estudios en humanos y en ratones. De esta forma, poder llegar a entender de forma completa las conexiones que existen entre las células de Leydig, Sertoli y las células peritubulares podría ayudar a encontrar nuevas terapias contra la infertilidad en verracos.

Las células de Leydig desempeñan un papel clave en la espermatogénesis. Numerosos estudios han demostrado que desempeñan roles clave en la regulación de la espermatogénesis al influir en factores de crecimiento y la esteroidogénesis, como la interleucina 1α , el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la inhibina, los factores de crecimiento similares a la insulina 1 (IGF1), el péptido similar a la insulina 3 (INSL3), los estrógenos y las hormonas tiroideas. Estos estudios indican que la función deteriorada de las células estromales testiculares lleva a una producción anormal de andrógenos y afecta la diferenciación de género, el desarrollo gonadal y la espermatogénesis (Zhou *et al.*, 2019). Estudios en humanos describen hipertrofia e hiperplasia de células de Leydig debido a mecanismos compensatorios, o disminución de su número a causa de fibrosis intersticial (Hauptman *et al.*, 2021). En este TFG se ha observado un aumento de células de Leydig y atrofia de las mismas, lo que sugiere que su funcionalidad hormonal puede estar alterada. No obstante, es importante mencionar que la hiperplasia puede ser, en parte, un efecto visual debido al menor diámetro los túbulos seminíferos. Se requieren estudios morfométricos para averiguar si realmente hay alteración en el tamaño y número de las células de Leydig.

Otro de los hallazgos que llama la atención es la menor densidad del epitelio germinal. El número de células germinales es constante a lo largo de toda la vida del animal tras alcanzar la madurez sexual (França *et al.*, 2000). Diferentes mecanismos han podido generar el deterioro de las CG. Se ha descrito el daño directo a estas células como en ciertas infecciones virales. En el cerdo, la infección por el virus del PRSS es capaz de multiplicarse en las células germinales (Sur *et al.*, 1997). Por otra parte, el resto de células que mantienen la estructura de los túbulos seminíferos, en especial las células de Sertoli, pueden alterarse dejando de dar soporte metabólico y nutricional y causando su muerte celular (Panahi *et al.*, 2019). En el hombre, esto se ha descrito principalmente en pacientes con ANO. En este estudio, la pérdida de la estructura normal de las células de Sertoli, evidenciada por la vimentina, fue un hallazgo frecuente, sugiriendo que estas células pueden ser importantes en la infertilidad porcina.

En las muestras observadas existen diferentes tipos de arrestos madurativos, en diferentes fases. Estos se observaron a nivel espermatonia, espermatocito primario, espermátidas o espermiogénesis, predominando los primeros, como se ha descrito en la literatura (McLachlan *et al.*, 2006). Las causas por las que se producen los arrestos son variadas, pudiendo ser debidas a factores genéticos, idiopáticos o adquiridos (Abdel-Hamid *et al.*, 2018). Las causas por las que se han producido en estas muestras estarían englobadas en causas adquiridas en los casos de hipoespermatogénesis, ya que la historia clínica de los verracos utilizados en este estudio

demuestran que al entrar al centro de inseminación, los animales producían semen con excelente calidad, y a medida que ha pasado el tiempo, se detectó la alteración.

Sin embargo, en los casos azoospermicos, el problema se detectó al poco tiempo de su entrada, sugiriendo que podría deberse a un problema del desarrollo, con fallo del eje hipotálamo-hipofisario. En estos animales el predominio lesional fueron los túbulos en patrón Sertoli, caracterizado por una ausencia total de células germinales. En el hombre se han descrito dos tipos, el focal, con presencia de áreas de espermatogénesis residuales y el completo, donde no existen CG debido a un fallo en la migración de los gonocitos durante la etapa embrionaria (Ghanami Gashti *et al.*, 2021). Estos hallazgos descritos en humanos se han encontrado también en nuestras muestras.

La presencia de células gigantes multinucleadas en la luz de los túbulos evidencia el deterioro de la función y estructura de los túbulos seminíferos y es un marcador de espermatogénesis alterada. La apoptosis de las células germinales es un mecanismo común que sucede en un testículo sano. La fagocitosis de estas células se lleva a cabo por las células de Sertoli, siendo una fuente de energía para ellas, y permitiendo el correcto desarrollo y diferenciación del resto de células germinales. Si las células de Sertoli pierden su estructura normal, como se ha observado en algunos de los testículos mediante la inmunotinción con vimentina, es factible pensar que no realizarán adecuadamente sus funciones, entre ellas la fagocitosis y, consecuentemente, se alterará la espermatogénesis (Ren *et al.*, 2021).

X. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

1. En cerdos con hipoespermatogénesis y azoospermia no obstructiva se han observado diferentes lesiones tubulares, de variable extensión, siendo en los azoospermicos las más severas y correspondiéndose principalmente con túbulos con patrón Sertoli.
2. La inmunohistoquímica se ha mostrado de gran utilidad en el estudio morfológico y funcional de testículos procedentes de cerdos azoospermicos o hipoespermatogénicos.
3. La inmunotinción con vimentina ha demostrado una clara alteración morfológica de las células de Sertoli. Teniendo en cuenta el papel tan importante que juegan en la espermatogénesis, estas células podrían tener una participación relevante en los problemas de fertilidad en el cerdo.
4. Los marcadores vimentina y actina de músculo liso han revelado un engrosamiento de la membrana basal en los túbulos más intensamente afectados, como aquellos con patrón Sertoli. Dada la importancia de la comunicación entre las células de Sertoli, Leydig y germinales, que es

modulada por la membrana basal, es factible pensar que su alteración puede alterar la espermatogénesis.

5. Las células de Leydig son importantes en la espermatogénesis, sin embargo, en este estudio el aspecto de las mismas en la mayoría de los testículos parecía normal. No obstante, se vieron algunas alteraciones como hiperplasia o atrofia, las cuales podrían considerarse más bien como consecuencia, que como causa.

6. Los mastocitos se han asociado con problemas de fertilidad en el hombre, sin embargo, en este estudio no se ha visto un aumento claro de los mismos tras su marcación con c-kit. Para definir mejor el papel de los mastocitos en la infertilidad porcina deberían utilizarse otros marcadores.

7. El marcador de proliferación Ki-67 ha mostrado que, en cerdos con problemas de fertilidad, la multiplicación de las células germinales se reduce, especialmente a partir de espermatoцитos primarios.

8. El cerdo puede servir de modelo animal para el estudio de la patogenia de la infertilidad, no obstante, debería ampliarse la casuística de animales con diferentes lesiones tubulares debido a su amplia variabilidad y utilizar un mayor abanico de inmunomarcadores para el estudio estructural y funcional de las diferentes células que participan en la espermatogénesis

CONCLUSIONS

1. In pigs with hypospermatogenesis and non-obstructive azoospermia, different tubular lesions of varying extent have been observed, with the most severe found in azoospermic pigs, primarily corresponding to tubules with a Sertoli cell pattern.

2. Immunohistochemistry has proven to be very useful in the morphological and functional study of testicles from azoospermic or hypospermatogenic pigs.

3. Immunostaining with vimentin has demonstrated a clear morphological alteration of Sertoli cells. Considering the important role they play in spermatogenesis, these cells could have a significant involvement in fertility problems in pigs.

4. Vimentin and smooth muscle actin markers have revealed a thickening of the basement membrane in the most intensely affected tubules, such as those with a Sertoli cell pattern. Given the importance of communication between Sertoli, Leydig, and germ cells, which is modulated by the basement membrane, it is plausible to think that its alteration can affect spermatogenesis.

5. Leydig cells are important in spermatogenesis; however, in this study, their appearance in most testicles seemed normal. Nonetheless, some alterations such as hyperplasia or atrophy were observed, which could be considered more as consequences rather than causes.

6. Mast cells have been associated with fertility problems in humans; however, in this study, a clear increase in these cells was not observed after staining with c-kit. To better define the role of mast cells in porcine infertility, other markers should be used.

7. The proliferation marker Ki-67 has shown that in pigs with fertility problems, the multiplication of germ cells is reduced, especially from primary spermatocytes onward.

8. Pig can serve as an animal model for the study of infertility pathogenesis. However, the casuistry of animals with different tubular lesions should be expanded due to its wide variability, and a broader range of immunomarkers should be used for the structural and functional study of the different cells involved in spermatogenesis.

XI. VALORACIÓN PERSONAL

Este trabajo me ha servido para ampliar mis conocimientos sobre la reproducción en la especie porcina. Además, me ha ayudado a descubrir una parte del sector porcino del que poca gente habla, pero sin embargo queda mucho trabajo e investigaciones por realizar. La revisión bibliográfica realizada me ha ayudado a adquirir práctica en la búsqueda de revisiones bibliográficas, que en un futuro podré aplicar en mi futuro laboral.

Muchas gracias a mis directores, Raquel y Nico, por ser tan pacientes conmigo y darme la oportunidad de ampliar mis conocimientos en este campo de investigación. Gracias también a mis amigos por hacer estos 5 años de carrera los mejores de mi vida.

XII. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Hamid A.A., Atef H., R. Zalata K. y Abdel-Latif A. (2018). Correlation between testicular mast cell count and spermatogenic epithelium in non-obstructive azoospermia. *International Journal of Experimental Pathology*, 99(1), 22–28. doi:10.1111/iep.12261.

Aladamat N, Tadi P. Histology, Leydig Cells. [Updated 2022 Nov 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556007/>

Almeida F.F.L., Leal M.C. y França L.R. (2006). Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*sus scrofa scrofa*). *Biology of Reproduction*, 75(5), 792–799. doi:10.1095/biolreprod.106.053835.

Althouse G.C., Kauffold J. y Rossow S. (2019). Diseases of the reproductive system. *Diseases of Swine*, 373–392. doi:10.1002/9781119350927.ch20.

American cancer society (2018). *Cáncer de testículo*. <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-testiculo/acerca/que-es-el-cancer-de-testiculo.html>

Anatomía del Verraco. (2020). *Magapor*. Disponible en: <https://magapor.com/actualidad-tecnica/anatomia-del-verraco/>

Bhattacharya I., Souvik S.S. y Subeer S.M. (2024). Etiology of Male Infertility: an Update. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 31(4), 942-965. doi:10.1007/s43032-023-01401-x

Boar Anatomy and physiology. *The Pig Site*. <https://www.thepigsite.com/genetics-and-reproduction/insemination/anatomy-and-physiology-1>

Bryan E. R., Jay Kim, Kenneth W Beagley y Alison J Carey. (2020). Testicular inflammation and infertility: Could chlamydial infections be contributing?. *American Journal of Reproductive Immunology*, 84(3). doi: 10.1111/aji.13286.

Chiappalupi S., Salvadori L., Mancuso F. *et al.* (2022). Microencapsulated Sertoli cells sustain myoblast proliferation without affecting the myogenic potential in vitro data. *Data in Brief*, 40, 107-744. doi:10.1016/j.dib.2021.107744.

Eghbali M., Sadeghi M.R., Lakpour N. *et al.* (2014). Molecular analysis of testis biopsy and semen pellet as complementary methods with histopathological analysis of testis in non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 31, 707–715 doi:10.1007/s10815-014-0220-5.

England G. C. W. y Concannon P. W. (2010). *Reproduction in Dogs and Cats*. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(3), 471-487.

Fijak M., Pilatz A., P. Hedger M., Nicolas N., Bhushan S. *et al.* (2018). Infectious, inflammatory and “autoimmune” male factor infertility: How do rodent models inform clinical practice?. *Human Reproduction Update*, 24(4), 416–441. doi:10.1093/humupd/dmy009.

Filardo S., J. Skilton R., E. O'Neill C., Di Pietro M., Sessa R. y N. Clarke J. (2019) Growth Kinetics of *Chlamydia trachomatis* in primary human Sertoli cells, *Scientific Reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-42396-3.

França L.R., Avelar G.F. y Almeida F.F.L. (2005). Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs, *Theriogenology*, 63(2), 300–318. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.09.014.

França L.R., Silva, Jr. V.A., Chiarini-Garcia H., Garcia S.K. y Debeljuk L. (2000). Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction*, 63, 1629–1636. doi:10.1095/biolreprod63.6.1629.

Ganesh A., Dinakar G., Prem Kumar MS. *et al.* (2018). Immunohistochemical quantification of mast cells in inflamed and noninflamed pulp tissue. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 22(1), 73. doi:10.4103/jomfp.jomfp_206_16.

Gat Y, Gornish M., Chakraborty J., Perlow A., Levinger U. y Pasqualotto F. (2010). Azoospermia and maturation arrest: malfunction of valves in erect poster of humans leads to hypoxia in sperm production site. *Andrologia*, 42(6), 389-94. doi:10.1111/j.1439-0272.2010.01083.x.

Ghanami Gashti N., Sadighi Gilani M.A. y Abbasi M. (2021). Sertoli cell-only syndrome: etiology and clinical management. *J Assist Reprod Genet* 38, 559–572. doi:10.1007/s10815-021-02063-x.

Gpe de Loera Ortega, Yasmín. (2016). *Efecto de la fuente y nivel de zinc en el comportamiento productivo de machos no castrados (40-110 kg) y su relación con el comportamiento sexual*. [Tesis doctoral universidad complutense de Madrid] <https://docta.ucm.es/entities/publication/05ec440d-4073-476c-a964-3b0c8566b22f>

Han K., Hwi Won S., Park C. *et al.* (2013) Comparative pathogenesis of type 1 (European genotype) and type 2 (North American genotype) porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected boar, *Virology Journal*, 10(1). doi:10.1186/1743-422x-10-156.

Hauptman D., Himelreich-Perić M., Marić T. *et al.* (2021). Leydig cells in patients with non-obstructive azoospermia: Do they really proliferate?. *Life*, 11(11), 1266. doi:10.3390/life11111266.

Himelreich-Perić M., Katušić-Bojanac A., Hohšteter M. *et al.* (2022). Mast cells in the mammalian testis and epididymis—animal models and detection methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2547. doi:10.3390/ijms23052547.

Informe anual de indicadores: Agricultura, Pesca y alimentación 2022 (2023). Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

- Jensen C.F., Wang D., Mamsen L. S. *et al.* (2022). Sertoli and germ cells within atrophic seminiferous tubules of men with non obstructive azoospermia. *Frontiers in Endocrinology*, 13. doi:10.3389/fendo.2022.825904.
- Kawakami E., Koga H., Hori T. y Tsutsui T. (2003). Sperm granuloma and sperm agglutination in a dog with asthenozoospermia., *Journal of Veterinary Medical Science*, 65(3), 409–412. doi:10.1292/jvms.65.409.
- Knox R.V. (2016). Artificial insemination in Pigs Today. *Theriogenology*, 85(1), 83–93. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.009.
- López L.X. y Quiroga C.F. (2015). La Vitamina A: Reguladora de la espermatogénesis. *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá*, 2(1), 63–79. doi:10.24267/23897325.130.
- López-González A. *et al.* (2010). Evolución natural del carcinoma embrionario. *Archivos Españoles de Urología (Ed. impresa)*, 63(9). doi:10.4321/s0004-06142010000900009.
- Lunstra D.D., Ford J.J., Christenson R.K. y Allrich R.D. (1986). Changes in Leydig cell ultrastructure and function during pubertal development in the boar. *Biol Reprod.* 34(1), 145-58. doi: 10.1095/biolreprod34.1.145.
- Lysiak J.J., Zhang J., Park D. y Ravichandran K. (2012). Impaired clearance of apoptotic germ cells leads to disruption of the blood testis barrier and spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 87(Suppl_1), 24–24. doi:10.1093/biolreprod/87.s1.24.
- Ma L., Hai S., Wang C., *et al.* (2023)a. Zearalenone induces mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes dysfunction in piglet sertoli cells based on endoplasmic reticulum stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 254, 114710. doi:10.1016/j.ecoenv.2023.114710.
- Ma, L., Chen, C., *et al.* (2023)b. Inhibition of mitochondrial fission alleviates zearalenone-induced mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane dysfunction in Piglet Sertoli cells. *Toxins*, 15(4), 253. doi:10.3390/toxins15040253.
- Mayerhofer A. (2019). Peritubular cells of the human testis: Prostaglandin E2 and more. *Andrology*, 8(4), 898–902. doi:10.1111/andr.12669.
- Mayerhofer A. *et al.* (2018). Human testicular peritubular cells, mast cells and testicular inflammation. *Andrologia*, 50(11). doi:10.1111/and.13055.
- McLachlan R.I., Rajpert-De Meyts E., Høie-Hansen C. E., *et al.* (2006). Histological evaluation of the human testis—approaches to optimizing the clinical value of the assessment: Mini Review. *Human Reproduction*, 22(1), 2–16. doi:10.1093/humrep/del279.

Morey-Matamalas A., Vidal E., Martinez J. y Alomar J. (2021). *Neoplastic lesions in domestic pigs detected at Slaughter: Literature Review and a 20-Year review (1998–2018) of Carcass Inspection in Catalonia. Porcine Health Management*, 7(1). doi:10.1186/s40813-021-00207-0.

Niazi Tabar A., Azizi H., Hashemi Karoii D. y Skutella T. (2022). Testicular localization and potential function of vimentin positive cells during spermatogonial differentiation stages. *Animals*, 12(3), 268. doi:10.3390/ani12030268.

Panahi S., Karamian A., Sajadi E., *et al.* (2019). Sertoli cell-conditioned medium restores spermatogenesis in azoospermic mouse testis. *Cell and Tissue Research*, 379(3), 577–587. doi:10.1007/s00441-019-03092-w.

Pröbstl C., Umbach A., Beineke A., Körber H. y Goericke-Pesch S. (2022). Immune cell characterization in spontaneous autoimmune orchitis in dogs. *Theriogenology*, 187, 219–226. doi:10.1016/j.theriogenology.2022.05.010.

Ren L., Zhang Y., Xin Y., *et al.* (2021). Dysfunction in Sertoli cells participates in glucocorticoid-induced impairment of spermatogenesis. *Molecular Reproduction and Development*, 88(6), 405–415. doi:10.1002/mrd.23515.

Riken A.M., Agbomhere Hamed M. y Eghoghosa Akhigbe R. (2024). Histopathological evaluation of infertility: Lessons from laboratory rodents. *Histology and Histopathology*, 39(6), 671-690. doi: 10.14670/HH-18-684.

Rodríguez-Martínez H. (2015) Evaluación de la calidad seminal en el verraco. *Avances en tecnología porcina*, 8(2), 43-53.

Romo-Valdez J., Silva-Hidalgo G., Güémez-Gaxiola H., Romo-Valdez A. y Romo-Rubio J. (2022). Estrés por calor: Influencia sobre la fisiología, comportamiento productivo y reproductivo del Cerdo. *Abanico Veterinario*, 12. doi:10.21929/abavet2022.37.

S. Williams. (2013) Eficiencia reproductiva en el verraco. *Bras. Repr. Anim., Belo Horizonte*, 37(2), 200-206.

Sharma A. Minhas S., Dhillon W.S. y Jayasena C.N. (2020). Male infertility due to testicular disorders. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 106(2). doi:10.1210/clinem/dgaa781.

Sobinoff A.P., Dando A.J., Redgrove K.A. *et al.* (2015) Chlamydia muridarum infection-induced destruction of male germ cells and Sertoli cells is partially prevented by chlamydia major outer

membrane protein-specific immune CD4 CELLS1, *Biology of Reproduction*, 92(1). doi:10.1095/biolreprod.114.124180.

Sur J.H., Doster A.R., Christian J.S. *et al.* (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis, *Journal of Virology*, 71(12), 9170–9179. doi:10.1128/jvi.71.12.9170-9179.1997.

Testicular tumors in commercial boars with infertility: A gross, histologic and immunohistochemical study. *Vet. Pathol.*

Valverde Anthony. (2021). Importancia de la evaluación de la actitud reproductiva mediante el análisis de semen por sistemas CASA. *Revista Investiga TEC* 1(40)

Witherspoon L. y Flannigan, R. (2019). Meiotic arrest in azoospermic men: Current implications of a recently reported novel technique for classification of arrest stage. *Fertility and Sterility*, 112(6), 1044–1045. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.09.044.

Wojciech Pawlina y Michael H. Ross (2019). Ross Histología: texto y atlas: correlación con Biología molecular y celular.

Woo M.S., Kim E.J., Prayoga A.H. *et al.* (2023). Expression of task-1 channel in Mouse Leydig Cells. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 38(4), 291–299. doi:10.12750/jarb.38.4.291.

Wu X., Yun D., Sang M. *et al.* (2022). Defects of microtubule cytoskeletal organization in NOA human testes. *Reprod Biol Endocrinol*, 20, 154 doi: 10.1186/s12958-022-01026-w.

Yan H.H. y Cheng, C.Y. (2005). Blood–testis barrier dynamics are regulated by an engagement/disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(33), 11722–11727. doi:10.1073/pnas.0503855102.

Zhou R., Wu J., Liu B. *et al.* (2019). The roles and mechanisms of leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(14), 2681–2695. doi:10.1007/s00018-019-03101-9.