

75659

**EBEL BARRERA, FRANCISCA AND**

*Características morfológicas y fisiológicas del tomate y pepino asociados :*

2016

**75659**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA  
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN EQUINA

**CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y  
MICROSCÓPICAS DEL TESTÍCULO Y EPIDÍDIMO  
EQUINO ASOCIADOS A LA PUBERTAD**

TESIS

TESISTA

**Francisca Andrea Ebel Barrera, MV**

*Profesor adjunto, Escuela de Medicina Veterinaria,  
Universidad Mayor, Temuco, Chile.*

DIRECTOR

**Marcelo Miragaya MV, MSc, PhD**

*Cátedra de Teriogenología, Facultad de Cs. Veterinarias, INITRA  
Universidad de Buenos Aires*

CODIRECTOR

**Dra. Mónica Vazquez-Levin**

*Licenciada y Doctora en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires  
Investigadora Principal  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina  
Directora de Laboratorio  
Instituto de Biología y Medicina Experimental  
CONICET-FIBYME*

Río Cuarto – Argentina

Noviembre de 2016



070.18

## JURADO DE TESIS

**Neild, Deborah; MV PhD**

Profesora Adjunta, exclusiva, Cátedra de Teriogenología,  
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de  
Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

**Vivas, Adriana; Bioquímica, Farmacéutica, MSc, PhD**

Profesor Asociado Exclusivo en Histología. Departamento  
de Anatomía Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria,  
Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba,  
Argentina.

**Paz, Sergio; Ing. Zootecnista, MSc**

Profesor Adjunto Ordinario a cargo de titularidad, Cátedra de  
Equinotécnia. Facultad de Ciencias Universidad Nacional de  
Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina.

MF
Clasif:
T. 1080

20659

## AGRADECIMIENTOS

A mi director, Marcelo Miragaya, por todo el apoyo, dedicación y conocimientos entregados y por hacer posible este trabajo.

A mi codirectora, Mónica Vazquez-Levin, por participar de forma activa y comprometida en este proceso desde el inicio del proyecto, otorgándome apoyo y conocimientos en el desarrollo del proyecto, colección, análisis de resultados, elaboración y redacción del mismo.

A Pascual Dauría, Médico Veterinario e Histólogo de la Cátedra de Histología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, por ayudarme de forma solidaria y entusiasta con la evaluación y redacción de la sección de histología.

A Nelcy Schleef, del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, por su dedicación en el procesamiento de las muestras histológicas.

A Alejandro Ferrante, Médico Veterinario de la Cátedra de Teriogenología de la Facultad de Cs. Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, por su gran ayuda en la captura digital de las imágenes histológicas.

Al director de la maestría, Luis Losinno, por la oportunidad de realizar este Magíster y por estar presente durante este proceso.

A mi hermosa familia y mi novio Diego por el apoyo incondicional, enseñanza, comprensión y ánimo que me han entregado durante este periodo.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que de una u otra forma me ayudaron a concluir este trabajo y a pasar a una etapa en mi vida.

## Índice

I. INTRODUCCIÓN .....	10
1. La especie equina como modelo de reproducción en el mundo .....	10
2. El testículo equino .....	11
3. El epidídimo equino .....	14
4. La pubertad en el equino .....	19
4.1 Etapas de la pubertad en el equino .....	20
4.1.1 Etapa 1: desarrollo embrionario de los órganos sexuales masculinos .....	20
4.1.2 Etapa 2: desarrollo y crecimiento del potrillo (quietud reproductiva) .....	21
4.1.3 Etapa 3: Eventos iniciales del desarrollo reproductivo (espermarquia, función endocrina, libido) .....	21
4.1.3.1 Inicio de la función endocrina reproductiva .....	21
4.1.3.2 Inicio de la espermatogénesis .....	22
4.1.3.3 Formación del lumen de los tubulos seminíferos .....	23
4.1.3.4 Diferenciación de las células de Sertoli y formación de la barrera hemato-testicular .....	24
4.1.3.5 Modificación de la pigmentación del parénquima testicular y disminución del número de células intersticiales (células de Leydig y macrófagos) ...	24
4.1.3.6 Cambios puberales asociados al epidídimo .....	25
4.1.4 Etapa 4: maduración sexual y eficiencia reproductiva (espermatogénesis y comportamiento sexual) .....	26
II. HIPÓTESIS .....	29
III. OBJETIVOS .....	30
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
1. Materiales .....	31
1.1 Reactivos de laboratorio .....	31
1.2 Tejidos .....	31
2. Métodos .....	32
2.1. Evaluación macroscópica .....	32
2.1.1 Evaluación anatómica .....	32
2.1.2 Evaluación morfométrica .....	33
2.2 Evaluación microscópica .....	33
2.2.1 Evaluación histológica .....	34
2.2.2 Evaluación histomorfométrica .....	34
3. Análisis estadístico .....	35
V. RESULTADOS .....	37
1. Evaluación macroscópica .....	37
1.1 Descripción y evaluación anatómica .....	37

1.1.1 Hallazgos en el testículo.....	37
1.1.2 Hallazgos en el epidídimo.....	38
1.2 Evaluación morfométrica .....	39
1.2.1 Hallazgos en el peso .....	39
1.2.2 Hallazgos en las dimensiones .....	42
1.2.2.1 Hallazgos en el tamaño .....	42
1.2.2.2 Hallazgos en el volumen.....	43
2. Evaluación microscópica .....	45
2.1 Evaluación histológica .....	45
2.1.1 Hallazgos en el testículo .....	45
2.1.2 Hallazgos en el epidídimo.....	47
2.2 Evaluación histomorfométrica.....	51
2.2.1 Hallazgos en el diámetro del conducto.....	51
2.2.2 Hallazgos en las dimensiones del lumen.....	53
2.2.2.1 Hallazgos en el diámetro .....	53
2.2.2.2 Hallazgos en el área .....	55
2.2.2.3 Hallazgos en el perímetro.....	57
2.2.3 Hallazgos en las dimensiones del epitelio .....	59
2.2.3.1 Hallazgos en la altura .....	59
2.2.3.2 Hallazgos en el largo de los esterocilios.....	61
2.2.3.3 Hallazgos en el diámetro de las células principales y basales .....	63
2.2.4 Hallazgos en las dimensiones del tejido muscular .....	66
VI. DISCUSIÓN.....	69
1. Proyecciones .....	77
VII. CONCLUSIONES.....	78
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

## Índice de figuras y tablas

Figura I1. Testículo equino adulto de 10 cm de largo. Vista lateral de la región capsular .....	11
Figura I2. Ilustración del parénquima testicular equino. Corte transversal de la región no capsular, imagen ilustrativa.....	12
Figura I3. Ilustración de los componentes del parénquima testicular equino .....	14
Figura I4. Ilustración esquemática de la vista lateral del epidídimo equino.....	15
Figura I5. Representación esquemática del epitelio del epidídimo .....	18
Figura I6. Etapas del epitelio seminífero equino y los tipos de células germinales .	23
Figura I7. Clasificación del epitelio seminífero equino durante la iniciación de la espermatogénesis basado en el puntaje del lumen tubular (LS 1 a 7).....	24
Figure I8. Representación esquemática del desarrollo de la pigmentación del parénquima testicular. Corte transversal .....	25
Tabla M1. Criterios establecidos para clasificar el estadio puberal de los tejidos ...	32
Tabla M2. Puntuación según pigmentación del parénquima testicular .....	32
Figura M1. Imágenes representativas de la puntuación según pigmentación del parénquima testicular.....	33
Tabla M3. Fórmulas utilizadas para el cálculo de volumen de cada tejido según forma geométrica .....	33
Figura M2. Medidas realizadas para la evaluación histomorfométrica.....	35
Figura R1. Imágenes representativas registradas de testículo peripuberal (A) y postpuberal (B).....	37
Tabla R1. Determinación del puntaje de pigmentación del parénquima de testículos peripuberales y postpuberales .....	38
Figura R2. Imágenes representativas de la pigmentación del parénquima de testículos peripuberales (A) y postpuberales (B).....	38
Figura R3. Imágenes representativas de epidídimo peripuberal (A) y postpuberal (B) .....	39
Tabla R2. Peso testicular y epididimal y razón peso epidídimo/testículo de tejidos peripuberales y postpuberales .....	39
Figura R4. Peso testicular y peso epididimario de tejidos peripuberales y postpuberales .....	40
Tabla R3. Peso testicular, peso epididimario y relación peso epidídimo-testículo, según subgrupos establecidos por intervalos de peso testicular.....	41
Figura R5. Gráficas para el análisis de correlación de los valores de peso testicular y epididimario, razón peso epidídimo/testículo y peso testicular, y razón peso epidídimo/testículo y peso epididimal .....	41
Figura R6. Peso testicular y epididimario según subgrupos establecidos por intervalos de peso testicular .....	42
Tabla R4. Tamaño testicular y epididimario de tejidos peripuberales y postpuberales.....	43

Tabla R5. Volumen testicular y epididimario de tejidos peripuberales y postpuberales de equino .....	44
Figura R7. Volumen testicular y volumen epididimal de tejidos peripuberales y postpuberales .....	44
Figura R8. Volumen epididimario por segmento de tejidos peripuberales y postpuberales .....	44
Figura R9. Cortes transversales de testículos equinos prepuberales (A), peripuberales (B) y postpuberales (C) .....	46
Figura R10. Cortes transversales de epidídimo equino peripuberal. "Segmento inicial" correspondiente a conducto eferente (A) o caput (B) del epidídimo equino .....	47
Figura R11. Cortes transversales de epidídimo equino. Segmentos caput (A), corpus (B) y cauda (C) .....	48
Figura R12. Cortes transversales del epidídimo de equinos prepuberales (A), peripuberales (B) y postpuberales (C) .....	50
Figura R13. Cortes transversales del lumen de epidídimos equinos prepuberales, peripuberales y postpuberales .....	51
Tabla R6. Diámetro del conducto de epidídimos de equinos peripuberales y postpuberales .....	52
Figura R14. Diámetro del conducto epididimario de tejidos peripuberales y postpuberales .....	52
Tabla R7. Diámetro del lumen de epidídimos de equinos peripuberales y postpuberales .....	53
Figura R15. Diámetro del lumen de epidídimos peripuberales y postpuberales .....	54
Tabla R8. Área del lumen de epidídimos peripuberales y postpuberales .....	55
Figura R16. Área del lumen de epidídimos peripuberales y postpuberales .....	56
Tabla R9. Perímetro del lumen de epidídimos peripuberales y postpuberales .....	57
Figura R17. Perímetro del lumen de epidídimos peripuberales y postpuberales .....	58
Tabla R10. Altura del epitelio de epidídimos prepuberales y postpuberales .....	59
Figura R18. Altura del epitelio de epidídimos peripuberales y postpuberales .....	60
Tabla R11. Largo de los esterocilios del epitelio de epidídimos peripuberales y postpuberales .....	61
Figura R19. Largo de los esterocilios del epitelio de epidídimos peripuberales y postpuberales .....	62
Tabla R12. Diámetro de las células principales y basales del epitelio de epidídimos peripuberales y postpuberales .....	63
Figura R20. Diámetro de las células principales (1) y basales (2) de epidídimos peripuberales y postpuberales .....	65
Tabla R13. Grosor de la capa muscular y número de capas celulares del tejido muscular de epidídimos de equinos peripuberales y postpuberales .....	66
Figura R21. Grosor de la capa muscular del tejido muscular de epidídimos peripuberales y postpuberales .....	67



## CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DEL TESTÍCULO Y EPIDÍDIMO EQUINO ASOCIADOS A LA PUBERTAD

### RESUMEN

Durante la pubertad, en el testículo y en el epidídimo equino ocurren numerosos cambios macroscópicos y microscópicos. A pesar de su importancia, la información actual sobre estos cambios en el equino es escasa. El objetivo de este estudio fue realizar un análisis sistemático y detallado de 18 tejidos peripuberales y 55 tejidos postpuberales para la determinación de una serie de características macroscópicas y microscópicas del testículo y del epidídimo equino. El análisis histológico realizado sobre el testículo y el epidídimo equino corroboró la clasificación peripuberal y postpuberal establecida en este estudio. A partir de los resultados obtenidos, se determinó que los testículos y epidídimos postpuberales presentan mayor desarrollo anatómico e histológico que tejidos peripuberales ( $p < 0,05$ ). Los cambios macroscópicos más evidentes fueron el mayor peso, volumen y tamaño de los tejidos postpuberales ( $p < 0,05$ ). Además los testículos postpuberales presentaron una pigmentación oscura del parénquima testicular (78%), mientras que los testículos peripuberales presentaron una pigmentación clara (89%;  $p < 0,05$ ). Los cambios microscópicos más relevantes de los testículos postpuberales fue el mayor desarrollo de la línea germinal ( $p < 0,05$ ). En cuanto al epidídimo, las modificaciones más importantes entre tejidos peripuberales y postpuberales se observaron en relación a las características del epitelio y del tejido muscular ( $p < 0,05$ ). Al comparar entre los segmentos epididimarios, el cauda fue el segmento que presentó mayor desarrollo del conducto, del lumen y del tejido muscular en comparación con el segmento caput y corpus ( $p < 0,05$ ). Los resultados de este estudio establecen la primera caracterización macroscópica y microscópica detallada del testículo y epidídimo puberal equino, resultados que contribuyen a la comprensión de los procesos que llevan a la adquisición de potencial fecundante. Estudios complementarios enfocados al análisis de transcritos y proteínas permitirán, en el futuro, profundizar en las bases moleculares que llevan a los cambios identificados y descritos en esta investigación.

## MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC PUBERTAL CHARACTERISTICS OF EQUINE TESTES AND EPIDIDYMIS

### ABSTRACT

*During puberty, several macroscopic and microscopic changes occur in the testis and epididymis. Despite its relevance, the literature is scarce on information about this characteristics in stallion testis and epididymis around puberty. The aim of this study was to perform a systematic and detailed analysis of 18 peripubertal and 55 postpubertal tissues to determine a set of macroscopic and microscopic parameters in the testis and epididymis of both groups. The histological analysis of the testis and epididymis corroborated the peripubertal and postpubertal classification performed on this study. The results of this study revealed that postpubertal testis and epididymis have higher anatomical and histological development than peripubertal tissues ( $p < 0.05$ ). The most relevant macroscopic changes were the higher weight, volume and size of postpubertal tissues ( $p < 0.05$ ). The postpubertal testicular parenchyma showed dark pigmentation (78%) while the peripubertal testicles presented clear parenchyma pigmentation (89%;  $p < 0.05$ ). The most relevant microscopic changes in postpubertal testes were the higher development of the germline ( $p < 0.05$ ). In relation to the epididymis, the most evident microscopic changes between postpubertal and peripubertal were observed in the epithelium and muscle tissue characteristics ( $p < 0.05$ ). When comparing between epididymal segments, the cauda was the segment that presented more development of the duct, lumen and muscle tissue compared to the caput and corpus segments ( $p < 0.05$ ). This study reports the first detailed characterization of macroscopic and microscopic characteristics of the equine testis and epididymis around puberty. Findings here reported will contribute to the understanding of the processes related to the acquisition of the stallion fertilizing potential. Complementary studies focused on the analysis of transcripts and proteins from both tissues, will help to understand the molecular basis of the testicular and epididymal changes identified and described in this research.*

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. La especie equina como modelo de reproducción en el mundo

La industria equina ha experimentado un crecimiento importante en los últimos años debido al incremento del conocimiento sobre reproducción, lo cual que ha mejorando las tasas de preñez y el número de crías por año. En la actualidad existen aproximadamente 58,9 millones de caballos en el mundo. Estados Unidos es el país con el mayor número de caballos, correspondiente aproximadamente a un quinto de la población mundial equina (FAO, 2014). Esto genera un impacto global de \$102 millones de dolares por año (American Horse Council Foundation's, 2005).

Los equinos son utilizados como animales de compañía, más que un animales de producción, principalmente para eventos recreacionales, sociales y deportivos, a pesar que un gran número de ellos siguen siendo utilizados como medio de transporte, como herramienta de trabajo y para consumo humano. Para lograr los objetivos propuestos para cada disciplina en particular, es necesario seleccionar a cada progenitor por su genética para obtener un producto con las competencias suficientes para ser económicamente rentable (American Horse Council Foundation's, 2005). Para lograr estos objetivos, se han desarrollado una variedad de técnicas de reproducción asistida para optimizar los resultados de fertilidad en el equino (Heninger, 2011), donde las tasas de éxito que se obtengan dependerán del estatus reproductivo tanto de la yegua como del padrillo.

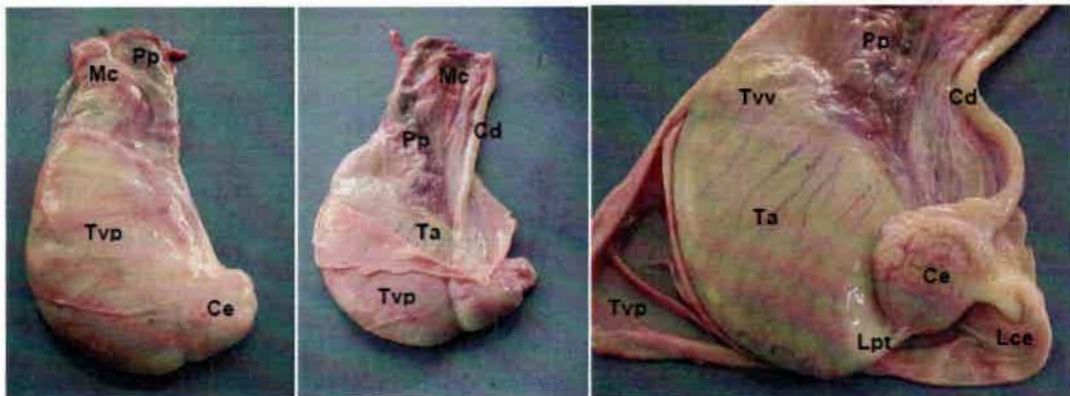
Por más de 20 años numerosos estudios han sido dirigidos al testículo y epidídimo equino con la finalidad de comprender las causas de la infertilidad y subfertilidad (Bouin y Ancel, 1905; Nishikawa, 1955; Fawcett et al, 1973; Johnson y Neaves, 1981; Johnson y Thompson, 1983; Naden et al, 1990; Johnson et al, 1991a; Johnson et al, 1991b; Johnson et al, 1994; Clemmons et al., 1995; Mendes, 2012). El adecuado desarrollo y funcionalidad del testículo y del epidídimo, es esencial para un rendimiento reproductivo exitoso. El testículo es el órgano más importante del sistema reproductor del macho debido a que es donde se producen las células germinales (espermatozoides) y es la fuente principal de hormonas masculinas (estrógenos, testosterona e inhibina) (Senger, 2012). Por su parte, el epidídimo proporciona el *melieu* de maduración de los espermatozoides donde adquirirán la motilidad progresiva y la capacidad de reconocer y unirse al ovocito (Amann, 2011b).

Según los objetivos de este trabajo, este estudio se focalizará en el testículo y el epidídimo, los dos tejidos más relevantes en el aparato reproductor masculino.

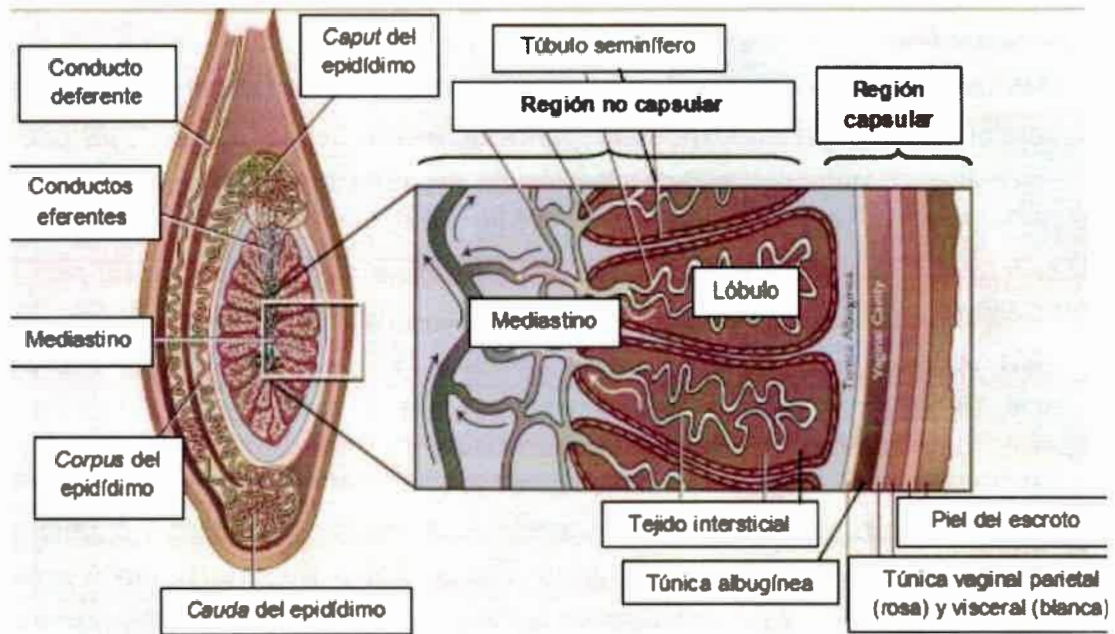
## 2. El testículo equino

El testículo es la gónada masculina y su función principal es la espermatogénesis y esteroidogénesis. Además, el testículo produce una gran variedad de proteínas necesarias para el adecuado desarrollo de la espermatogénesis (Senger, 2012). En el padrillo los testículos son alargados, planos lateralmente y se posicionan horizontalmente al cuerpo del animal. Los testículos de equinos adultos miden entre 8 a 14 cm de largo, 5 a 8 cm de ancho y pesan 225 g (Amann, 2011a). El tamaño y peso del testículo varía considerablemente según edad, peso vivo y estacionalidad (Nishikawa, 1955; Johnson y Neaves, 1981; Johnson y Thompson, 1983; Johnson et al, 1991a; Johnson et al, 1991b; Johnson et al, 1994; Clemmons et al, 1995; Heninger, 2011).

El testículo está compuesto por una región capsular y una región no capsular. La región capsular está compuesta de tejido conectivo que recubre y protege al órgano, correspondiente a la túnica albugínea y túnica vaginal visceral (**Figura I1**). Las proyecciones de tejido conectivo se extienden desde la túnica albugínea hacia el parénquima testicular dividiendo al testículo en lóbulos. La región no capsular corresponde al parénquima testicular que está compuesto por los túbulos seminíferos y el tejido intersticial (Amann, 2011a; **Figura I2**).



**Figura I1.** Testículo equino adulto de 10 cm de largo. Vista lateral de la región capsular. Pp: plexo pampiniforme, Mc: músculo cremáster, Tvp: túnica vaginal parietal, Ce: cola del epidídimo, Cd: conducto deferente, Ta: túnica albugínea, Tv: túnica vaginal visceral, Lpt: ligamento propio del testículo, Lce: ligamento de la cola del epidídimo. Fuente: gentileza Dr. Marcelo Miragaya.



**Figura 12.** Ilustración del parénquima testicular equino. Corte transversal de la región no capsular, imagen ilustrativa. ST: túbulo seminífero, LC: células de Leydig, T: lumen tubular. Fuente: Senger PL., 2012.

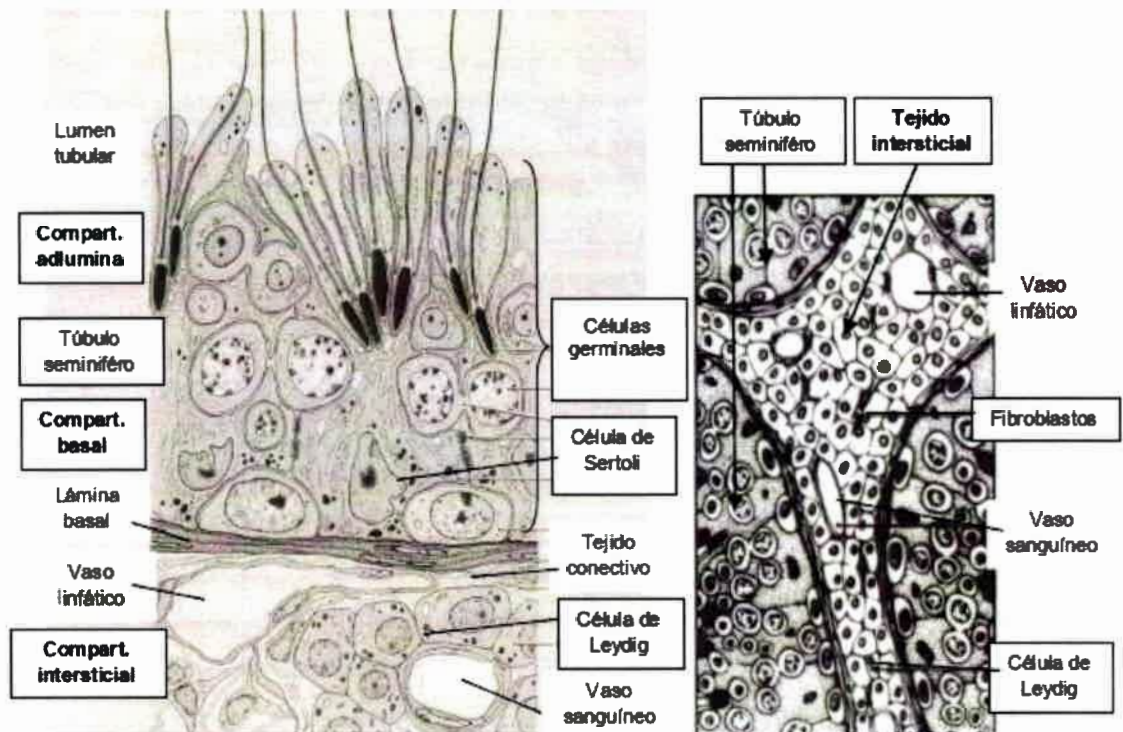
Los túbulos seminíferos son el lugar específico donde ocurre la espermatogénesis; están compuestos por las células germinales, que darán origen a los espermatozoides, y las células de sostén, denominadas **células de Sertoli**. El tejido intersticial está compuesto por las **células de Leydig**, los vasos linfáticos, los vasos sanguíneos y los nervios, y constituyen el sitio de irrigación e inervación del testículo y en el que ocurre la esteroidogénesis (Senger, 2012). Los túbulos seminíferos están rodeados por la lámina basal, los fibroblastos y las células mioideas. Las células de Sertoli se unen mediante enlaces de alta complejidad dando lugar a la barrera hemato-testicular, que divide el epitelio seminífero en dos regiones, la región basal y la región adluminal (Amann, 2011a; **Figura 13**).

Dentro de las células germinales, las **espermatogonias** son las células más inmaduras de la línea germinal y se ubican en contacto con la membrana basal. Éstas corresponden a células pequeñas, ovoides o esféricas y con núcleos de grado variable de condensación. Los **espermatoцитos primarios** son generados por la mitosis de las espermatogonias; son más voluminosos que las espermatogonias y se encuentran en una capa más interna de la región basal, sin tomar contacto con la lámina basal. Los **espermatoцитos secundarios** son células de menor tamaño que los espermatoцитos primarios y se encuentran ubicados más hacia la luz del túbulo seminífero. Rara vez son observadas en preparados histológicos debido a su rápida meiosis y dan lugar a células haploides denominadas espermátidas. Las **espermátidas redondas** son células con núcleos esféricos y pálidos que se encuentran en estadios tempranos de la meiosis; estas células

se encuentran ubicadas en la región adluminal del epitelio seminífero tomando contacto con la luz del túbulo. Las **espermátidas alargadas** son células con núcleos pequeños, alargados y oscuros y presentan colas largas que se proyectan a la luz del túbulo seminífero. Las espermátidas alargadas que finalizan el proceso de diferenciación celular y son liberadas al lumen tubular se denominan **espermatozoides**. Las células germinales se distribuyen en distintas combinaciones en el túbulo seminífero y en los segmentos del túbulo seminífero, observando diferentes estadios de espermatogénesis a lo largo del túbulo seminífero (Jiménez y Ruibal, 2004; **Figura I3**).

Las **células de Sertoli** se encuentran en menor número que las células germinales y son las encargadas de regular la espermatogénesis (Amann, 2011a; Senger, 2012). Estas células se caracterizan por presentar núcleos pálidos, ovoides o triangulares y nucléolos prominentes. El citoplasma se extiende desde la membrana basal hasta la región luminal del túbulo seminífero. La membrana plasmática de los bordes laterales y apicales de estas células se invaginan, en forma de cavidades para alojar a las células germinales, tomando estrecho contacto con éstas últimas (Jiménez y Ruibal, 2004; **Figura I3**).

Las **células de Leydig** son células con núcleo esférico y citoplasma acidófilo (Jiménez y Ruibal, 2004) y son las responsables de la producción de esteroides (testosterona y estrógenos) (Senger, 2012). El testículo equino produce grandes cantidades de esteroides debido al elevado número de células de Leydig presentes en el tejido intersticial (Fawcett et al, 1973). Los esteroides testiculares son utilizados por las células de Sertoli durante la espermatogénesis. Las concentraciones de esteroides que no son utilizadas por el testículo son liberadas a la circulación sistémica para contribuir a otras funciones reproductivas como el desarrollo de las características sexuales secundarias y el comportamiento sexual (Johnson y Neaves, 1981; Johnson et al, 1991a; Johnson et al, 1991b; Johnson et al, 1994; **Figura I3**).



**Figura 13.** Ilustración de los componentes del parénquima testicular equino. Componentes del tubo seminífero y tejido intersticial (panel izquierdo) y mayor aumento de la composición celular del tejido intersticial (panel derecho). Fuente: Amann RP, 2011a.

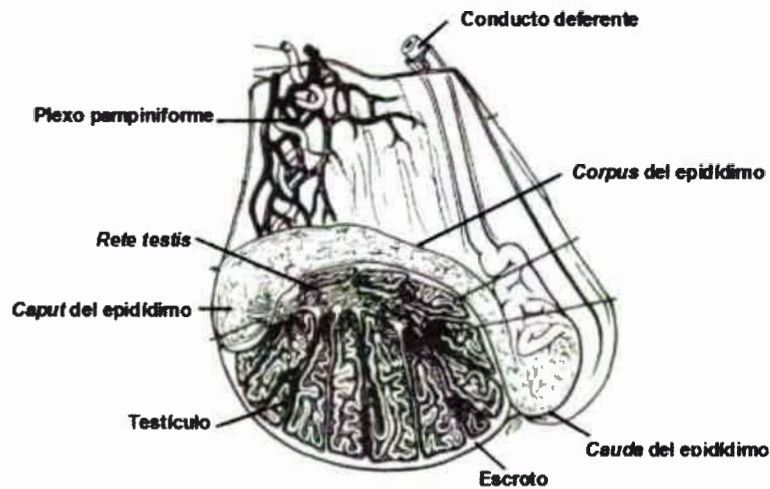
Los espermatozoides abandonan el testículo a través de los conductos eferentes hacia el epidídimo, donde serán madurados y almacenados hasta su eyaculación (Amann, 2011a; Senger, 2012).

### 3. El epidídimo equino

El epidídimo es un conducto largo, tortuoso y enrollado que comunica los conductos eferentes con el conducto deferente (Amann, 2011a; Senger, 2012). Se encuentra adherido firmemente al testículo mediante el tejido conectivo, razón por la cual recibe su nombre del griego “unido al testículo” (Robaire e Hinton, 2015). En el equino, el epidídimo se localiza en la región dorsomedial del testículo y su diámetro varía de 70 a 500  $\mu\text{m}$ , mide 80 m de largo (Amann, 2011b), y pesa entre 20 y 50 g en animales adultos (Nishikawa, 1955).

Desde el punto de vista anatómico y funcional, el epidídimo de los mamíferos está compuesto por cuatro segmentos: segmento inicial, *caput* (cabeza), *corpus* (cuerpo) y *cauda* (cola) en orden desde el testículo (Benoit, 1926; Abe et al, 1984). Sin embargo, a pesar de que el segmento inicial se ha reportado en varios mamíferos como el humano, rata, ratón, perro, toro, carnero, entre otros, en el equino, este segmento aún no ha sido descrito (Jiménez y Ruibal, 2004; Amann, 2011a; Senger, 2012).

En el padrillo, el segmento *caput* es flácido con forma de “J” y se encuentra unido firmemente al testículo. El segmento *corpus* es una estructura cilíndrica débilmente unida a la superficie dorsal del testículo. El segmento *cauda* es largo, bulboso y débilmente unido al polo caudal del testículo (Amann, 2011a; **Figura 14**).



**Figura 14.** Ilustración esquemática de la vista lateral del epidídimo equino. Fuente: Amann RP., 2011a.

La principal función del epidídimo es la “**maduración espermática**”, donde los espermatozoides inmaduros producidos por el testículo, que son inmóviles e incapaces de fecundar ovocitos, son transformados en espermatozoides maduros con capacidad de moverse progresivamente (Senger, 2012; Robaire e Hinton, 2015). El epidídimo además participa en otras funciones como transporte, concentración, protección y almacenamiento de los espermatozoides. Bajo condiciones normales, la adquisición de estas funciones es completada en la región proximal del *cauda* del epidídimo. La mayoría de los aspectos de la función del epidídimo no han sido estudiados en el padrillo, no obstante, son posibles de homologar según los estudios realizados en otras especies mamíferas (Amann, 2011b).

En los mamíferos, cada segmento del epidídimo está organizado en lóbulos separados por septos de tejido conectivo, donde cada lóbulo posee una función y expresión génica y proteica diferente (Herrera-Luna et al, 2015). Cada segmento del epidídimo posee un microambiente luminal específico altamente especializado generado por la secreción y absorción activa a través del lumen epididimario y de la barrera hemato-epididimaria. En cada segmento epididimario el espermatozoide además puede interactuar de forma bioquímica y fisiológica con este tejido, y consecuentemente, desarrollar funciones críticas y diferentes en cada segmento (Turner et al, 2007). De esta forma, la reabsorción de los fluidos secretados por el testículo ocurre en el segmento proximal del epidídimo,



y el desarrollo de la capacidad fecundante, adquisición de movimiento progresivo y el almacenamiento espermático, ocurren en los segmentos distales del epidídimo (Amann, 2011a; Senger, 2012).

En la mayoría de los mamíferos, los espermatozoides del segmento *caput* son infértiles y su recién capacidad fértil es adquirida durante su paso por el segmento *corpus*. Así, los principales cambios asociados a la maduración espermática en el epidídimo de mamíferos ocurren principalmente en el segmento *corpus*. Las modificaciones espermáticas asociadas a la adquisición de capacidad fecundante son múltiples y ocurren a nivel de: 1) acrosoma: adquisición de receptores específicos para el reconocimiento de la *zona pellucida* y unión al ovocito, modificando la tasa de fecundación de ovocitos de un 4% en el segmento *caput* a un 88% en el segmento *cauda*; 2) núcleo: estabilización de la cromatina mediante puentes disulfuro, previniendo la descondensación de ésta necesaria para la formación de los pronúcleos en el cigoto; 3) membrana plasmática: reorganización molecular de la arquitectura lipídica y proteica induciendo nuevas propiedades antigénicas de la membrana, y 4) flagelo: estabilización estructural de las fibras densas mediante puentes disulfuro para una mayor rigidez de la cola en el movimiento progresivo. Probablemente el cambio espermático más evidente a través del lumen del epidídimo es el desarrollo de motilidad progresiva. Los espermatozoides del segmento *caput* presentan solo un 3% de motilidad progresiva en comparación con los espermatozoides del segmento *cauda* que presentan 60% de motilidad progresiva en medios de cultivo apropiados. Estos cambios permiten potenciar el movimiento flagelar, la habilidad de reconocer, unirse y penetrar al ovocito y la resistencia espermática, necesarios para el almacenaje de éstos en el epidídimo, el transporte al sitio de la fecundación, así como la fecundación (Aman, 2011b; Robaire e Hinton, 2015).

Algunos estudios señalan que los cambios espermáticos que ocurren en el epidídimo no solo son fundamentales para la fecundación sino también para el inicio del desarrollo embrionario (Amann, 2011b). De esta forma, cuando los espermatozoides del *corpus* de carneros son utilizados para fecundar ovocitos de ovejas *in vitro*, el clivaje se ve afectado y el desarrollo embrionario no ocurre, sugiriendo que los espermatozoides deben finalizar su tránsito por el epidídimo para adquirir la capacidad fecundante. En consecuencia, espermatozoides presentes en la región distal del segmento *caput* presentan  $\leq 1\%$  en la habilidad de fecundación *in vitro* del ovocito, mientras que en la región proximal y distal del segmento *cauda* y del eyaculado los espermatozoides presentan  $\geq 50\%$ ,  $\geq 75\%$  y 75-100% de habilidad de fecundación, variando según la especie (Orgebin-Crist, 1967; Kimura y Yanagimachi, 1995).

El segmento *cauda* epididimario es el sitio de reservorio espermático previo a la eyacuación, almacenando un contenido espermático sobre 5000 millones de espermatozoides por mL (Nishikawa, 1955), suficiente para más de 10 eyacuaciones correspondien-

te al 61-67% del total de los espermatozoides presentes en el epidídimo (Naden et al, 1990; Amann, 2011b). En este segmento, los espermatozoides finalizan su maduración y pueden permanecer por varias semanas sin afectar su fertilidad. El mantenimiento de la viabilidad espermática es posible debido a mecanismos involucrados en la estabilización de la membrana plasmática y la remoción de la gota citoplasmática (Robaire e Hinton, 2015). La ausencia de motilidad en el segmento *cauda* se debe al bajo pH, escaso oxígeno disponible, baja temperatura y proteínas que inhiben la motilidad espermática como la inmovilina presente en roedores. La capacidad de almacenamiento disminuye distalmente y los espermatozoides del conducto deferente sólo pueden permanecer fértiles por algunos días. Esto se debe que en la región distal de los conductos extragonadales existe reabsorción y fagocitosis de espermatozoides (Carr et al, 1985).

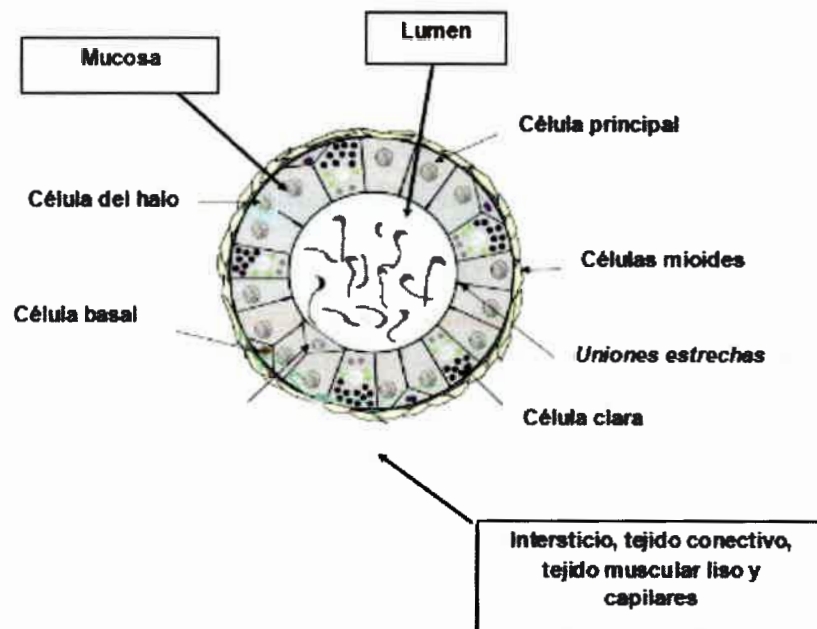
Debido a que los espermatozoides son inmóviles previo a la eyaculación, el transporte de éstos a través del epidídimo depende de contracciones rítmicas peristálticas de la musculatura lisa circular que rodea el epidídimo, la cual es más intensa en el segmento *cauda* debido al mayor desarrollo muscular a este nivel (Amann, 2011b). Esto se debe a las características tisulares propias de cada segmento epididimario. De este modo, estudios realizados en mamíferos como la rata cortapasto, el canguro y el murciélago, han evidenciado que el grosor de la musculatura lisa y el diámetro del epidídimo aumenta mientras que el grosor de su epitelio disminuye en su recorrido desde el segmento *caput* hacia el segmento *cauda*, favoreciendo la funcionalidad propia de cada segmento (Adebayo y Olurode, 2010; Danmaigoro et al, 2014; Khamas et al 2014).

Todos los procesos que se desarrollan en el epidídimo están regulados principalmente por la expresión de genes dependientes de andrógenos. El epidídimo recibe andrógenos testiculares a través de vasos sanguíneos y linfáticos que comunican el testículo con el epidídimo (Amann, 2011b). Las concentraciones de andrógenos en el epidídimo son 5 a 50 veces más elevadas que en la sangre, y pueden estar libres, conjugados (sulfatos), o dependiendo de la especie, unidos a proteínas ligadoras de andrógenos (ABP). En el segmento *caput*, los andrógenos provienen del fluido testicular y pueden ejercer su acción como molécula libre o unida a ABP, a diferencia del *corpus* y el *cauda*, donde los andrógenos provienen del torrente sanguíneo y ejercen su acción como molécula libre. Además de los andrógenos, existen otras moléculas que poseen roles regulatorios específicos en el epidídimo, como los estrógenos, retinoides y factores de origen testicular como factores de crecimiento (Robaire e Hinton, 2015).

En términos histológicos, el epidídimo está compuesto por el lumen, la mucosa y el intersticio. La **mucosa** está compuesta por el epitelio y la lámina basal. El epitelio del epidídimo consiste en una capa simple de células cilíndricas pseudoestratificadas con esterocilias. Las células epiteliales están en contacto directo con la lámina basal y participan activamente en la maduración espermática. La lámina basal está rodeada por el

**intersticio** que contiene el tejido conectivo laxo, fibroblastos, células musculares lisas, una red capilar y fibras nerviosas. Las células musculares lisas forman una capa delgada a nivel del segmento *caput* y *corpus*, y una capa gruesa a nivel del segmento *cauda* epididimario. En el epidídimo equino, el epitelio del segmento *cauda* del epidídimo se pliega formando proyecciones hacia el lumen tubular de forma similar a las vellosidades (Benoit, 1926; Jiménez y Ruibal, 2004; Hedger, 2015).

En la mayoría de especies existen tres tipos celulares descritos en el epitelio del epidídimo de la mayoría de especies: 1) **células principales**, 2) **células basales**, y 3) **células de halo** o linfocitos intraepiteliales (Jiménez y Ruibal, 2004; Hedger, 2015). Estas células regulan la secreción, absorción y transporte de iones, moléculas orgánicas pequeñas, proteínas y glicoproteínas. Sin embargo, el perfil proteico del fluido luminal varía a lo largo del epidídimo según la secreción de polipéptidos de cada segmento de acuerdo a la funcionalidad y actividad propia del epitelio epididimal. De esta forma, para que los espermatozoides alcancen una adecuada maduración deben pasar por todos los segmentos del epidídimo (Turner et al, 2007; **Figura 15**).



**Figura 15.** Representación esquemática del epitelio del epidídimo. Fuente: Hedger MP., 2015.

Las **células principales** son las células más abundantes del epitelio (85%) y corresponden a células columnares altas con largos esterocilios en el borde apical, un elaborado aparato de Golgi y numerosas vesículas, cuerpos densos y mitocondrias necesarias para las funciones de absorción y secreción propias del epidídimo (Jiménez y Ruibal, 2004). Estas células son muy activas y su función es la reabsorción pasiva de iones mediante bomba sodio-cloro dependiente de agua, reabsorción activa de iones sodio y cloro y la secreción de macromoléculas importantes para la maduración espermática.

Además estas células poseen la capacidad de incorporar andrógenos provenientes del lumen del epidídimo y de la circulación sistémica (Holland y Orgebin-Crist, 1988; Turner et al, 2007, Xu et al, 2010).

Las **células basales** corresponden a células redondas u ovoides que se encuentran entre las células principales en contacto directo con la lámina basal. Años atrás se las consideraban únicamente células precursoras de las células principales (Jiménez y Ruibal, 2004). Sin embargo, revisiones realizadas en la actualidad han reportado la relación de estas células con procesos de inmunidad y secreción de diversas moléculas (Robaire e Hinton, 2015).

Las **células del halo** están encargadas de mantener el pH del fluido luminal mediante la secreción de iones de hidrógeno, y se ha postulado que también estarían involucradas en la endocitosis de espermatozoides degenerados y macromoléculas (Robaire e Hinton, 2015).

#### 4. La pubertad en el equino

El término "**pubertad**" ha sido difícil de definir en la mayoría de las especies animales, incluyendo al equino. La pubertad es un proceso dinámico que permite la generación de la descendencia. Se caracteriza por la maduración de los órganos reproductivos y genitales externos, desencadenado por la liberación de la hormona hipotalámica "Hormona Liberadora de Gonadotropinas" (GnRH, siglas en inglés de "Gonadotropin Releasing Hormone") y la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadal (Heninger, 2011).

En términos histológicos, la pubertad en el macho comienza con el inicio a la espermatogénesis y la diferenciación de las células de Sertoli en el testículo (Heninger, 2011). Los machos equinos adquieren la pubertad entre los 11,5 y 24 meses de edad según inicio de la espermatogénesis, peso y tamaño testicular, presencia de espermatozoides en el *cauda* del epidídimo y en el eyaculado, y pigmentación del parénquima testicular, entre otras propiedades (Skinner y Bowen, 1968; Naden et al, 1990; Clemmons et al, 1995). En términos prácticos, en el padrillo la pubertad inicia con la aparición de los primeros espermatozoides en el eyaculado (Skinner y Bowen, 1968) y/o con el primer eyaculado que contenga  $\geq 15$  millones de espermatozoides con  $\geq 10\%$  de motilidad (Naden et al, 1990).

El inicio de la pubertad puede variar según la raza, la nutrición, la fecha de nacimiento, la época del año y los criterios utilizados para definir la pubertad (Skinner y Bowen, 1968; Naden et al, 1990; Heninger, 2011). Asimismo, los factores de jerarquía, la libido, las restricciones ambientales, el contacto con el ser humano y las anomalías anatómicas pueden influir en la expresión de la pubertad, dificultando su identificación (Heninger,

2011). Entre los factores involucrados en este evento, se ha establecido que el tamaño y peso testicular pueden ser utilizados como herramientas útiles para determinar la pubertad en el equino. Se ha observado que estos parámetros pueden identificar pubertad con mayor exactitud que la propia edad del animal, debido a la directa correlación entre el tamaño y peso testicular y el desarrollo de los túbulos seminíferos, y en consecuencia, con la producción diaria de espermatozoides (Nishikawa, 1955; Blanchard et al, 2001).

#### *4.1 Etapas de la pubertad en el equino*

Según Heninger (2011), la pubertad en el equino se divide en cuatro etapas:

- Etapa 1: desarrollo embrionario de los órganos sexuales masculinos. Esta etapa involucra los eventos que ocurren desde el estado embrionario hasta el nacimiento.
- Etapa 2: desarrollo y crecimiento del potrillo (quietud reproductiva). Esta etapa involucra los eventos que ocurren desde el nacimiento hasta los 9 a 10 meses de edad.
- Etapa 3: eventos iniciales del desarrollo reproductivo (espermarquia, función endocrina, libido). Esta etapa se inicia la pubertad como tal y corresponde a los eventos que ocurren desde los 12-13 meses hasta los 24-26 meses de edad.
- Etapa 4: maduración sexual y eficiencia reproductiva (espermatogénesis y comportamiento sexual). Esta etapa involucra los eventos postpuberales que ocurren desde los 18 a 24 meses hasta los 4 a 5 años de edad.

Esta clasificación está basada principalmente en el desarrollo puberal testicular del padrillo y no involucra el desarrollo puberal del epidídimo. La información del desarrollo puberal del epidídimo será añadida de forma adicional, según la información reportada por Nishikawa en el año 1955.

##### *4.1.1 Etapa 1: desarrollo embrionario de los órganos sexuales masculinos*

Durante esta etapa, las células primordiales migran para colonizar el anillo genital de las gónadas fetales indiferenciadas y las células primordiales se dividen y diferencian en gonocitos permitiendo a su vez la diferenciación de éstos en las células de Sertoli y células de Leydig (Heninger, 2011). Al nacimiento, el testículo pesa entre 5 y 15 g, similar al peso durante el estadio fetal (Bouin y Ancel, 1905; Nishikawa, 1955), y solo presenta células de soporte indiferenciadas (células de Sertoli tempranas), gonocitos (espermatogonias tempranas) y células intersticiales (células de Leydig indiferenciadas, macrófagos gigantes, fibroblastos y células mioides). En las etapas embrionaria y fetal

la mayor parte del testículo está compuesto por células intersticiales (Johnson y Neaves, 1981; Clemmons et al, 1995).

#### *4.1.2 Etapa 2: desarrollo y crecimiento del potrillo (quietud reproductiva)*

Durante este periodo se prioriza el desarrollo y crecimiento biológico del potrillo. La actividad testicular se encuentra relativamente detenida (quiescencia gonadal) debido a la limitada secreción de gonadotrofinas y baja esteroidogénesis (Naden et al, 1990; Heninger, 2011), y por ende, el peso testicular se mantiene relativamente constante desde el nacimiento hasta los 9 a 10 meses de edad, alcanzando los 20 a 30 g de peso (Bouin y Ancel, 1905; Nishikawa, 1955).

Al nacimiento, el epidídimo posee forma esférica y se encuentra unido principalmente a la región dorso-craneal del testículo. Después del nacimiento, el epidídimo se alarga gradualmente hacia la región dorso-caudal del testículo debido al acortamiento del ligamento de la cola del epidídimo. Durante este periodo el epidídimo pesa entre 1,5 a 12 g y mide entre 5 a 12 cm de largo. El contenido del epidídimo es acuoso semi-transparente y no presenta espermatozoides (Nishikawa, 1955).

#### *4.1.3 Etapa 3: Eventos iniciales del desarrollo reproductivo (espermarquia, función endocrina, libido)*

Durante este periodo se inicia la producción de las primeras espermatogonias a partir de la división de los gonocitos, diferenciación de las células de soporte a células de Sertoli, formación del lumen de los túbulos seminíferos y barrera hemato-testicular (Heninger, 2011), y disminución del número de células de Leydig y macrófagos fetales por reemplazo de éstas por células germinales (Clemmons et al, 1995).

Entre los 10 y 12 meses de edad, el testículo alcanza los 30 a 40 g de peso (Bouin y Ancel, 1905). A partir de los 12-13 meses de edad, el peso testicular aumenta gradualmente a 50 a 90 g debido al inicio de la pubertad e incremento del desarrollo testicular (Nishikawa, 1955). Entre los 2 a 3 años de edad cuando se alcanza la pubertad, el testículo equino pesa entre 110 y 190 g (Johnson y Neaves, 1981; Johnson y Thompson, 1983; Johnson et al, 1991a; Johnson et al, 1991b; Johnson et al, 1994; Heninger, 2011).

##### *4.1.3.1 Inicio de la función endocrina reproductiva*

La liberación de GnRH por parte del hipotálamo da inicio a los primeros cambios endocrinos en la pubertad (Senger, 2012). El aumento de la secreción y liberación de

GnRH aumenta a su vez la frecuencia y amplitud de los pulsos de las gonadotropinas (LH y FSH), sin aumento en las concentraciones plasmáticas basales de testosterona. Las concentraciones de testosterona son detectables por primera vez a los 8 meses de edad y se mantienen en niveles basales hasta los 18 a 20 meses de vida, donde aumentan dramáticamente (Naden et al, 1990). La liberación gonadotropinas y esteroides son necesarias para el desarrollo y maduración de los tejidos reproductivos e influyen en la función testicular y epididimaria (Herrera-Luna, et al 2015). Las elevadas concentraciones de LH sin aumento de las concentraciones de testosterona, sugiere un rol en el desarrollo reproductivo temprano previo a la pubertad, como por ejemplo, la maduración de las células de Leydig y en el aumento de las concentraciones de FSH, facilitando la iniciación de la espermatogénesis (Naden et al, 1990). Se ha sugerido que las gonadotropinas participan mediante mecanismos autocrinos y paracrinos, y están asociados a cambios en la expresión génica en la iniciación del desarrollo testicular durante la pubertad debido a la cercanía de los sitios de iniciación de la espermatogénesis a las zonas vasculares en el parénquima testicular (Heninger, 2011).

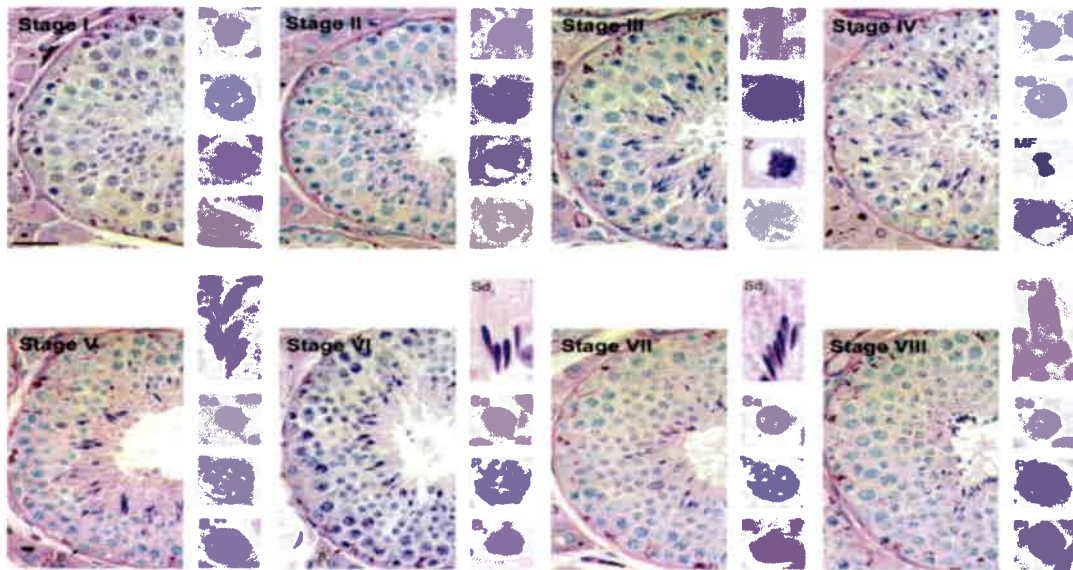
Además se ha evidenciado que durante la pubertad, no solo existe liberación de las hormonas reproductivas, si no que también, existe una modificación en la expresión de los receptores de estas hormonas reproductivas en el testículo y epidídimo equino (Herrera-Luna et al, 2015).

#### *4.1.3.2 Inicio de la espermatogénesis*

En la espermatogénesis del padriño existen ocho etapas (I a VIII) y seis tipos de células germinales (espermatogonias, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios, espermátidas redondas, espermátidas elongadas y espermatozoides). Las etapas más tempranas presentan células germinales más inmaduras y están ubicadas próximas a la membrana basal, mientras que las etapas más avanzadas presentan células germinales más diferenciadas que se encuentran ubicadas próximas al lumen tubular (Heninger, 2005).

En el padriño, la espermatogénesis se inicia entre los 12 y 18 meses de edad con la diferenciación de espermatogonias a espermatocitos, correspondiente a la "etapa I". El proceso de la gametogénesis finaliza entre los 24 a 36 meses de edad con la diferenciación completa de la línea de células germinales y la normalización de la función epitelial germinal, correspondiente a la "etapa VIII" (Bouin y Ancel, 1905; Naden et al, 1990; Heninger, 2005; Heninger, 2011; Moustafa et al, 2015; **Figura I6**). A los 13 meses de edad, aparecen los primeros espermatozoides en el eyaculado (Skinner y Bowen, 1968), que constituyen espermatozoides provenientes del 3% de los túbulos seminíferos. A medida que avanza la pubertad, aumenta la espermatogénesis y con ello el número de esperma-

tozoides en el eyaculado, encontrándose a los 23 meses de edad, el 86% de los túbulos seminíferos con espermatozoides (Nishikawa, 1955).



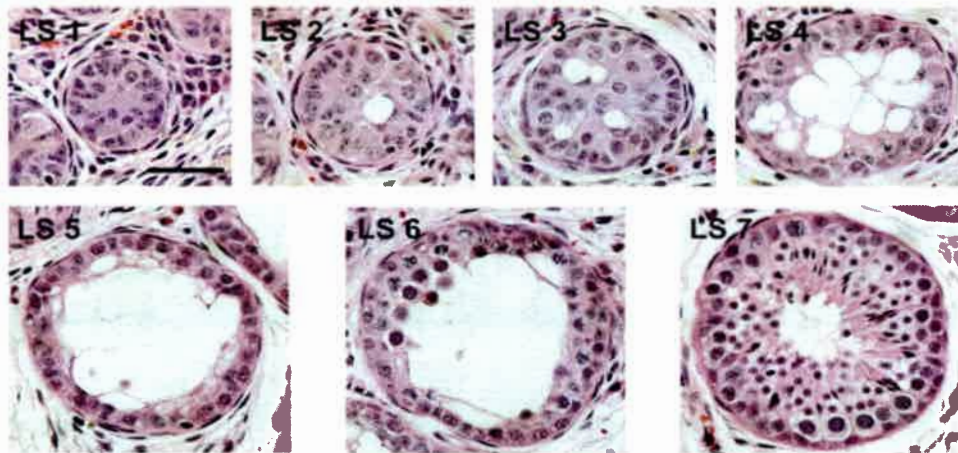
**Figura 16.** Etapas del epitelio seminífero equino y los tipos de células germinales. Etapas del epitelio seminífero del I a VII. A y B: espermatogonias, P1: espermatocitos primarios, P: espermatocitos en paquiteno, L: espermatocitos en leptoteno, Z: espermatocitos en zigoteno, SS: espermatocitos secundarios, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, Sa y Sb: espermátidas redondas, Sc y Sd: espermátidas elongadas, Sz: espermatozoides maduros, MF: figuras meióticas, Rb: cuerpos residuales. Fuente: Heninger NL., 2005.

#### 4.1.3.3 Formación del lumen de los tubulos seminíferos

Entre los 9 a 14 meses de edad se inicia la formación del lumen de los túbulos seminíferos (Clemmons et al, 1995) y finaliza a los 18 meses de edad (Moustafa et al, 2015). Esto ocurre debido a la secreción unidireccional de fluido por las células de Sertoli durante la formación de la barrera hemato-testicular, generando pequeñas vacuolas en el lumen de los túbulos seminíferos, que finalmente formarán los ductos que transportarán a los espermatozoides maduros desde estos túbulos hacia el epidídimo (Heninger, 2005; Heninger, 2011).

Existe una puntuación del lumen tubular durante el inicio de la espermatogénesis en padrillos realizada por Heninger, (2005), quién desarrolló una clasificación en relación al epitelio seminífero con siete etapas (LS-1 a LS-7; **Figura 17**). Los testículos de equinos prepuberales se encuentran en la etapa LS-1 (sin vacuolas intraluminales), los testículos de equinos puberales se encuentran entre la etapa LS-2 y LS-6 (lumen tubular en formación), y los testículos de equinos postpuberales se encuentran en etapa LS-7 (formación del lumen tubular completa).





**Figura 17.** Clasificación del epitelio seminífero equino durante la iniciación de la espermatogénesis basado en el puntaje del lumen tubular (LS 1 a 7). Escala 40µm. Fuente: Heninger NL., 2005.

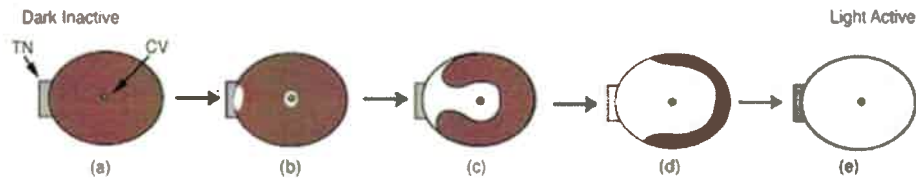
#### 4.1.3.4 Diferenciación de las células de Sertoli y formación de la barrera hemato-testicular

La barrera hemato-testicular está formada por uniones estrechas entre las células de Sertoli diferenciadas que permiten el aislamiento inmunológico de los compartimentos testiculares donde ocurre la espermatogénesis. Durante la pubertad las células de Sertoli se diferencian y maduran generando cambios vasculares importantes que aumentan la permeabilidad celular y el flujo sanguíneo desde el compartimento vascular al compartimento intersticial del testículo, favoreciendo el inicio de la espermatogénesis, formación de la barrera hemato-testicular coincide con la completa formación del lumen tubular mientras que el inicio de la diferenciación de las células germinales precede la formación de esta barrera (Heninger, 2005).

#### 4.1.3.5 Modificación de la pigmentación del parénquima testicular y disminución del número de células intersticiales (células de Leydig y macrófagos)

En los équidos la iniciación de la espermatogénesis y la formación del lumen de los túbulos seminíferos sigue un patrón regional desde el centro hacia la periferia del parénquima testicular. Hasta la fecha, el equino es el único mamífero en el cual se ha descrito este patrón de desarrollo testicular y fue observado por primera vez el año 1905 por Bouin y Ancel. Este patrón se genera simultáneamente desde dos sectores diferentes: 1) desde la región central del testículo alrededor de la vena central y mediastino, y 2) desde el polo dorsal del testículo próximo al epidídimo. El desarrollo de estos eventos avanza hacia caudal generando periféricamente un anillo en forma de "herradura de caballo" (Heninger, 2011; **Figura 18**). Este patrón sugiere que debe existir algún mecanismo de control local y paracrino en los túbulos seminíferos para la iniciación de

la espermatogénesis (Clemmons et al, 1995), probablemente, de origen sanguíneo por la proximidad de los sitios de iniciación de la espermatogénesis a vasos sanguíneos (Fawcett et al, 1973; Heninger, 2005; Heninger, 2011).



**Figure 18.** Representación esquemática del desarrollo de la pigmentación del parénquima testicular. Corte transversal. TN: localización del epidídimo y polo dorsal del testículo, CV: vena central del testículo. El tamaño testicular aumenta desde 8 g a 50 g desde (a) a (e), respectivamente. Fuente: Heninger NL., 2011.

Desde la vida fetal a los 12-18 meses de edad, el parénquima testicular de equinos es de coloración oscura debido al elevado número de macrófagos gigantes (que contienen gránulos de lipofucsina, células pigmentadas) y células de Leydig fetales en el intersticio testicular. Con el inicio de la pubertad, las células de Leydig fetales y macrófagos fetales son reemplazados por células germinales, aumenta la densidad de los túbulos seminíferos y se forma el lumen tubular, observando un parénquima testicular cada vez más claro. Así, desde 12-18 meses hasta los 23 meses de edad, el color del parénquima testicular es mixto y, por ende, difícil de clasificar. A los 24 meses de edad se alcanza la pubertad y la pigmentación del parénquima testicular es completamente clara debido a la completación de la espermatogénesis y finalización del desarrollo de los túbulos seminíferos y lumen tubular (Bouin y Ancel, 1905; Clemmons et al, 1995; Heninger, 2005; Heninger, 2011).

Posterior a la pubertad (2 a 3 años de edad) la coloración del parénquima testicular se oscurece gradualmente con la edad debido al aumento del número y tamaño de gránulos de lipofucsina en las células de Leydig. Los testículos de animales adultos (4 a 5 años de edad) y, aún más los equinos de edad avanzada (13 a 20 años de edad), presentan mayor número y volumen de células de Leydig por testículo que los animales púberes (Johnson y Neaves, 1981), alcanzando entre el 20 y 60% del volumen testicular en animales adultos (Fawcett et al, 1973). De este modo, si bien existe una asociación entre actividad testicular y pigmentación del parénquima testicular (Clemmons et al, 1995), la pigmentación oscura del parénquima testicular no necesariamente indica inactividad testicular (Johnson y Neaves, 1981).

#### 4.1.3.6 Cambios puberales asociados al epidídimo

Con el inicio de la pubertad aparecen los primeros espermatozoides en el lumen del *cauda* del epidídimo. A los 13 meses de edad, cuando se inicia la pubertad, el *cauda*

del epidídimo contiene 157 millones de espermatozoides por mL donde el 50% de éstos poseen anomalías morfológicas, mientras que a los 23 meses de edad, cuando finaliza la pubertad, el *cauda* del epidídimo contiene 4527 millones de espermatozoides por mL, donde solo el 20-30% de éstos poseen anomalías morfológicas. Así, el contenido del epidídimo al inicio de la pubertad es de coloración blanco levemente lechoso y al finalizar la pubertad es color blanco amarillento, debido a la elevada concentración espermática (Nishikawa, 1955).

La presencia de espermatozoides en el epidídimo incrementa el calibre del lumen del epidídimo y altura de las células epiteliales, lo que incrementa el peso y tamaño del epidídimo. Así, al inicio de la pubertad el epidídimo pesa entre 11 y 16 gramos y mide 12 a 13 cm de largo, y al completar la pubertad, alcanza los 19 y 22 gramos de peso y mide 15 cm de largo. El epidídimo en animales adultos puede alcanzar hasta 50 gramos de peso. Cabe destacar, que el peso del epidídimo aumenta gradualmente desde el nacimiento hasta el inicio de la pubertad, una vez iniciada la pubertad, el peso del epidídimo es muy variable y no sigue un patrón determinado (Nishikawa, 1955).

#### *4.1.4 Etapa 4: maduración sexual y eficiencia reproductiva (espermatogénesis y comportamiento sexual)*

Esta etapa corresponde a los eventos postpuberales que ocurren durante la adquisición de la madurez sexual y máxima capacidad reproductiva (Johnson y Neaves, 1981; Johnson y Thompson, 1983; Johnson et al, 1994; Naden et al, 1990; Heninger, 2011).

Es importante destacar que el concepto de "*pubertad*" es diferente al concepto de "*madurez sexual*" o también denominada "*adultez*". La "*pubertad*" corresponde a un evento temprano que ocurre entre los 11,5 y 24 meses de edad, mientras que la "*madurez sexual*" corresponde a un evento postpuberal que ocurre entre los 4 y 5 años de edad (Johnson y Thompson, 1983; Naden et al, 1990; Johnson et al, 1991b; Johnson et al, 1994; Heninger, 2011).

El aumento del tamaño y peso testicular son las características reproductivas más evidentes una vez alcanzada la pubertad, y aumenta significativamente con la edad. Entre los 2 a 3 años de edad, el testículo equino pesa entre 110 y 190 g y sigue aumentando gradualmente hasta los 4 a 5 años de edad llegando a los 270 g de peso. Equinos adultos de edades entre 6 a 20 años pueden presentar testículos de 280 a 400 g de peso (Johnson y Neaves, 1981; Johnson y Thompson, 1983; Johnson et al, 1994; Heninger, 2011). El tamaño y peso testicular son muy variables en cada padrillo debido a que, están influenciados por diversos factores como la raza, el peso vivo, la edad, la estacionalidad, entre otros (Johnson y Neaves, 1981; Johnson y Thompson, 1983;

Johnson et al, 1991a; Johnson et al, 1991b; Johnson et al, 1994; Clemmons et al, 1995; Heninger, 2011).

Los equinos de edad avanzada (>13 años de edad) poseen testículos de mayor peso que equinos adultos (4-5 años de edad), y éstos últimos a su vez poseen testículos más pesados que equinos púberes. Este incremento se debe a: 1) el aumento en el número y volumen de las células de Leydig que reemplazan los componentes intersticiales del testículo, 2) aumento del diámetro y tamaño de los túbulos seminíferos, 3) aumento del número y tipo de las células germinales, 4) aumento en el número de células de Sertoli, y 5) aumento de las concentraciones plasmáticas de FSH, LH y testosterona (Johnson y Neaves, 1981; Johnson y Thompson, 1983; Johnson et al, 1991a; Johnson et al, 1994; Clemmons et al, 1995). El volumen de las células de Leydig y el tamaño de los túbulos seminíferos continúan aumentando hasta edades avanzadas (20 años) (Johnson y Neaves, 1981) mientras que el número de células germinales y de células de Sertoli sólo aumenta hasta alcanzar la madurez sexual (4 a 5 años) (Johnson y Thompson, 1983; Johnson et al, 1991a; Johnson et al, 1994).

En el caso del epidídimo, el cambio más evidente después de la pubertad es el aumento de la concentración espermática del *cauda* del epidídimo, observando que el *cauda* de epidídimos de padrillos de 2 años de edad contienen 4900 millones de espermatozoides por mL y el *cauda* de epidídimos de padrillos mayores de 4 años de edad contienen sobre 6000 millones de espermatozoides por mL. El largo y el peso del epidídimo se mantiene constante después de la pubertad (Nishikawa, 1955).

A pesar de la importancia directa del testículo y del epidídimo en la fertilidad, los estudios sobre los cambios puberales de estos órganos son limitados en el equino. Hasta la fecha existen pocos trabajos relacionados a los cambios puberales del testículo y epidídimo equino, donde la mayoría están enfocados al testículo más que al epidídimo equino (Bouin y Ancel, 1905; Nishikawa, 1955; Skinner y Bowen, 1968; Naden et al, 1990; Blanchard et al, 2001; Heninger, 2005). Sumado a lo anterior, la mayoría de los artículos científicos relacionados a las características testiculares y epididimales en la especie equina han sido realizados en animales postpuberales mayores a 2 años de edad (Johnson y Neaves, 1981; Johnson y Thompson, 1983; Johnson et al, 1991a; Johnson et al, 1991b; Johnson et al, 1994; Clemmons et al, 1995).

La evaluación detallada de los órganos reproductivos es de gran importancia para comprender la biología reproductiva del padrillo alrededor de la pubertad y para identificar parámetros sensibles y precisos que permitan evaluar el estadio puberal. Definir las características puberales del testículo y epidídimo equino permitirá establecer la capacidad reproductiva del animal, optimizar los protocolos reproductivos, mejorar los manejos reproductivos en sistemas de reproducción asistida e identificar alteraciones reproductivas que comprometan la fertilidad del padrillo.

El objetivo de este estudio fue realizar un análisis sistemático y detallado del testículo y epidídimo equino en tejidos peripuberales y postpuberales para determinar un conjunto de características macroscópicas y microscópicas en ambos grupos de estudio. Algunas de las evaluaciones histológicas fueron extendidas a tejidos de testículo y epidídimo de equinos prepuberales. Los resultados de este estudio contribuirán a la comprensión de los cambios macroscópicos y microscópicos que ocurren en la gónada masculina y en el epidídimo durante la pubertad.

## **II. HIPÓTESIS**

- Existen diferencias anatómicas e histológicas en el testículo y epidídimo entre equinos peripuberales y postpuberales.

### III. OBJETIVOS

#### Objetivo general

- Determinar y comparar las características macroscópicas y microscópicas de testículos y epidídimos peripuberales y postpuberales.

#### Objetivos específicos

- Determinar las características anatómicas y morfométricas de testículos y epidídimos peripuberales y postpuberales.
- Determinar las características histológicas e histomorfométricas de testículos y epidídimos peripuberales y postpuberales.
- Comparar las características macroscópicas y microscópicas de testículos y epidídimos peripuberales y postpuberales.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales

#### 1.1 Reactivos de laboratorio

Todos los reactivos de laboratorio utilizados para la realización de los estudios presentados fueron de la marca Sigma Chemical Co (St. Louis, MI, Estados Unidos).

#### 1.2 Tejidos

Se obtuvieron un total de 77 testículos y epidídimos equinos adquiridos a partir de un matadero comercial para equinos en la ciudad de Río Cuarto, Córdoba, Argentina, durante enero y febrero de 2015. Los tejidos fueron recolectados inmediatamente post-faena y colocados en cajas refrigeradas con hielo. Luego de ser lavados con agua destilada para eliminar el exceso de sangre, fueron envueltos individualmente en bolsas plásticas transparentes y se mantuvieron en cajas de refrigeración hasta su evaluación y procesamiento. La evaluación de los tejidos se realizó dentro de las primeras 5 horas post-faena.

Los testículos y epidídimos equinos obtenidos fueron clasificados en tejidos provenientes de animales peripuberales y postpuberales según los valores testiculares de peso, tamaño y volumen establecidos para equinos por Johnson y Thompson (1983), Love et al (1990), Clemmons et al (1995) y Mendes (2012), debido a que se desconocía la edad de los animales faenados, se consideraron muestras provenientes de animales peripuberales (n=18) aquellos tejidos en los cuales el testículo presentó entre 26 y 70 g de peso, <8 cm de largo, <4,5 de ancho, <5 cm de alto y <100 mL de volumen. Por su parte, se consideraron muestras provenientes de animales postpuberales (n=55) aquellos tejidos en los cuales el testículo presentó >70 g de peso, ≥8 cm de largo, ≥4,5 cm de ancho, ≥5 cm de alto y ≥100 mL de volumen (**Tabla M1**). Además se obtuvieron 4 tejidos prepuberales los cuales fueron utilizados como referencia histológica. Como complemento, se utilizó el criterio de presencia de espermatozoides en el *cauda* del epidídimo para diferenciar cortes de tejidos peripuberales o postpuberales de tejidos prepuberales, según lo descrito por Nishikawa (1955). En caso que no se cumplieran todos los criterios establecidos, predominaron las variables de peso y volumen testicular como criterio para la decisión de clasificación.



**Tabla M1.** Criterios establecidos para clasificar el estadio puberal de los tejidos.

Grupos	n	Peso testicular (g)	Tamaño testicular (cm)			Volumen testicular (cm <sup>3</sup> )
			Largo	Ancho	Alto	
<b>Peripuberales</b>	18	26 - 70	<8	<4,5	<5	<100
<b>Postpuberales</b>	55	>70	≥8	≥ 4,5	≥5	≥100

Adaptado de Johnson y Thompson (1983), Love et al (1990), Clemmons et al (1995) y Mendes (2012).

Se realizó la disección de la cubierta externa remanente del testículo, túnica vaginal, tejido conectivo, plexo pampiniforme y músculo cremaster. El epidídimo fue removido del testículo para eliminar el tejido conectivo, cápsula y conducto deferente. Se tomaron muestras de 1 cm<sup>3</sup> de tejido testicular y epididimario para evaluar la histología. En el caso del testículo se obtuvieron tres muestras de la región central del testículo. En el caso del epidídimo se obtuvieron tres muestras por segmento: *caput*, *corpus*, y *cauda*. Se obtuvieron además muestras de tejido del "segmento inicial", si bien la asignación de este tejido no pudo ser constatada como certera en todos los casos, dada la ausencia de límites anatómicos definidos de la misma. Las muestras obtenidas fueron almacenadas en solución de formol buffer al 10% a temperatura ambiente, respetando la relación de volumen de tejido a formol de 1:20.

## 2. Métodos

### 2.1. Evaluación macroscópica

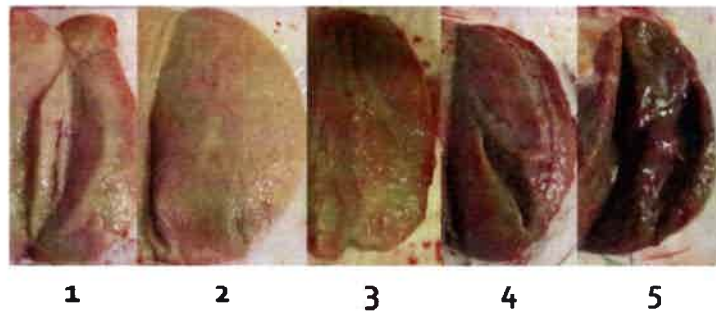
#### 2.1.1 Evaluación anatómica

En todos los tejidos evaluados, se realizó una breve descripción anatómica de las características del testículo y los segmentos del epidídimo (segmento inicial, *caput*, *corpus* y *cauda*). Se determinó la pigmentación del parénquima testicular según el sistema de puntuación establecido por Johnson y Neaves (1981) para testículo equino, siendo 1 pigmentación clara y 5 pigmentación muy oscura (**Tabla M2, Figura M1**).

**Tabla M2.** Puntuación según pigmentación del parénquima testicular.

Puntuación	Pigmentación del parénquima testicular
1	Claro
2	Medio claro
3	Medio oscuro
4	Oscuro
5	Muy oscuro

Clasificación establecida por Johnson y Neaves (1981).



**Figura M1.** Imágenes representativas de la puntuación según pigmentación del parénquima testicular.

### 2.1.2 Evaluación morfométrica

Se determinó el peso, tamaño y volumen de cada testículo y de su respectivo epidídimo. Conjuntamente, se calculó el tamaño y volumen individualmente para cada segmento del epidídimo. Se calculó la relación entre peso epididimal y testicular, y la razón entre tamaño epididimal y testicular. Para el cálculo de la relación entre tamaño epididimal y testicular se utilizó el volumen como medida de dimensión.

El peso (g) fue evaluado empleando una balanza digital (Acculab V-350). Las dimensiones de los tejidos fueron determinadas mediante una regla calibre. Se determinó el largo, ancho y alto (cm) de cada testículo y de cada segmento del epidídimo. El volumen (cm<sup>3</sup>) fue calculado según la forma geométrica del tejido. En el caso del testículo, el volumen fue calculado según la fórmula para equinos descrita por Love et al (1990) (Tabla M3).

**Tabla M3.** Fórmulas utilizadas para el cálculo de volumen de cada tejido según forma geométrica.

Tejido	Forma geométrica	Fórmula volumen
Testículo	Elipse	$0,5233 \cdot \text{largo} \cdot \text{ancho} \cdot \text{alto}^1$
Segmento inicial	Elipse	$\frac{4}{3}\pi \cdot (\text{largo}/2) \cdot (\text{ancho}/2) \cdot (\text{alto}/2)$
Caput del epidídimo	Elipse	$\frac{4}{3}\pi \cdot (\text{largo}/2) \cdot (\text{ancho}/2) \cdot (\text{alto}/2)$
Corpus del epidídimo	Cilindro	$\pi \cdot r^2 \cdot h$
Cauda del epidídimo	Esfera	$\frac{4}{3}\pi \cdot r^3$

<sup>1</sup>Love et al (1990).

### 2.2 Evaluación microscópica

De las 77 muestras de testículos y epidídimos equinos obtenidos, nueve fueron seleccionadas de forma dirigida para los estudios de histología. Se seleccionaron tres epidídimos correspondientes a los testículos de menor peso y tamaño (n=3, tejidos prepube-

rales), tres epidídimos correspondientes a los testículos de peso entre 26 y 70 g (n=3, tejidos prepuberales) y tres epidídimos correspondientes a los testículos de mayor peso y tamaño (n=3, tejidos postpuberales). Éstos fueron diseccionados en cuatro cortes separando e identificando sus cuatro segmentos (segmento inicial, *caput*, *corpus* y *cauda*).

Los cortes de epidídimo fueron fijados para histología en solución de formol buffer al 10%, deshidratados en alcoholes ascendentes, aclarados en xilol e impregnados en parafina. A partir de los tejidos incluidos, se obtuvieron cortes de 4,5  $\mu\text{m}$  de grosor, los cuales fueron montados en portaobjetos y teñidos con hematoxilina-eosina (H/E). La visualización y medición de los diferentes parámetros en los cortes histológicos fueron realizados bajo microscopio de campo claro (Nikon Eclipse E800) a diferentes aumentos (objetivos a 2X y a 60X de magnificación y ocular de 10X) mediante el programa de procesamiento de imagen digital "ImageJ". Las imágenes histológicas fueron capturadas mediante el programa Nikon ACT-2U.

### 2.2.1 Evaluación histológica

Se realizó una breve descripción histológica del testículo y los segmentos del epidídimo (segmento inicial, *caput*, *corpus* y *cauda*) según se detalla a continuación:

### 2.2.2 Evaluación histomorfométrica

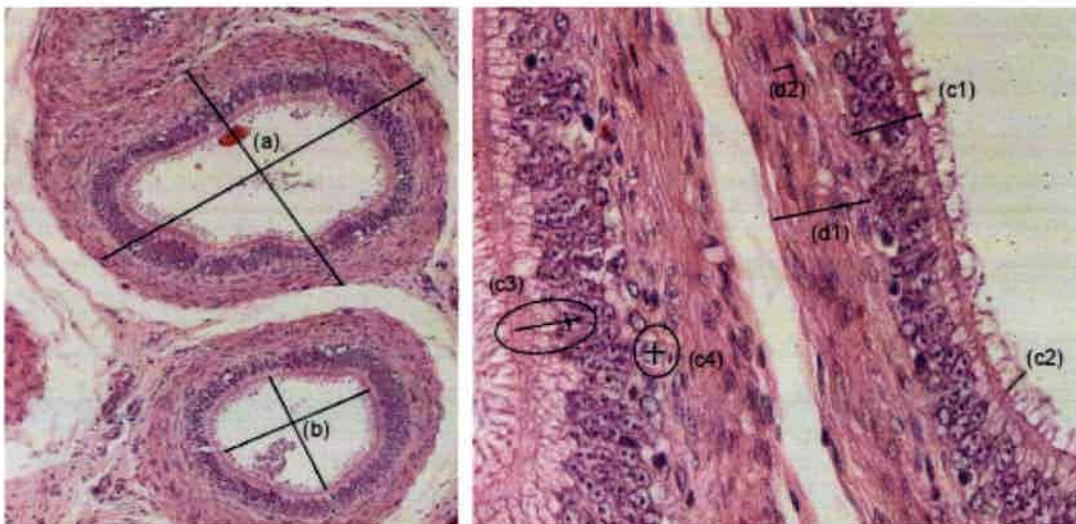
Se realizaron las siguientes mediciones: a) diámetro del conducto; b) dimensiones del lumen (diámetro, área, perímetro); c) dimensiones del epitelio (altura, largo de los esterocilios, y diámetro de las células principales y basales; y d) dimensiones del tejido muscular (grosor y el número de capas celulares).

Las mismas fueron calculadas según se indica a continuación:

- a. El diámetro del conducto corresponde al promedio de dos mediciones trazadas perpendicularmente en duplicado para cada corte.
- b. El diámetro del lumen corresponde al promedio de dos mediciones trazadas perpendicularmente en duplicado desde la zona apical del epitelio sin considerar los esterocilios.
- c. El área y perímetro del lumen fueron calculados a partir de la fórmula establecida por el programa "ImageJ" según forma del tejido medido.
- d. La altura del epitelio corresponde a la altura desde la membrana basal hasta la zona apical de la mucosa sin considerar los esterocilios.

- e. El largo de los esterocilios corresponde a la medición desde la zona apical hasta el extremo superior de cada esterocilio en particular.
- f. El diámetro de las células principales y basales corresponde al promedio de dos mediciones trazadas perpendicularmente en duplicado.
- g. El grosor del tejido muscular corresponde a la medición desde la última capa muscular hasta la membrana basal.
- h. El número de capas celulares corresponde al conteo de cada línea celular alrededor del conducto.

Todos los valores obtenidos corresponden al promedio de un mínimo de 10 mediciones por corte por muestra (**Figura M2**).



**Figura M2.** Medidas realizadas para la evaluación histomorfométrica. Sección histológica de *corpus* epididimario teñido con Hematoxilina-Eosina (100X y 600X). (a) diámetro del conducto. (b) diámetro del lumen. (c) dimensiones del epitelio: (c1) altura, (c2) largo de los esterocilios, (c3) diámetro células principales, (c4) diámetro células basales. (d) dimensiones del tejido muscular: d1-grosor; d2-número de capas celulares.

### 3. Análisis estadístico

Los datos fueron almacenados y tabulados en una planilla Excel® (Microsoft Office 2010®) y analizados mediante el programa estadístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Se realizó análisis descriptivo de los datos de las variables estudiadas y se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para datos cuantitativos de distribución simétrica se utilizó media y desviación estándar (DE) y para datos cuantitativos de distribución no simétrica se utilizó mediana y rango intercuartil (Q3-Q1).

Para determinar las diferencias en el peso testicular, el peso epididimario, el volumen testicular, las dimensiones testiculares y las dimensiones epididimarias entre tejidos peripuberales y postpuberales se utilizó el test "t" de Student.

Para determinar las diferencias en la razón entre peso epidídimo/testículo, la razón entre volumen epidídimo/testículo, el volumen epididimario, las dimensiones del conducto, las dimensiones del lumen, las dimensiones del epitelio y las dimensiones del tejido muscular entre tejidos peripuberales y postpuberales se utilizó el test de Mann-Whitney.

Para determinar las diferencias en la pigmentación del parénquima testicular entre tejidos peripuberales y postpuberales se utilizó el test de Chi-cuadrado.

Para determinar las diferencias entre el peso testicular y el peso epididimario categorizados según peso testicular entre tejidos peripuberales y postpuberales se utilizó el test de ANOVA de una vía y el test de Tukey para comparaciones múltiples.

Para determinar las diferencias entre la razón peso epidídimo/testículo, categorizados según peso testicular entre tejidos peripuberales y postpuberales y las comparaciones entre los segmentos del epidídimo, se utilizó el test de Kruskall Wallis y el test de Dunn para comparaciones múltiples.

Para determinar la correlación entre el peso testicular y epididimario se utilizó el test de correlación de Pearson, donde  $r > 0,7$  indicó correlación fuerte,  $r = 0,3$  a  $0,7$  correlación moderada y  $r < 0,3$  correlación débil.

Para determinar la correlación entre el peso testicular y la razón peso epidídimo/testículo, y entre el peso epididimario y la razón peso epidídimo/testículo se utilizó el test de correlación de Spearman, donde  $r > 0,7$  indicó correlación fuerte,  $r = 0,3$  a  $0,7$  correlación moderada y  $r < 0,3$  correlación débil.

Se determinó un nivel de confianza del 95% considerándose diferencia estadísticamente significativa un valor  $p < 0,05$ .

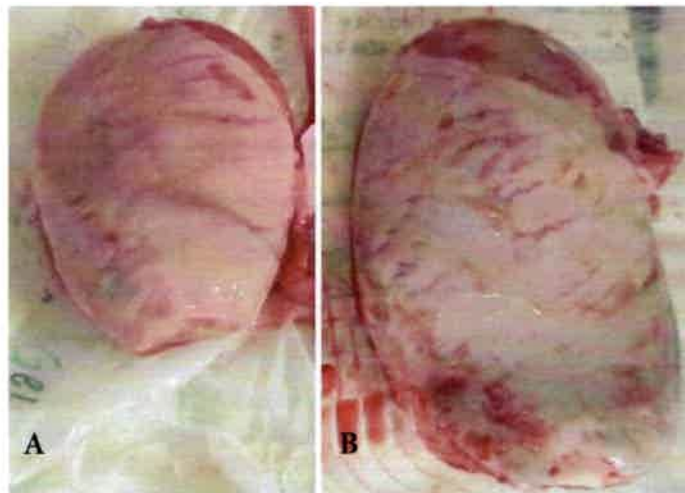
## V. RESULTADOS

### 1. Evaluación macroscópica

#### 1.1 Descripción y evaluación anatómica

##### 1.1.1 Hallazgos en el testículo

La observación directa de los testículos postpuberales reveló que eran más planos lateralmente y de mayor tamaño, peso y consistencia que los testículos peripuberales. De forma similar, el grosor de la túnica albugínea y túnica vaginal visceral fue mayor en los testículos postpuberales. Los vasos sanguíneos de los testículos postpuberales se observaron con mayor desarrollo, grado de ramificación y calibre, y menor tortuosidad que los vasos sanguíneos de los testículos prepuberales (**Figura R1**).



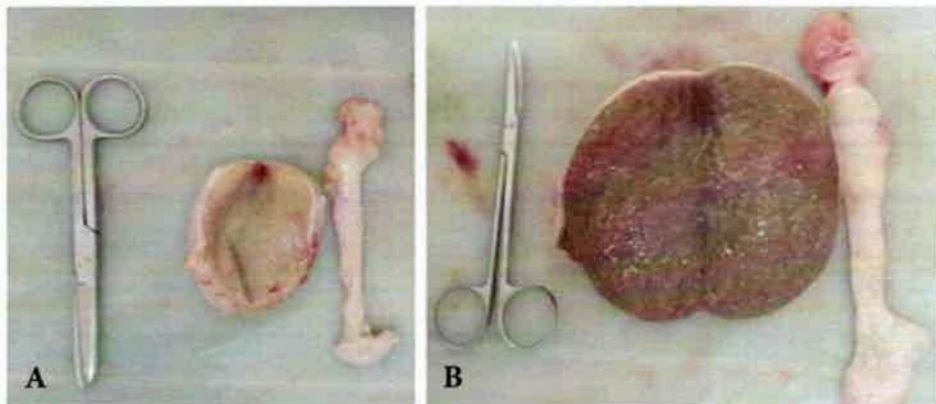
**Figura R1.** Imágenes representativas registradas de testículo peripuberal (A) y postpuberal (B). Las imágenes fueron capturadas a la misma distancia.

Según los criterios descritos en Materiales y Métodos, los testículos postpuberales presentaron una pigmentación del parénquima testicular más oscura mientras que los testículos peripuberales presentaron pigmentación del parénquima testicular más clara ( $p < 0,0001$ ). Como resultado de este análisis se estimó que el 78% de los testículos postpuberales presentaron un parénquima de pigmentación oscura (puntaje 3, 4 o 5), mientras que el 89% de los testículos peripuberales presentaron un parénquima de pigmentación clara (puntaje 1 o 2). Los 2 testículos peripuberales con pigmentación oscura (11%) correspondieron a testículos de 38,6 y 39,7 g de peso testicular y parénquimas testiculares con puntajes de pigmentación 3 (medio oscuro). No se observaron testículos peripuberales con parénquimas de pigmentación oscura o muy oscura (puntaje 4 o 5; **Tabla R1, Figura R2**).

**Tabla R1.** Determinación del puntaje de pigmentación del parénquima de testículos peripuberales y postpuberales.

Puntaje de pigmentación del parénquima testicular	Coloración parénquima testicular	Testículos			
		Peripuberales		Postpuberales	
		n	%	n	%
1 o 2 (Claro)	Claro o medio claro	16	89	12	22*
3, 4 o 5 (Oscuro)	Medio oscuro, oscuro o muy oscuro	2	11	43	78*
Total		18		55	

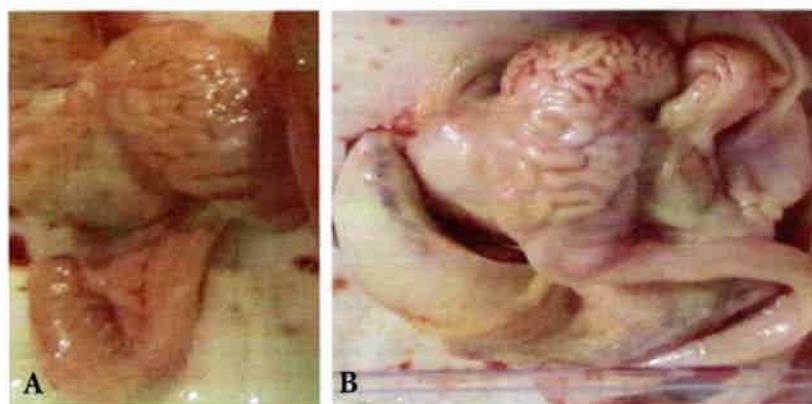
\*Diferencias estadísticamente significativas entre columnas ( $p < 0,05$ ).



**Figura R2.** Imágenes representativas de la pigmentación del parénquima de testículos peripuberales (A) y postpuberales (B). A: puntaje de pigmentación 2. B: puntaje de pigmentación 5. Las imágenes fueron capturadas a la misma distancia.

### 1.1.2 Hallazgos en el epidídimo

Tanto en los epidídimos peripuberales como los postpuberales los segmentos *caput*, *corpus* y *cauda* fueron fácilmente distinguibles. Por el contrario, el "segmento inicial" no fue distinguible a simple vista, por lo que para su análisis se asumió que el mismo correspondía a la región inicial del epidídimo. La observación directa de los tejidos reveló que los epidídimos postpuberales presentaron mayor tamaño, consistencia y conductos de mayor calibre y tortuosidad que epidídimos peripuberales. La cápsula y serosa de la túnica vaginal de los epidídimos postpuberales se observaron de mayor grosor que la de los epidídimos peripuberales (**Figura R3**).



**Figura R3.** Imágenes representativas de epidídimo peripuberal (A) y postpuberal (B). Las imágenes fueron capturadas a la misma distancia.

## 1.2 Evaluación morfométrica

### 1.2.1 Hallazgos en el peso

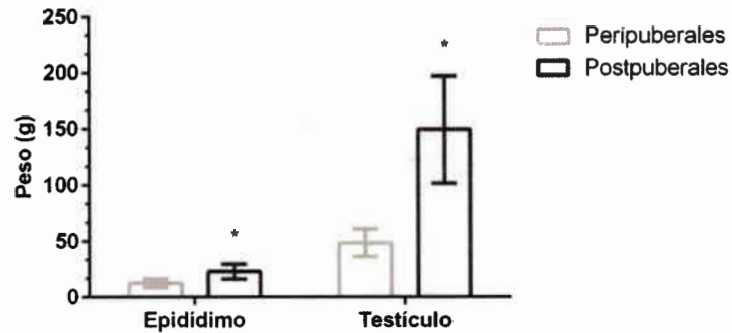
El valor promedio (y desvío estándar entre los valores) del peso tanto de los testículos como de los epidídimos postpuberales fue mayor que el peso de testículos y epidídimos peripuberales ( $p < 0,0001$ ). El valor promedio (y desvío entre los valores) del peso de los testículos peripuberales y postpuberales fue  $48,45 \pm 12,25$  g y  $149,47 \pm 47,67$  g, respectivamente. Por su parte, el valor promedio (y desvío estándar entre los valores) de los pesos de los epidídimos peripuberales y postpuberales fue  $12,56 \pm 3,60$  g y  $22,89 \pm 6,51$  g, respectivamente. La razón entre peso epididimal y testicular fue mayor en tejidos peripuberales ( $p < 0,0001$ ), determinándose que el peso del epidídimo representó el 24% del peso testicular en tejidos peripuberales y el 14% del peso testicular en tejidos postpuberales (**Tabla R2, Figura R4**).

**Tabla R2.** Peso testicular y epididimal y razón peso epidídimo/testículo de tejidos peripuberales y postpuberales.

Variables	Peripuberales	Postpuberales
<b>Peso testículo (g)</b> (media $\pm$ DE)	$48,45 \pm 12,25^a$	$149,47 \pm 47,67^b$
<b>Peso epidídimo (g)</b> (media $\pm$ DE)	$12,56 \pm 3,60^c$	$22,89 \pm 6,51^d$
<b>Razón peso epidídimo/testículo</b> (mediana (Q1-Q3))	0,24 (0,22-0,32) <sup>e</sup>	0,14 (0,12-0,20) <sup>f</sup>

DE= desviación estándar. Q1-Q3= rango entre cuartil 1 y cuartil 3. Diferentes superíndices entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).





**Figura R4.** Peso testicular y peso epididimario de tejidos peripuberales y postpuberales. Gráfico de barras expresado en media $\pm$ DE. DE= desviación estándar. Diferentes superíndices entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

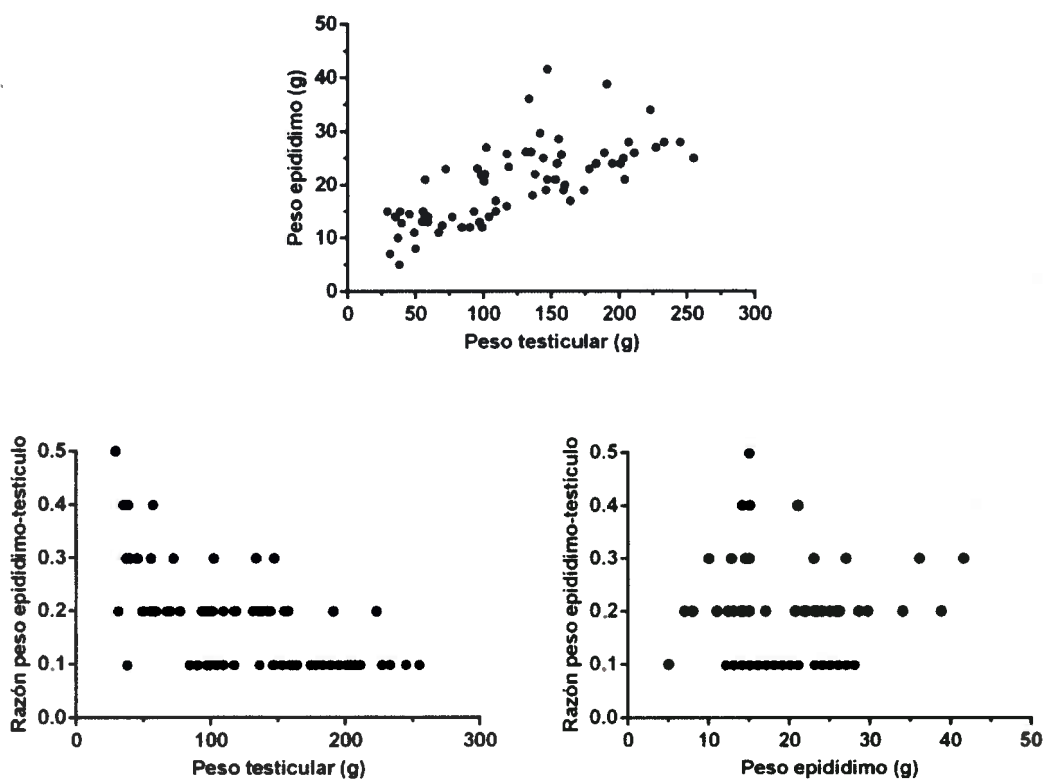
Se evidenció una correlación significativa y positiva entre el peso del epidídimo y el peso testicular ( $r=0,71$ ;  $p < 0,0001$ ; **Figura R5**). Se observó un aumento gradual en el peso del epidídimo hasta los 110-150 g de peso testicular, alcanzando el doble del peso que epidídimos de testículos de 26-50 g de peso. Sobre los 110 g de peso testicular el peso epididimario se mantiene constante. El epidídimo de mayor peso evaluado pesó 38 g y correspondía a un testículo de 255 g de peso (**Tabla R3, Figura R6**).

Por otra parte, se determinó que la razón entre el peso del epidídimo y del testículo se correlaciona negativamente con el peso testicular y epididimario. Sin embargo, la correlación entre la razón de los pesos de los tejidos reproductivos sólo fue significativa para el peso testicular (peso testicular:  $r=-0,62$ ;  $p < 0,0001$ ; peso epididimario:  $r=-0,05$ ;  $p=0,6591$ ; **Figura R5**). Entre los 26 y 50 g de peso testicular el peso del epidídimo corresponde al 30% del peso testicular, desde los 51 a 150 g de peso testicular el peso del epidídimo se mantiene constante y representa el 20% del peso testicular, y sobre los 150 g de peso testicular el peso del epidídimo representa el 10% del peso testicular (**Tabla R3, Figura R6**).

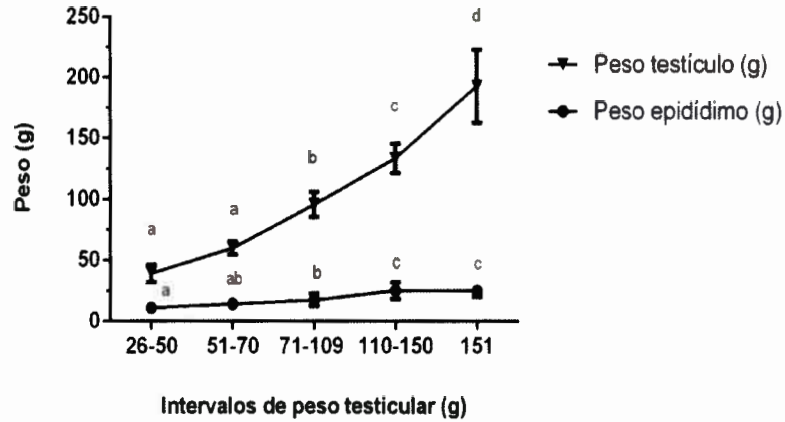
**Tabla R3.** Peso testicular, peso epididimario y relación peso epidídimo-testículo, según subgrupos establecidos por intervalos de peso testicular.

Intervalo peso testicular (n)	Peripuberales		Postpuberales		
	26-50 g (n=10)	51-70 g (n=8)	71-109 g (n=16)	110-150 g (n=14)	≥151 g (n=25)
<b>Peso testicular (g)</b> (media ± DE)	39,28 ± 7,06 <sup>a</sup>	59,91 ± 5,45 <sup>a</sup>	95,64 ± 10,37 <sup>b</sup>	133,4 ± 12,03 <sup>c</sup>	192,74 ± 30,38 <sup>d</sup>
<b>Peso epididimal (g)</b> (media ± DE)	11,24 ± 3,62 <sup>a</sup>	14,23 ± 3,00 <sup>ab</sup>	17,43 ± 4,99 <sup>b</sup>	25,30 ± 6,86 <sup>c</sup>	25,05 ± 4,86 <sup>c</sup>
<b>Razón peso epidídimo/testículo</b> (mediana (Q1-Q3))	0,30 <sup>a</sup> (0,20-0,40)	0,20 <sup>a</sup> (0,20-0,28)	0,20 <sup>ab</sup> (0,20-0,20)	0,20 <sup>ab</sup> (0,10-0,20)	0,10 <sup>b</sup> (0,10-0,10)

DE= desviación estándar. Q1-Q3= rango entre cuartil 1 y cuartil 3. Diferentes superíndices entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura R5.** Gráficas para el análisis de correlación de los valores de peso testicular y epididimario ( $r=0,71$ ;  $p < 0,0001$ ), razón peso epidídimo/testículo y peso testicular ( $r=-0,62$ ;  $p < 0,0001$ ), y razón peso epidídimo/testículo y peso epididimal ( $r=-0,05$ ;  $p=0,6591$ ).



**Figura R6.** Peso testicular y epididimario según subgrupos establecidos por intervalos de peso testicular. Gráfico de barras expresados en media $\pm$ DE. DE= desviación estándar. Diferentes superíndices entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## 1.2.2 Hallazgos en las dimensiones

### 1.2.2.1 Hallazgos en el tamaño

Los testículos postpuberales presentaron mayor longitud, ancho y altura que los testículos peripuberales ( $p < 0,0001$ ). El segmento *caput* de epidídimos postpuberales presentó mayor altura que epidídimos peripuberales ( $p = 0,0029$ ). El segmento *corpus* de epidídimos postpuberales presentó mayor longitud y ancho que epidídimos peripuberales ( $p = 0,0001$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente). De forma similar al testículo, los epidídimos postpuberales presentaron un segmento *cauda* de mayor longitud, altura y ancho que los epidídimos peripuberales ( $p = 0,0021$ ;  $p = 0,0020$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente). Tanto el tamaño testicular como el tamaño epididimario fue mayor en los tejidos postpuberales en comparación con los tejidos peripuberales ( $p < 0,0001$ ; **Tabla 4**).

**Tabla R4.** Tamaño testicular y epididimario de tejidos peripuberales y postpuberales.

Dimensiones (cm) (media±DE)		Peripuberales	Postpuberales
Testículo	Largo	6,49 ± 0,81 <sup>a</sup>	9,03 ± 1,09 <sup>b</sup>
	Ancho	4,19 ± 0,62 <sup>c</sup>	5,41 ± 0,68 <sup>d</sup>
	Alto	2,95 ± 0,77 <sup>e</sup>	4,13 ± 0,68 <sup>f</sup>
<b>Epidídimo</b>			
Caput	Largo	2,29 ± 0,48 <sup>g</sup>	2,52 ± 0,68 <sup>g</sup>
	Ancho	1,53 ± 0,39 <sup>h</sup>	1,73 ± 0,35 <sup>h</sup>
	Alto	0,52 ± 0,14 <sup>i</sup>	0,73 ± 0,38 <sup>i</sup>
Corpus	Largo	8,13 ± 2,63 <sup>k</sup>	11,03 ± 2,42 <sup>l</sup>
	Ancho	1,24 ± 0,28 <sup>m</sup>	0,92 ± 0,24 <sup>n</sup>
	Alto	0,42 ± 0,19 <sup>o</sup>	0,51 ± 0,25 <sup>o</sup>
Cauda	Largo	2,34 ± 0,44 <sup>p</sup>	2,79 ± 0,52 <sup>q</sup>
	Ancho	1,65 ± 0,37 <sup>r</sup>	1,99 ± 0,38 <sup>s</sup>
	Alto	0,85 ± 0,31 <sup>t</sup>	1,31 ± 0,36 <sup>u</sup>

DE= desviación estándar. Diferentes superíndices entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

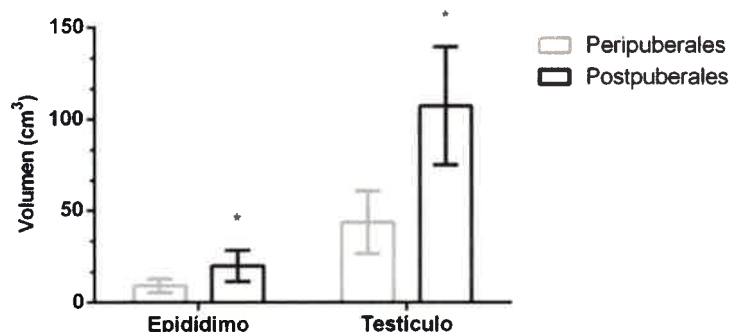
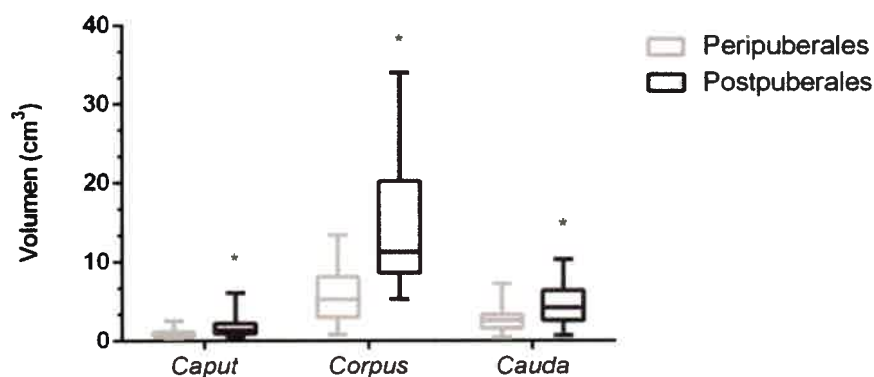
#### 1.2.2.2 Hallazgos en el volumen

Tanto el volumen testicular como el volumen epididimario fue mayor en los tejidos postpuberales respecto de los peripuberales ( $p < 0,0001$ ; **Tabla R5, Figura R7**). Los testículos peripuberales y postpuberales presentaron volúmenes de  $43,81 \pm 17,08 \text{ cm}^3$  y  $107,55 \pm 32,18 \text{ cm}^3$ , respectivamente. Por su parte, los epidídimos peripuberales y postpuberales presentaron volúmenes de  $9,25 \pm 3,72 \text{ cm}^3$  y  $19,99 \pm 8,45 \text{ cm}^3$ , respectivamente. Las diferencias observadas también fueron evidenciadas en el volumen del epidídimo cuando fue analizado por segmento. Así, el volumen del *caput*, *corpus* y *cauda* del epidídimo fue mayor en epidídimos postpuberales ( $p = 0,0216$ ;  $p < 0,0001$  y  $p = 0,0005$ , respectivamente; **Tabla R5, Figura R8**). La razón entre el volumen del epidídimo y del testículo fue similar entre tejidos peripuberales y postpuberales, donde el volumen del epidídimo representa el 21% del volumen testicular en tejidos peripuberales y el 18% del volumen testicular en tejidos postpuberales ( $p = 0,2453$ ; **Tabla R5**).

**Tabla R5.** Volumen testicular y epididimario de tejidos peripuberales y postpuberales de equino.

Volumen (cm <sup>3</sup> )	Peripuberales	Postpuberales
<b>Testículo</b> (media±DE)	43,81 ± 17,08 <sup>a</sup>	107,55 ± 32,18 <sup>b</sup>
<b>Epidídimo</b> (media±DE)	9,25 ± 3,72 <sup>c</sup>	19,99 ± 8,45 <sup>d</sup>
<b>Caput</b> (mediana (Q1-Q3))	0,82 (0,66-1,09) <sup>e</sup>	1,35 (0,96-2,15) <sup>f</sup>
<b>Corpus</b> (mediana (Q1-Q3))	5,29 (3,12-7,64) <sup>g</sup>	11,18 (8,67-19,67) <sup>h</sup>
<b>Cauda</b> (mediana (Q1-Q3))	2,58 (1,77-3,06) <sup>i</sup>	4,20 (2,70-6,19) <sup>j</sup>
<b>Razón volumen Epidídimo/testículo</b> (mediana (Q1-Q3))	0,21 (0,18-0,31) <sup>k</sup>	0,18 (0,13-0,27) <sup>k</sup>

DE= desviación estándar. Q1-Q3= rango entre cuartil 1 y cuartil 3. Diferentes superíndices entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Figura R7.** Volumen testicular y volumen epididimal de tejidos peripuberales y postpuberales. Gráfico de barras expresados en media±DE. DE= desviación estándar. \*Diferencias estadísticamente significativas entre barras ( $p < 0,05$ ).**Figura R8.** Volumen epididimario por segmento de tejidos peripuberales y postpuberales. Diagrama de cajas y bigotes (Box-Plot) expresados en mediana (Q1-Q3). Q1-Q3= rango entre cuartil 1 y cuartil 3. \*Diferencias estadísticamente significativas entre cajas ( $p < 0,05$ ).

## 2. Evaluación microscópica

### 2.1 Evaluación histológica

Los análisis presentados en esta sección incluyeron, además de la evaluación de los tejidos peripuberales y postpuberales, los cuatro tejidos colectados clasificados como prepuberales.

#### 2.1.1 Hallazgos en el testículo

Los testículos prepuberales (n=4) mostraron lóbulos y túbulos seminíferos con escaso desarrollo (**Figura R9 A1**) y presencia de un epitelio seminífero inactivo formado por una delgada capa de espermatogonias y células de Sertoli. La mayoría de los túbulos no presentaron vacuolas, sin embargo, en algunos de ellos se pudo observar la formación de pequeñas vacuolas en el centro indicando la formación inicial del lumen tubular. En el tejido intersticial se observaron algunas células de Leydig inactivas (**Figura R9 A2**).

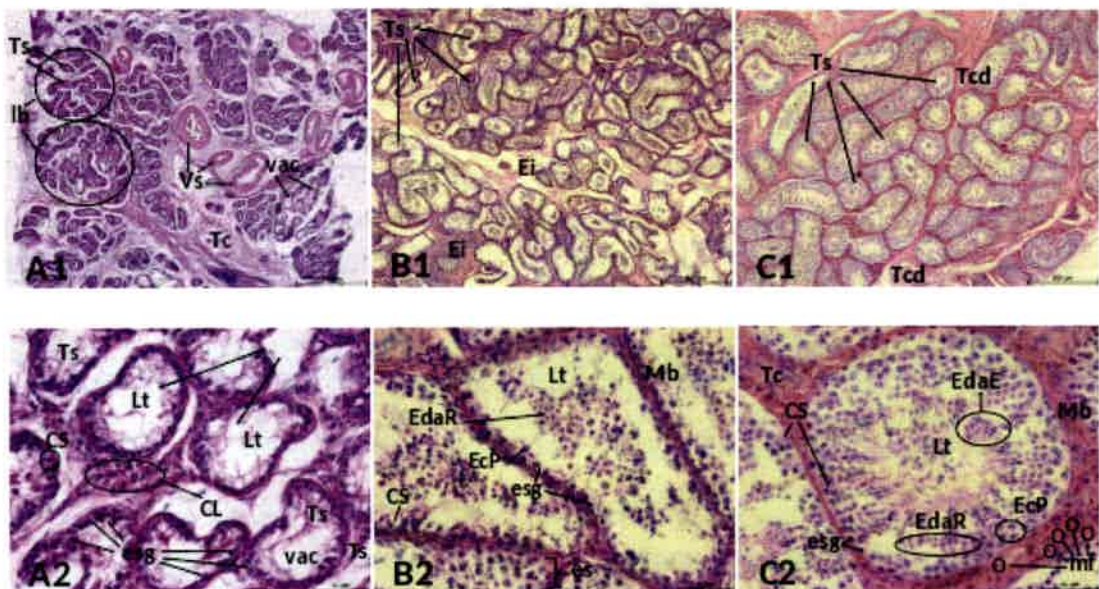
En los testículos peripuberales (n=18) el epitelio seminífero presentó un mayor desarrollo que los testículos prepuberales, observándose una serie germinal compuesta por espermatogonias, espermatocitos primarios y espermatidas redondas intercaladas (**Figura R9 B1**). En la base de los túbulos se hallaron células de Sertoli intercaladas entre las espermatogonias. Los túbulos presentaron lumen completamente formado. En el intersticio del tejido seminífero se observaron un mayor número de células de Leydig que en los testículos prepuberales y escaso número de macrófagos (**Figura R9 B2**).

En los testículos postpuberales (n=55) el epitelio seminífero presentó una serie germinal completa con diferentes etapas de proliferación celular (de I a VIII) y túbulos con lumen completamente formado (**Figura R9 C1**). Es así que se observaron espermatogonias, espermatocitos, espermatidas redondas y espermatidas elongadas. Una evidente envoltura de tejido conectivo denso rodea a los túbulos seminíferos, correspondiente al intersticio, en los cuales se hallaron numerosos macrófagos y un gran número de células de Leydig activas. Cabe destacar que en todos los cortes testiculares se observa gran número de vasos sanguíneos y escaso número de vasos linfáticos (**Figura R9 C2**).

Las espermatogonias se observaron sobre la membrana basal del túbulo como células pequeñas ovoides o esféricas con un núcleo de gran tamaño y densamente teñido. Los espermatocitos primarios se observaron distribuidos de manera dispersa hacia la luz del túbulo sin contacto con la membrana basal como células más voluminosas que las espermatogonias, con núcleo esférico de ubicación central en el citoplasma y citoplasma visible. Las espermatidas redondas se encontraron ubicadas en proximidad de la luz tubular como células de menor tamaño que los espermatocitos y con un núcleo pálido y

esférico y citoplasma visible. Las espermátidas elongadas correspondieron a las células de mayor proximidad a la luz tubular, con un núcleo alargado y oscuro, sin citoplasma visible y con largas colas proyectadas a la luz tubular. Las células de Sertoli se detectaron en el epitelio seminífero en contacto con las células germinales pero en menor número que estas últimas, se evidenciaron por su núcleo vesicular, irregular y pálido y un evidente nucléolo densamente teñido, y por la forma triangular del citoplasma de tinción moderada que se proyecta desde la membrana basal hacia la luz tubular. Las células de Leydig o intersticiales se observaron de forma redonda, núcleo esférico, laxo y desplazado y citoplasma acidófilo. Las características celulares descritas anteriormente en el testículo se muestran en la **Figura R9 C2**.

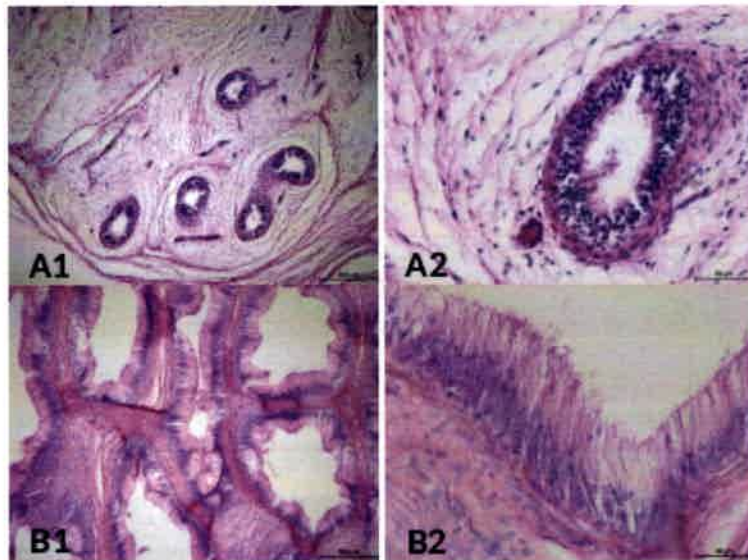
Las imágenes de la descripción histológica de los testículos equinos prepuberales (A), peripuberales (B) y postpuberales (C) se muestra en la **Figura R9**.



**Figura R9.** Cortes transversales de testículos equinos prepuberales (A), peripuberales (B) y postpuberales (C). Tinción H/E. Aumento 50x (1) y 400x (2). **A1:** lóbulos (**lb**) delimitados por tejido conectivo (**Tc**) muy vascularizado (**Vs**) en cuyo interior se alojan los túbulos seminíferos (**Ts**). En algunos de los túbulos se observa la formación de pequeñas vacuolas en el centro del túbulo. **A2:** en los túbulos seminíferos (**Ts**) se visualizan las primeras expresiones celulares del epitelio seminífero, principalmente espermatogonias (**esg**) entre las que se intercalan células de Sertoli (**CS**). Entre los túbulos seminíferos (**Ts**) se observan algunas células de Leydig inactivas (**CL**). En el centro de los túbulos seminíferos se puede apreciar la vacuolización del túbulo (**vac**) indicando la formación inicial del lumen tubular (**Lt**). **B1:** túbulos seminíferos (**Ts**) con desarrollo del epitelio seminífero, lo que conlleva a una disminución del espacio intertubular (**Ei**) y condensación de los septos. **B2:** en el epitelio seminífero (**Es**) se visualizan diferentes tipos de células germinales (espermatogonias (**esg**), espermatoцитos primarios (**EcP**) y espermátidas redondas (**EdaR**)) y de sostén (células de Sertoli (**CS**)). **C1:** túbulos seminíferos (**Ts**) con gran desarrollo del epitelio seminífero, una evidente envoltura de tejido conectivo denso (**Tcd**) rodea a los túbulos seminíferos. **C2:** túbulo seminífero con células germinales (espermatogonias (**esg**), espermatoцитos primarios (**EcP**) y espermátidas redondas (**EdaR**) y espermátidas elongadas (**EdaE**) y de sostén (células de Sertoli (**CS**)). En la envoltura conectiva peritubular (**Tc**) se observan numerosos macrófagos (**mf**) con pigmentación parda en su interior y células de Leydig activas (**CL**).

### 2.1.2 Hallazgos en el epidídimo

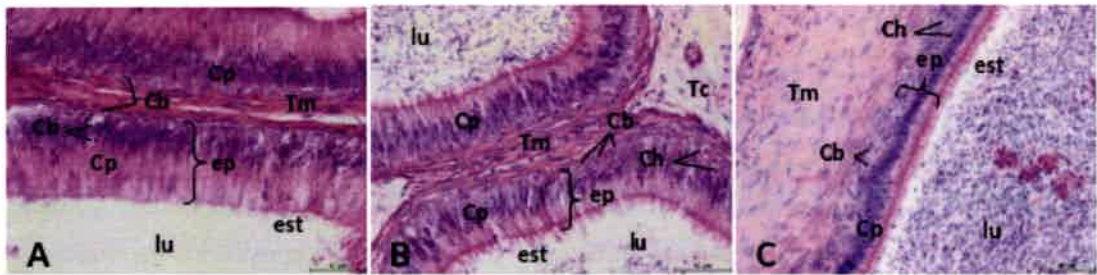
El análisis histológico realizado en los epidídimos prepuberales, peripuberales y postpuberales reveló que las muestras de tejido asignadas como "segmento inicial" obtenidas a partir de la región más proximal del epidídimo correspondían según la morfología histológica al conducto eferente o *caput* del epidídimo, por lo que no fueron analizadas en detalle como los demás segmentos epididimarios (**Figura R10**).



**Figura R10.** Cortes transversales de epidídimo equino peripuberal. "Segmento inicial" correspondiente a conducto eferente (A) o *caput* (B) del epidídimo equino. Tinción H/E. Aumento 100x (1) y 400x (2).

Todas las muestras de epidídimo evaluadas presentaron epitelio cilíndrico pseudoestratificado con estereocilios. Se observaron 3 tipos celulares en el epitelio epididimario: células principales, basales y del halo. Las **células principales** fueron las células más abundantes del epitelio y se observaron como células cilíndricas, núcleo ovalado dispuestas sobre la membrana basal y un citoplasma que compone la mayor parte de la célula, que se extiende hacia la luz ductal. La región apical de las células principales posee estereocilios que sobresalen hacia el lumen tubular correspondiente a las microvellosidades del epitelio. Las **células basales** presentaron forma ovalada o piramidal y se observaron próximas a la membrana basal. El núcleo ocupó la mayor parte de la célula y el citoplasma se mostró escaso. Las **células del halo** se localizaron en la región más próxima a la membrana basal y se caracterizaron por presentar núcleo ovalado, escaso citoplasma y un halo blanco circundando a la célula. Por debajo del epitelio se observó una delgada capa de lámina propia compuesta por tejido conectivo laxo. La misma se observó rodeada por tejido muscular que aumenta de grosor desde el segmento *caput* al segmento *cauda*. El conducto está rodeado por tejido conectivo peritubular. En la **Figura R11** se muestran imágenes que ilustran las descripciones presentadas.

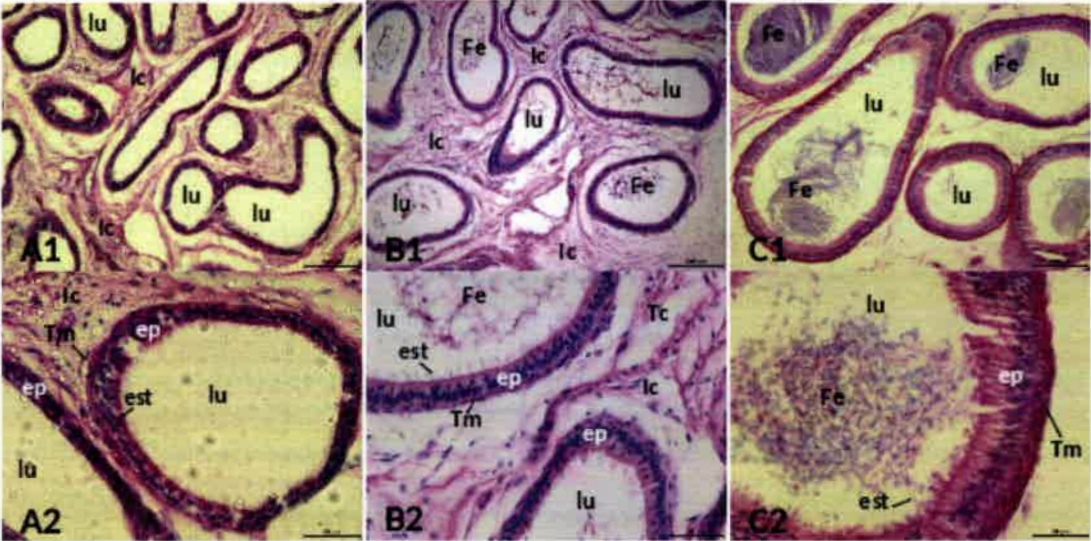




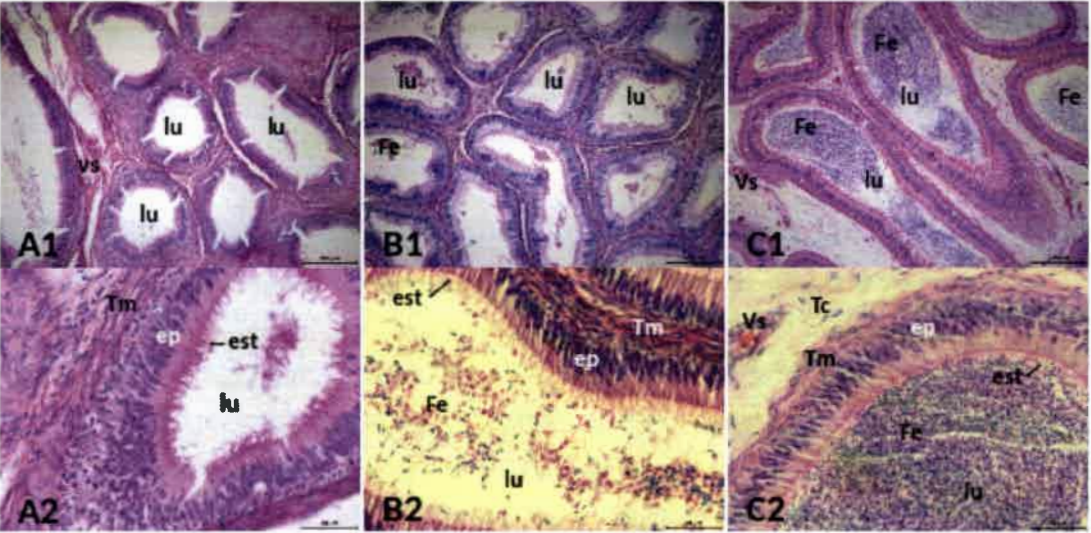
**Figura R11.** Cortes transversales de epidídimo equino. Segmentos *caput* (A), *corpus* (B) y *cauda* (C). Tinción H/E. Aumento 400x. **lu:** lumen del conducto; **ep:** epitelio; **Tm:** tejido muscular; **Tc:** tejido conectivo; **est:** esterocilios; **Cp:** células principales; **Cb:** células basales; **Ch:** células del halo.

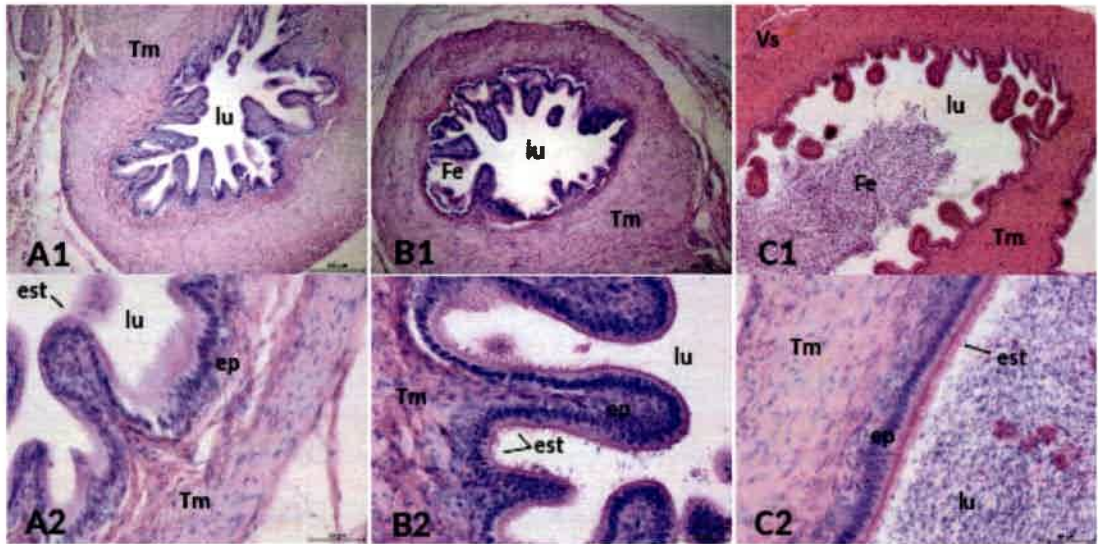
Los cortes histológicos de los diferentes segmentos de epidídimos postpuberales evidenciaron mayor desarrollo del epitelio y del tejido muscular y una mayor organización celular y desarrollo tisular en comparación con los cortes histológicos de los diferentes segmentos de epidídimos prepuberales y peripuberales (**Figura R12 A y B**). El segmento *caput* y el segmento *corpus*, en ambos grupos, presentaron gran desarrollo del epitelio y esterocilios, mientras que el segmento *cauda* presentó un mayor desarrollo del tejido muscular circular y marcada tortuosidad de la luz ductal. Esta característica fue más evidente en los epidídimos postpuberales (**Figura R12 C**). Además, se observó alta vascularización entre los cortes transversales del conducto en ambos grupos. En la **Figura R12** se muestran imágenes que ilustran las descripciones presentadas.

Caput



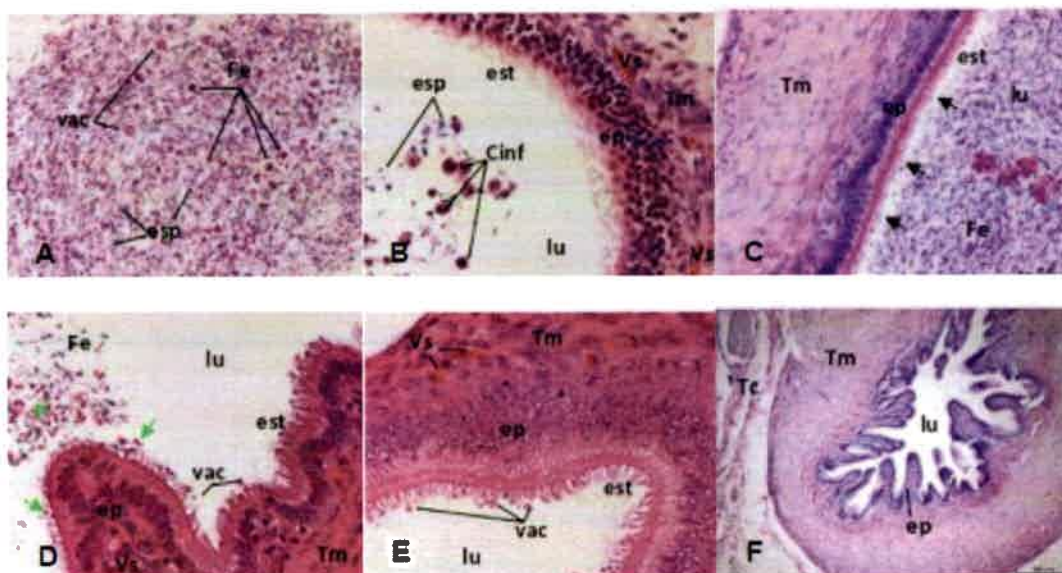
Corpus



**Cauda**

**Figura R12.** Cortes transversales del epidídimo de equinos prepuberales (A), peripuberales (B) y postpuberales (C). Segmentos *caput*, *corpus* y *cauda*. Tinción H/E. Aumento 100x (1) y 400x (2). **lu:** lumen del conducto; **ep:** epitelio; **Tm:** tejido muscular; **Tc:** tejido conectivo; **est:** esterocilios; **lc:** infiltrado celular; **Vs:** vaso sanguíneo; **Fe:** fluido espermático.

El contenido del lumen tubular de los segmentos epididimarios de tejidos postpuberales presentó gran concentración de espermatozoides asociados a un número importante de células inflamatorias y vesículas intraluminales (**Figura R13 A y B**). Además se evidenció una alta interacción entre los esterocilios del epitelio y los espermatozoides (**Figura R13 C**), y entre los espermatozoides y las vesículas intraluminales (**Figura R13 D**) presentes en el lumen tubular. En el caso de los epidídimos peripuberales se observó gran concentración de vesículas intraluminales y escasos espermatozoides (**Figura R13 E**). No se observó contenido luminal en ninguno de los segmentos epididimarios de tejidos prepuberales (**Figura R13 F**). En la **Figura R13** se muestran imágenes que ilustran las descripciones presentadas.



**Figura R13.** Cortes transversales del lumen de epidídimos equinos prepuberales, peripuberales y postpuberales. Tinción H/E. Aumento 100x, 400x y 600x. **A:** presencia de espermatozoides (**esp**), células inflamatorias (**Cinf**) y vacuolas intraluminales (**vac**) en el fluido espermático del lumen del *caput* de epidídimio postpuberal (400x). **B:** presencia de células inflamatorias (**Cinf**) en contacto con espermatozoides (**esp**) en el lumen del *caput* de epidídimio postpuberal (600x). **C:** interacción entre esterocilios y espermatozoides (fecha negra) en el lumen del *cauda* de epidídimos postpuberales (400x). **D:** interacción entre vesículas intraluminales y espermatozoides (flecha verde) en el lumen del *cauda* de epidídimos postpuberales (600x). **E:** presencia de vesículas intraluminales (**vac**) en el lumen del *corpus* de epidídimio peripuberal (600x). **F:** *cauda* de epidídimio prepuberal sin contenido luminal (100x). **lu:** lumen del conducto; **ep:** epitelio; **Tm:** tejido muscular; **Tc:** tejido conectivo; **est:** esterocilios; **Vs:** vaso sanguíneo; **Fe:** fluido espermático.

## 2.2 Evaluación histomorfométrica

### 2.2.1 Hallazgos en el diámetro del conducto

El segmento *corpus* de epidídimos postpuberales presentó mayor diámetro del conducto que el segmento *corpus* de epidídimos peripuberales ( $p < 0,0001$ ). No se observaron diferencias significativas en el diámetro del conducto del segmento *caput* ni del segmento *cauda* entre los grupos ( $p = 0,3735$  y  $p = 0,8611$ ; respectivamente).

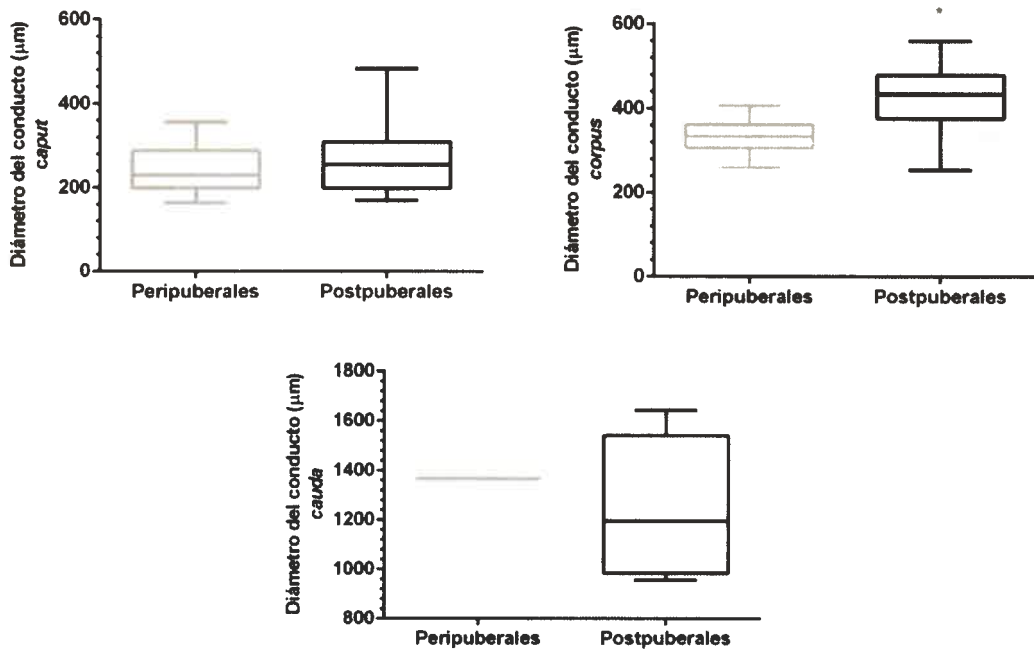
Al comparar entre los segmentos de cada epidídimio se observaron diferencias significativas entre todos segmentos del epidídimio tanto en los tejidos postpuberales como en los tejidos peripuberales ( $p < 0,0001$  y  $p = 0,0001$ ; respectivamente). Como resultado se determinó que el segmento *cauda* fue el que presentó mayor diámetro del conducto mientras el segmento *caput* fue el que presentó menor diámetro del conducto (**Tabla R6, Figura R14**).

Tabla R6. Diámetro del conducto de epidídimos de equinos peripuberales y postpuberales.

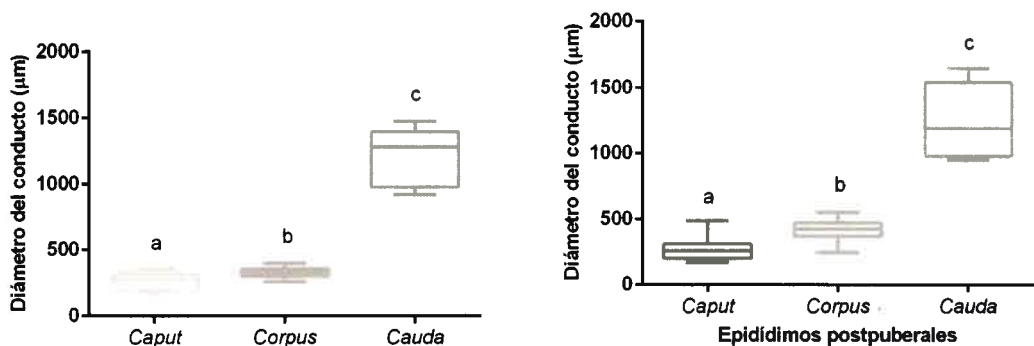
Diámetro del conducto ( $\mu\text{m}$ ) (mediana (Q1-Q3))	Epidídimos peripuberales	Epidídimos postpuberales
<i>Caput</i>	233,24 (202,37 - 289,38) <sup>aA</sup>	255,59 (202,37 - 308,06) <sup>aA</sup>
<i>Corpus</i>	334,04 (307,97 - 360,83) <sup>bB</sup>	433,79 (378,96 - 475,78) <sup>bB</sup>
<i>Cauda</i>	1369,36 (1369,36 - 1369,36) <sup>dC</sup>	1194,17 (1009,47 - 1490,20) <sup>dC</sup>

Q1-Q3= rango entre cuartil 1 y cuartil 3. Diferentes superíndices en minúscula indican diferencias significativas entre columnas ( $p < 0,05$ ). Diferentes superíndices en mayúscula indican diferencias significativas entre filas ( $p < 0,05$ ).

A



B



**Figura R14.** Diámetro del conducto epididimario de tejidos peripuberales y postpuberales. **A:** diferencias entre epidídimos peripuberales y postpuberales; *caput* (panel izquierdo), *corpus* (panel central) y *cauda* (panel derecho). **B:** diferencias entre segmentos del epidídimo; epidídimos peripuberales (panel izquierdo) y postpuberales (panel derecho). Diagrama de cajas y bigotes (Box-Plot) expresados en mediana (Q1-Q3). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre cajas ( $p < 0,05$ ).

## 2.2.2 Hallazgos en las dimensiones del lumen

### 2.2.2.1 Hallazgos en el diámetro

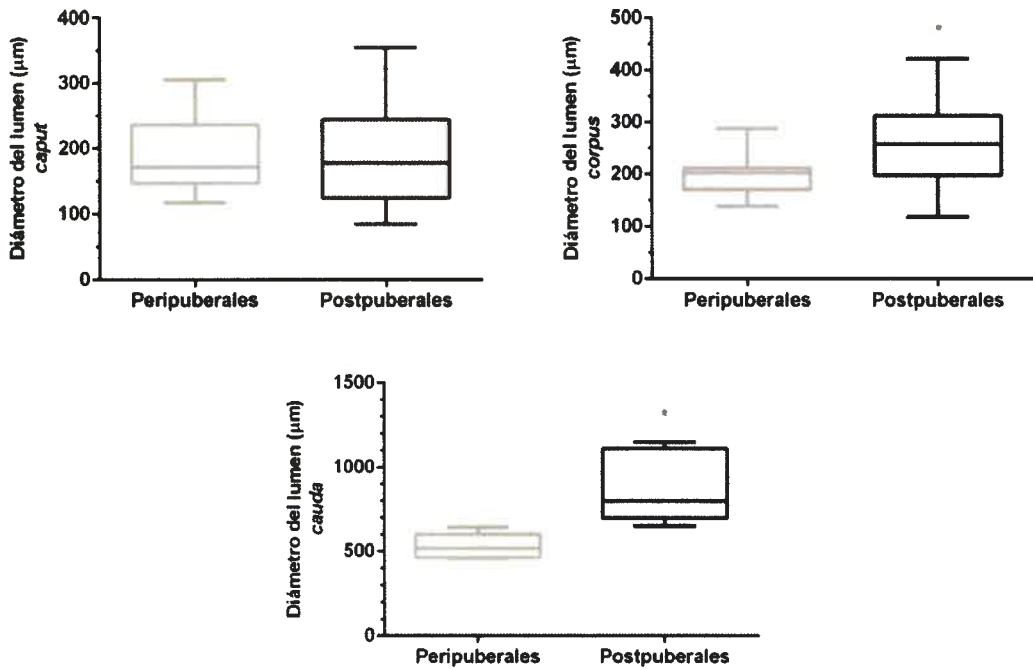
Los segmentos *corpus* y *cauda* de epidídimos postpuberales presentaron mayor diámetro del lumen que epidídimos peripuberales ( $p < 0,0001$  y  $p = 0,0016$ ; respectivamente). No se observaron diferencias significativas en el diámetro del lumen del *caput* entre los grupos ( $p = 0,3678$ ). Al comparar entre los segmentos del epidídimo se observaron diferencias significativas tanto en los tejidos postpuberales como en los tejidos peripuberales ( $p < 0,0001$  y  $p = 0,0003$ ; respectivamente). En los epidídimos postpuberales se determinó que el segmento *cauda* fue el que presentó mayor diámetro del lumen mientras el segmento *caput* fue el que presentó menor diámetro del lumen. Por su parte, en los epidídimos peripuberales se observó que el segmento *cauda* fue el que presentó mayor diámetro del lumen mientras que no se observaron diferencias significativas entre el diámetro del lumen de los segmentos *caput* y *corpus* (**Tabla R7, Figura R15**).

**Tabla R7.** Diámetro del lumen de epidídimos de equinos peripuberales y postpuberales.

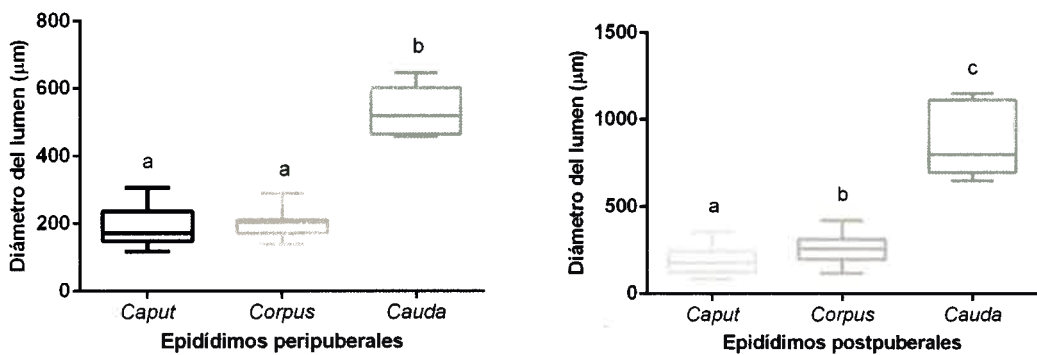
Dimensiones del lumen (mediana (Q1-Q3))		Epidídimos peripuberales	Epidídimos postpuberales
Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	<i>Caput</i>	172,31 (148,15 - 230,84) <sup>aA</sup>	177,58 (125,65 - 243,98) <sup>aA</sup>
	<i>Corpus</i>	203,62 (172,25 - 211,11) <sup>bA</sup>	257,11 (198,96 - 312,59) <sup>cB</sup>
	<i>Cauda</i>	519,70 (471,08 - 559,54) <sup>dB</sup>	798,80 (718,83 - 1.055,03) <sup>eC</sup>

Q1-Q3= rango entre cuartil 1 y cuartil 3. Diferentes superíndices en minúscula indican diferencias significativas entre columnas ( $p < 0,05$ ). Diferentes superíndices en mayúscula indican diferencias significativas entre filas ( $p < 0,05$ ).

A



B



**Figura R15.** Diámetro del lumen de epidídimos peripuberales y postpuberales. **A:** diferencias entre epidídimos peripuberales y postpuberales; *caput* (panel izquierdo), *corpus* (panel central) y *cauda* (panel derecho). **B:** diferencias entre segmentos del epidídimo; epidídimos peripuberales (panel izquierdo) y postpuberales (panel derecho). Diagrama de cajas y bigotes (Box-Plot) expresados en mediana (Q1-Q3). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre cajas ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.2.2 Hallazgos en el área

El segmento *cauda* de epidídimos postpuberales presentó mayor área del lumen que epidídimos peripuberales ( $p=0,0040$ ). No se observaron diferencias significativas en el área del lumen de los segmentos *caput* ni *corpus* entre los grupos ( $p=0,9144$  y  $p=0,1073$ ; respectivamente). Al comparar entre los segmentos del epidídimo se observaron diferencias significativas entre todos segmentos del epidídimo tanto en los tejidos postpuberales como en los tejidos peripuberales ( $p<0,0001$ ). El segmento *cauda* fue el que presentó mayor área del conducto mientras el segmento *caput* fue el que presentó menor área del conducto (Tabla R8, Figura R16).

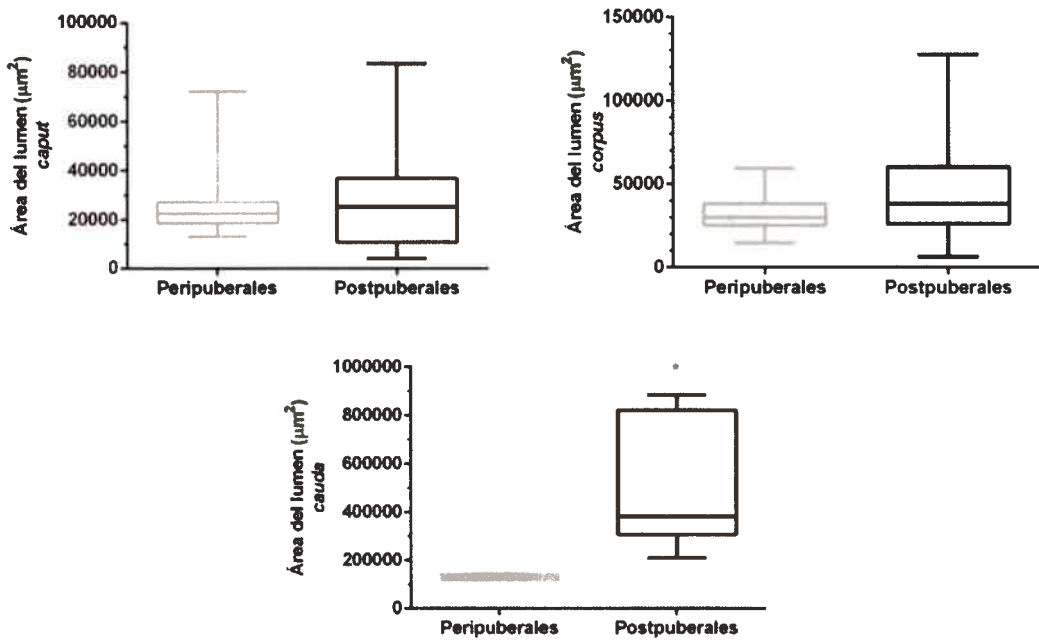
Tabla R8. Área del lumen de epidídimos peripuberales y postpuberales.

Dimensiones del lumen (mediana (Q1-Q3))		Epidídimos peripuberales	Epidídimos postpuberales
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	<i>Caput</i>	22888,01 (19057,08 - 27407,29) <sup>aA</sup>	25365,43 (11317,32 - 36581,16) <sup>aA</sup>
	<i>Corpus</i>	30314,70 (26543,68 - 38566,17) <sup>bB</sup>	38290,03 (26352,16 - 53862,68) <sup>bB</sup>
	<i>Cauda</i>	125305,11 (117993,14 - 133624,16) <sup>cC</sup>	382696,33 (341770,58 - 744831,61) <sup>dC</sup>

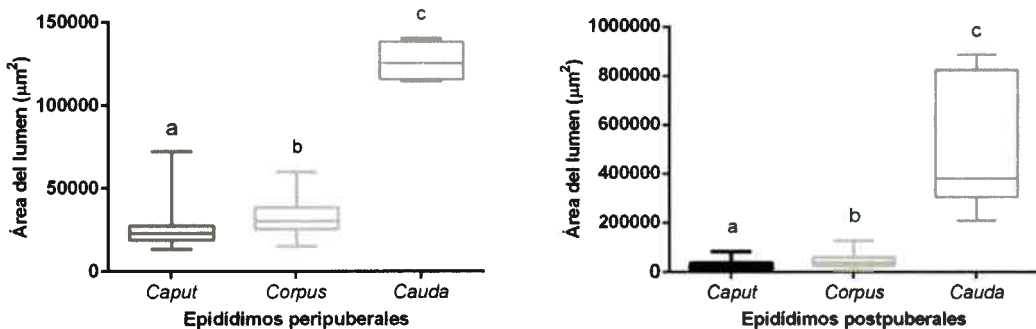
Q1-Q3= rango entre cuartil 1 y cuartil 3. Diferentes superíndices en minúscula indican diferencias significativas entre columnas ( $p<0,05$ ). Diferentes superíndices en mayúscula indican diferencias significativas entre filas ( $p<0,05$ ).



A



B



**Figura R16.** Área del lumen de epidídimos peripuberales y postpuberales. **A:** diferencias entre epidídimos peripuberales y postpuberales; *caput* (panel izquierdo), *corpus* (panel central) y *cauda* (panel derecho). **B:** diferencias entre segmentos del epidídimo; epidídimos peripuberales (panel izquierdo) y postpuberales (panel derecho). Diagrama de cajas y bigotes (Box-Plot) expresados en mediana (Q1-Q3). \*Diferencias estadísticamente significativas entre cajas ( $p < 0,05$ ). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre cajas ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.2.3 Hallazgos en el perímetro

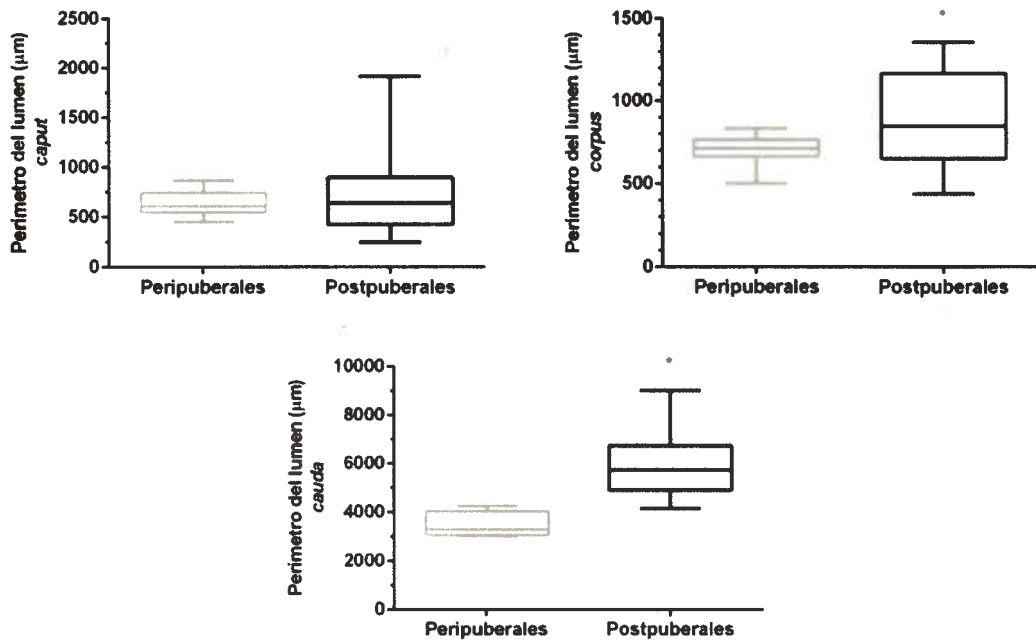
Los segmentos *corpus* y *cauda* de epidídimos postpuberales presentaron mayor perímetro del lumen que epidídimos peripuberales ( $p=0,0042$  y  $p=0,0081$ ; respectivamente). No se observaron diferencias significativas en el perímetro del lumen del segmento *caput* entre los grupos ( $p=0,8816$ ). Al comparar entre los segmentos del epidídimo se observaron diferencias significativas entre todos segmentos del epidídimo tanto en los tejidos postpuberales como en los tejidos peripuberales ( $p<0,0001$ ). De esta forma, el segmento *cauda* fue el que presentó mayor perímetro del conducto mientras el segmento *caput* fue el que presentó menor perímetro del conducto (**Tabla R9, Figura R17**).

**Tabla R9.** Perímetro del lumen de epidídimos peripuberales y postpuberales.

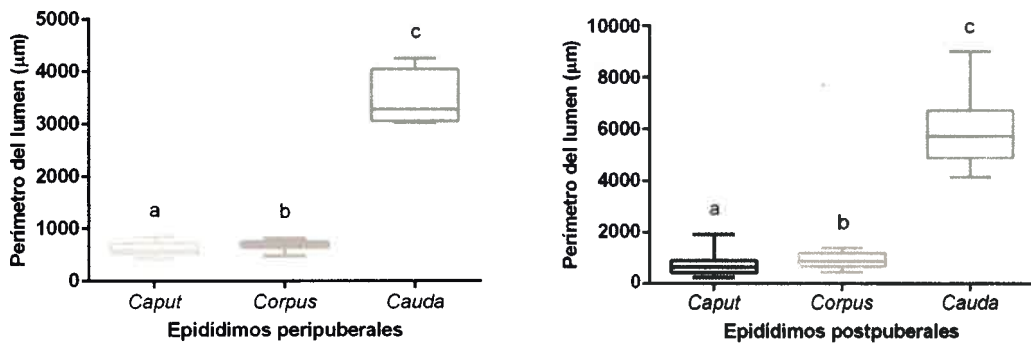
Dimensiones del lumen (mediana (Q1-Q3))		Epidídimos peripuberales	Epidídimos postpuberales
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	<i>Caput</i>	605,96 (542,58 - 737,14) <sup>aA</sup>	643,68 (427,98 - 894,85) <sup>aA</sup>
	<i>Corpus</i>	716,14 (668,46 - 764,19) <sup>bB</sup>	848,08 (659,09 - 1163,61) <sup>bB</sup>
	<i>Cauda</i>	3302,38 (3140,13 - 3639,99) <sup>dC</sup>	5732,64 (5032,58 - 6166,33) <sup>eC</sup>

Q1-Q3= rango entre cuartil 1 y cuartil 3. \*Diferencias estadísticamente significativas entre columnas ( $p<0,05$ ). Diferentes superíndices en minúscula indican diferencias significativas entre columnas ( $p<0,05$ ). Diferentes superíndices en mayúscula indican diferencias significativas entre filas ( $p<0,05$ ).

A



B



**Figura R17.** Perímetro del lumen de epidídimos peripuberales y postpuberales. **A:** diferencias entre epidídimos peripuberales y postpuberales; *caput* (panel izquierdo), *corpus* (panel central) y *cauda* (panel derecho). **B:** diferencias entre segmentos del epidídimo; epidídimos peripuberales (panel izquierdo) y postpuberales (panel derecho). Diagrama de cajas y bigotes (Box-Plot) expresados en mediana (Q1-Q3). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre cajas ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.3 Hallazgos en las dimensiones del epitelio

#### 2.2.3.1 Hallazgos en la altura

Los segmentos *caput* y *corpus* de epidídimos peripuberales presentaron mayor altura del epitelio que epidídimos postpuberales ( $p=0,0002$  y  $p<0,0001$ ; respectivamente). El segmento *cauda* de epidídimos postpuberales presentó mayor altura del epitelio que epidídimos peripuberales ( $p=0,0171$ ).

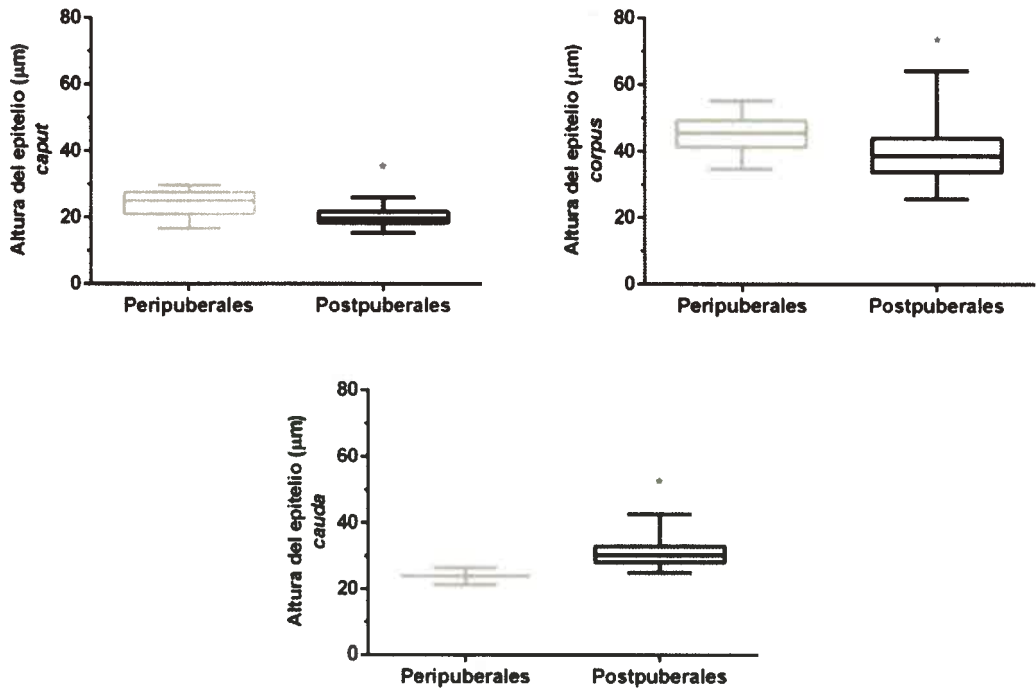
Al comparar entre los segmentos del epidídimo se observaron diferencias significativas entre los segmentos del epidídimo tanto en los tejidos postpuberales como en los tejidos peripuberales ( $p<0,0001$ ). De esta forma, se observó que en los epidídimos postpuberales el segmento *corpus* fue el que presentó mayor altura del epitelio mientras que el segmento *caput* fue el que presentó menor altura del epitelio. Por su parte, se observó que en los epidídimos peripuberales el segmento *corpus* fue el que presentó mayor altura del epitelio y no se observaron diferencias significativas entre la altura del epitelio entre los segmentos *caput* y *cauda* (Tabla R10, Figura R18).

**Tabla R10.** Altura del epitelio de epidídimos prepuberales y postpuberales.

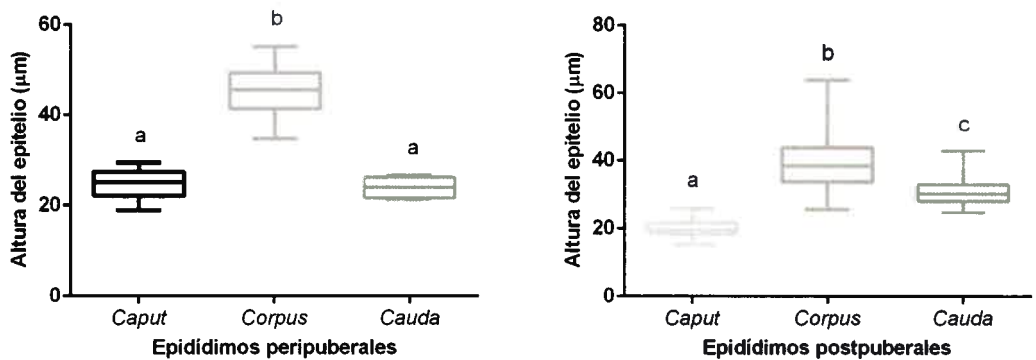
Dimensiones del epitelio (mediana (Q1-Q3))		Epidídimos peripuberales	Epidídimos Postpuberales
Altura ( $\mu\text{m}$ )	<i>Caput</i>	24,76 (21,03-26,85) <sup>aA</sup>	19,59 (18,39-21,62) <sup>bA</sup>
	<i>Corpus</i>	45,82 (41,66-49,30) <sup>cB</sup>	38,66 (34,31-43,61) <sup>dB</sup>
	<i>Cauda</i>	23,96 (22,65-25,28) <sup>aA</sup>	30,20 (28,24-32,88) <sup>c</sup>

Q1-Q3= rango entre cuartil 1 y cuartil 3. Diferentes superíndices en minúscula indican diferencias significativas entre columnas ( $p<0,05$ ). Diferentes superíndices en mayúscula indican diferencias significativas entre filas ( $p<0,05$ )

A



B



**Figura R18.** Altura del epitelio de epidídimos peripuberales y postpuberales. **A:** diferencias entre epidídimos peripuberales y postpuberales; *caput* (panel izquierdo), *corpus* (panel central) y *cauda* (panel derecho). **B:** diferencias entre segmentos del epidídimo; epidídimos peripuberales (panel izquierdo) y postpuberales (panel derecho). Diagrama de cajas y bigotes (Box-Plot) expresados en mediana (Q1-Q3). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre cajas ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.3.2 Hallazgos en el largo de los esterocilios

Los segmentos *caput* y *corpus* de epidídimos peripuberales presentaron mayor largo de los esterocilios que epidídimos postpuberales ( $p=0,0008$  y  $p<0,0001$ ; respectivamente). No se observaron diferencias significativas en el largo de los esterocilios del segmento *cauda* entre los grupos ( $p=0,6324$ ).

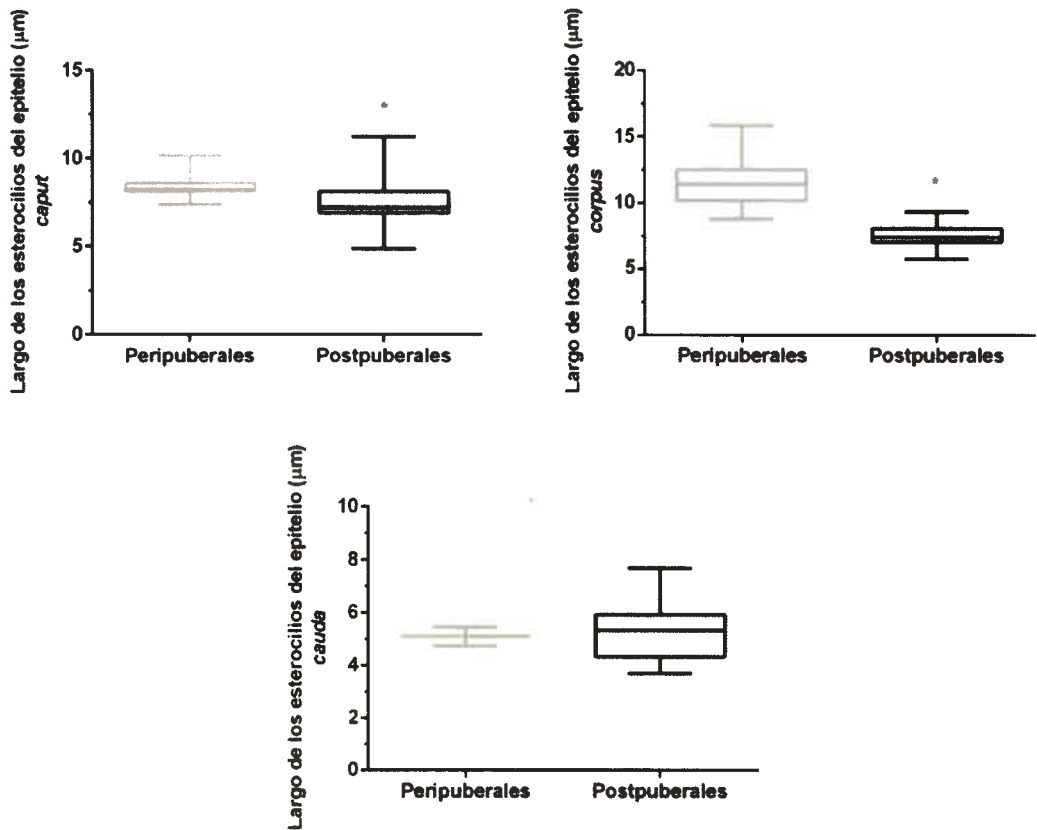
Al comparar entre los segmentos del epidídimo se observaron diferencias significativas entre los segmentos del epidídimo tanto en los tejidos postpuberales como en los tejidos peripuberales ( $p<0,0001$ ). De esta forma, se observó que en los epidídimos postpuberales los segmentos *caput* y *corpus* fueron los segmentos que presentaron mayor largo de los esterocilios mientras que fue el segmento *cauda* fue el que presentó menor largo de los esterocilios. Por su parte, se observó que en los epidídimos peripuberales el segmento *corpus* fue el que presentó mayor altura del epitelio mientras que el segmento *cauda* fue el que presentó menor largo de los esterocilios (**Tabla R11, Figura R19**).

**Tabla R11.** Largo de los esterocilios del epitelio de epidídimos peripuberales y postpuberales.

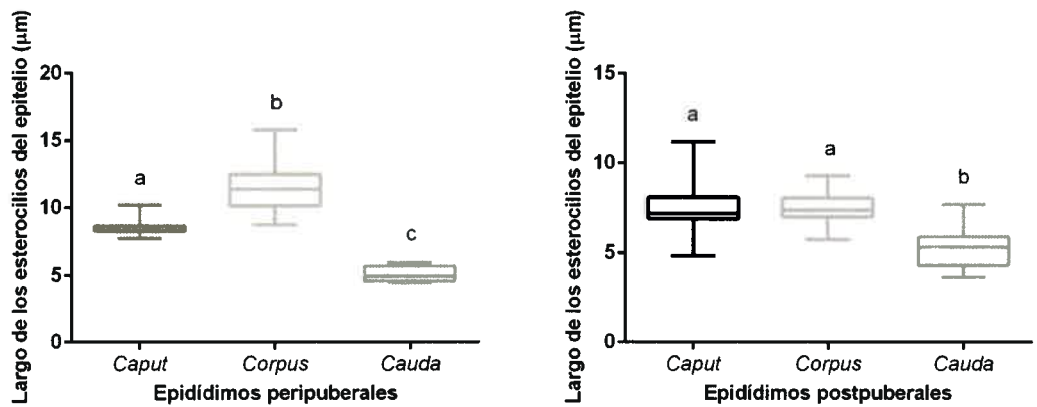
Dimensiones del epitelio (mediana (Q1-Q3))		Epidídimos peripuberales	Epidídimos postpuberales
Largo de los esterocilios ( $\mu\text{m}$ )	<i>Caput</i>	8,31 (8,15-8,60) <sup>aA</sup>	7,23 (6,97-8,05) <sup>bA</sup>
	<i>Corpus</i>	11,41 (10,22-12,43) <sup>cB</sup>	7,39 (7,06-8,06) <sup>dA</sup>
	<i>Cauda</i>	5,11 (4,93-5,29) <sup>eC</sup>	5,34 (4,62-5,92) <sup>eB</sup>

Q1-Q3= rango entre cuartil 1 y cuartil 3. \*Diferencias estadísticamente significativas entre columnas ( $p<0,05$ ). Diferentes superíndices en minúscula indican diferencias significativas entre columnas ( $p<0,05$ ). Diferentes superíndices en mayúscula indican diferencias significativas entre filas ( $p<0,05$ ).

A



B



**Figura R19.** Largo de los esterocilios del epitelio de epidídimos peripuberales y postpuberales. **A:** diferencias entre epidídimos peripuberales y postpuberales; *caput* (panel izquierdo), *corpus* (panel central) y *cauda* (panel derecho). **B:** diferencias entre segmentos del epidídimo; epidídimos peripuberales (panel izquierdo) y postpuberales (panel derecho). Diagrama de cajas y bigotes (Box-Plot) expresados en mediana (Q1-Q3). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre cajas ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.3.3 Hallazgos en el diámetro de las células principales y basales

Como resultado de la evaluación de las dimensiones de las **células principales y basales** de los epidídimos de machos equinos peripuberales y postpuberales, se observó un diámetro similar de las células principales y células basales del *caput*, *corpus* y *cauda* del epidídimo entre los grupos evaluados ( $p > 0,05$ ).

Al comparar entre los segmentos del epidídimo se observaron diferencias significativas únicamente en el diámetro de las células principales entre los segmentos *caput* y *cauda* de epidídimos peripuberales ( $p = 0,0062$ ). No se observaron diferencias significativas en el diámetro de las células principales entre segmentos de epidídimos postpuberales ( $p = 0,0781$ ) ni en el diámetro de las células basales entre los segmentos de epidídimos peripuberales y postpuberales ( $p = 0,1670$  y  $p = 0,4777$ ; respectivamente). Los valores del diámetro de las células principales y basales por segmento del epidídimo se muestran en la **Tabla R12 y Figura R20**.

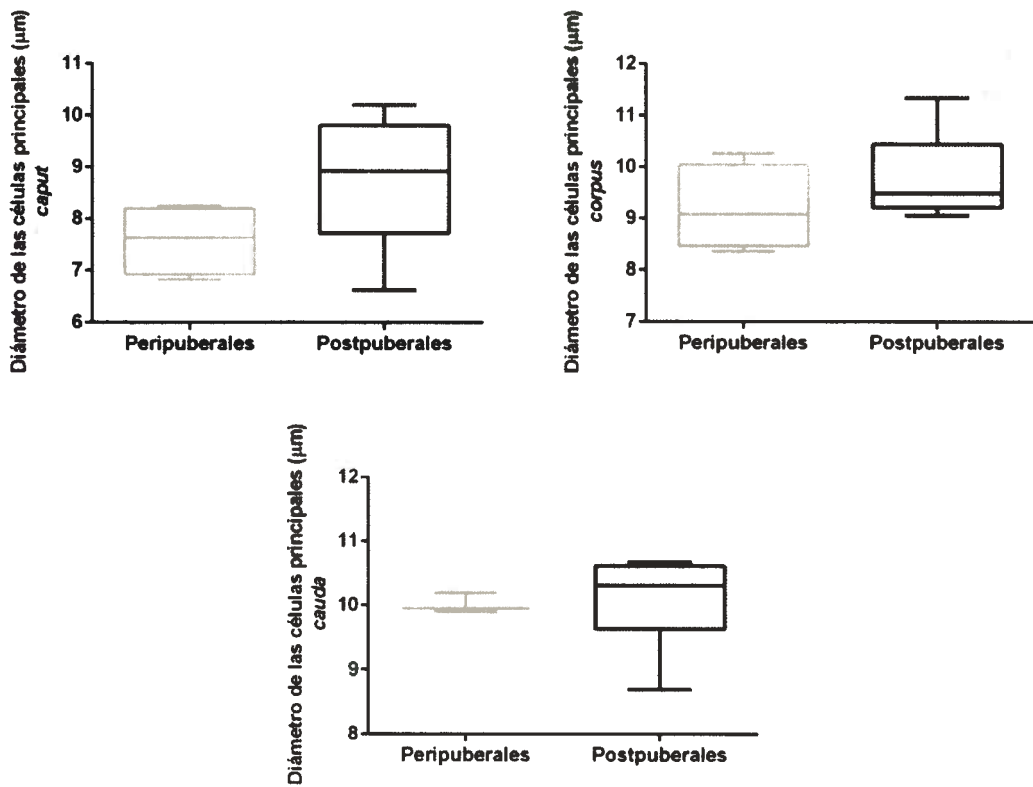
**Tabla R12.** Diámetro de las células principales y basales del epitelio de epidídimos peripuberales y postpuberales.

Dimensiones del epitelio epididimario (mediana (Q1-Q3))		Epidídimos Peripuberales	Epidídimos Postpuberales
Diámetro de las células principales ( $\mu\text{m}$ )	<i>Caput</i>	7,62 (7,11-8,08) <sup>aA</sup>	8,91 (8,21-9,65) <sup>aA</sup>
	<i>Corpus</i>	9,08 (8,69-9,59) <sup>bAB</sup>	9,49 (9,26-10,24) <sup>bA</sup>
	<i>Cauda</i>	9,96 (9,93-10,08) <sup>cB</sup>	10,30 (10,00-10,55) <sup>cA</sup>
Diámetro de las células basales ( $\mu\text{m}$ )	<i>Caput</i>	5,21 (5,16-5,33) <sup>dA</sup>	4,70 (4,59-5,38) <sup>dA</sup>
	<i>Corpus</i>	5,00 (4,85-5,30) <sup>eA</sup>	5,35 (4,95-5,68) <sup>eA</sup>
	<i>Cauda</i>	4,98 (4,93-5,00) <sup>fA</sup>	5,15 (4,73-5,20) <sup>fA</sup>

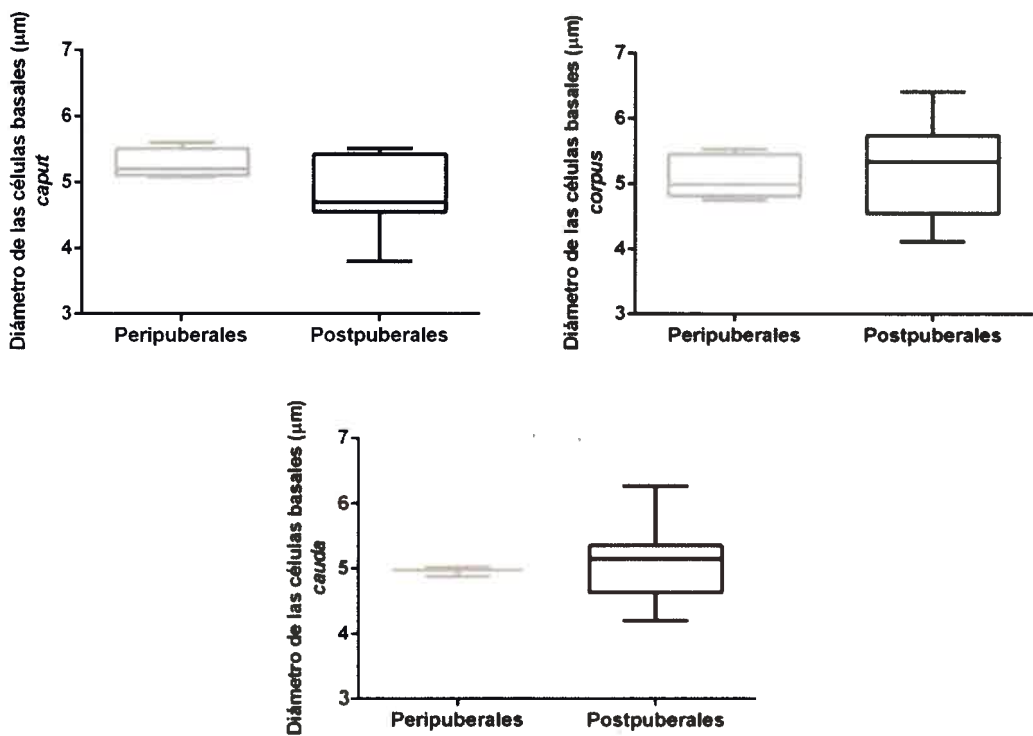
Q1-Q3= rango entre cuartil 1 y cuartil 3. Diferentes superíndices en minúscula indican diferencias significativas entre columnas ( $p < 0,05$ ). Diferentes superíndices en mayúscula indican diferencias significativas entre filas ( $p < 0,05$ ).



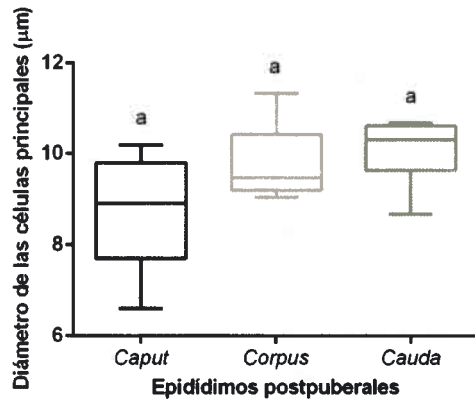
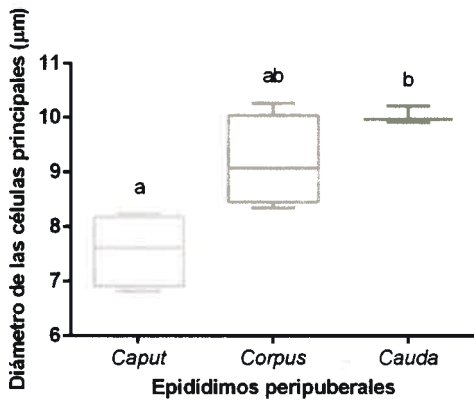
A1



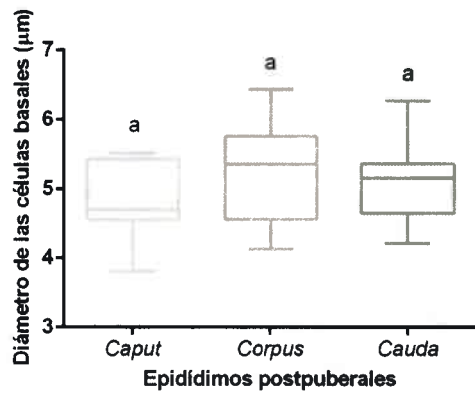
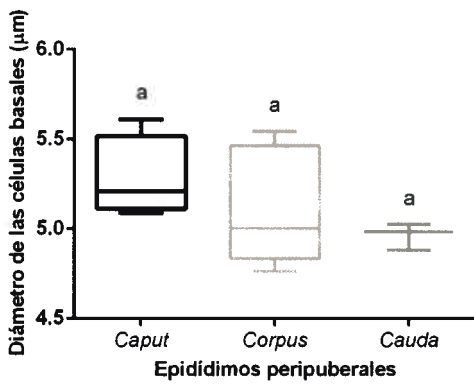
A2



B1



B2



**Figura R20.** Diámetro de las células principales (1) y basales (2) de epidídimos peripuberales y postpuberales. **A:** diferencias entre epidídimos peripuberales y postpuberales; *caput* (panel izquierdo), *corpus* (panel central) y *cauda* (panel derecho). **B:** diferencias entre segmentos del epidídimo; epidídimos peripuberales (panel izquierdo) y postpuberales (panel derecho). Diagrama de cajas y bigotes (Box-Plot) expresados en mediana (Q1-Q3). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre cajas ( $p < 0,05$ ).

#### 2.2.4 Hallazgos en las dimensiones del tejido muscular

Los epidídimos de equinos postpuberales presentaron mayor grosor de la capa muscular y mayor número de capas celulares en todos sus segmentos (*caput*, *corpus* y *cauda*) en comparación con los epidídimos de animales peripuberales (*caput*  $p < 0,0001$  y  $p < 0,0001$ ; *corpus*  $p = 0,0003$  y  $p < 0,0001$ ; *cauda*  $p < 0,0001$  y  $p = 0,0332$ ; respectivamente).

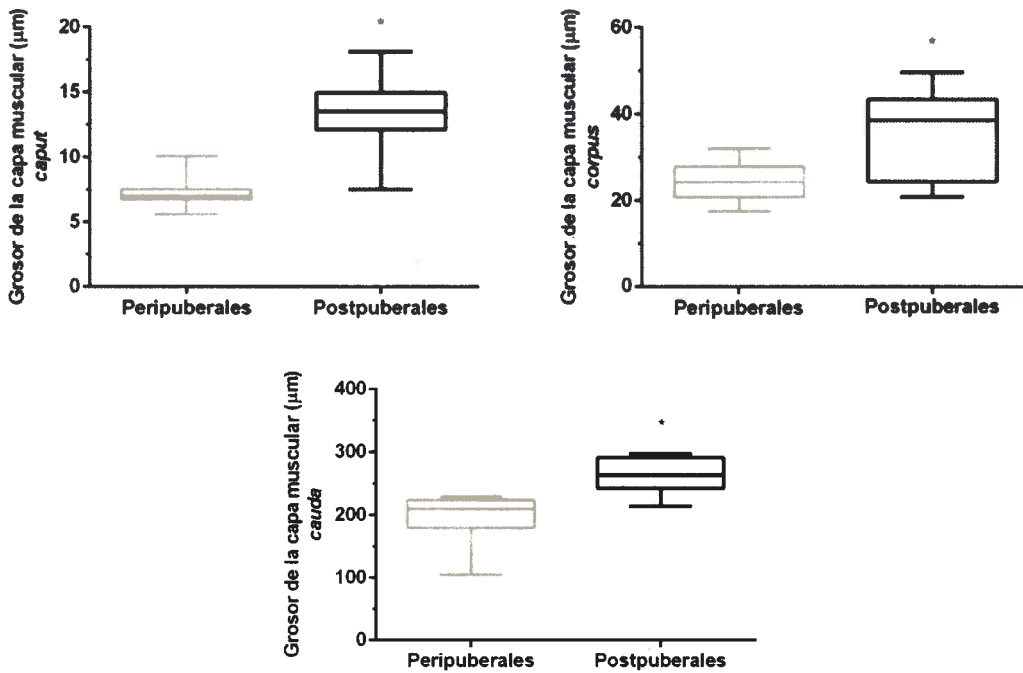
Al comparar entre los segmentos del epidídimo se observaron diferencias significativas en el grosor de la capa muscular y número de capas celulares entre todos ellos tanto en tejidos peripuberales como postpuberales. De esta forma, se observó que el segmento *cauda* fue el que presentó mayor grosor de la capa muscular y número de capas celulares, mientras que el segmento *caput* fue el que presentó menor grosor de la capa muscular y número de capas celulares ( $p < 0,0001$ ; **Tabla R13**, **Figura R21**).

**Tabla R13.** Grosor de la capa muscular y número de capas celulares del tejido muscular de epidídimos de equinos peripuberales y postpuberales.

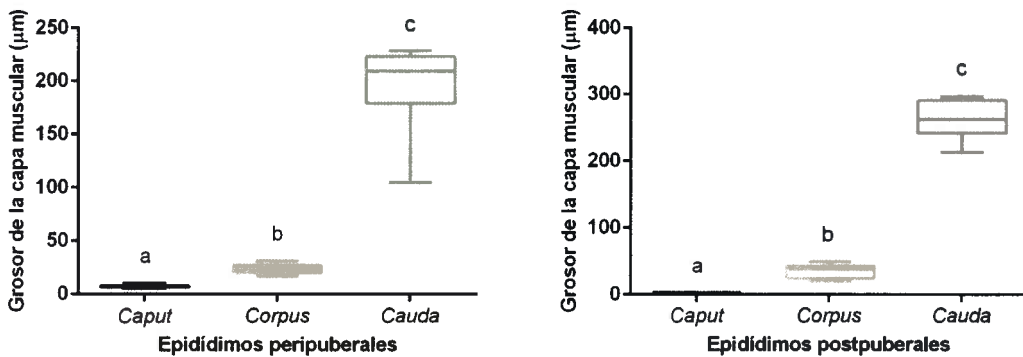
Dimensiones del tejido muscular ( $\mu\text{m}$ ) (mediana (Q1-Q3))		Epidídimos peripuberales	Epidídimos postpuberales
Grosor de la capa muscular	<i>Caput</i>	6,97 (6,71-7,21) <sup>BA</sup>	13,54 (12,24-14,98) <sup>BA</sup>
	<i>Corpus</i>	23,99 (21,19-27,54) <sup>CB</sup>	38,60 (24,77-42,45) <sup>DB</sup>
	<i>Cauda</i>	209,91 (182,68-222,32) <sup>DC</sup>	263,30 (248,09-290,73) <sup>CC</sup>
Número de capas celulares	<i>Caput</i>	1 (1-2) <sup>gD</sup>	2 (2-2) <sup>hD</sup>
	<i>Corpus</i>	2 (2-3) <sup>iE</sup>	3 (3-4) <sup>jE</sup>
	<i>Cauda</i>	6 (6-6) <sup>kF</sup>	7 (6-7) <sup>iF</sup>

Q1-Q3= rango entre cuartil 1 y cuartil 3. Diferentes superíndices en minúscula indican diferencias significativas entre columnas ( $p < 0,05$ ). Diferentes superíndices en mayúscula indican diferencias significativas entre filas ( $p < 0,05$ ).

A



B



**Figura R21.** Grosor de la capa muscular del tejido muscular de epidídimos peripuberales y postpuberales. **A:** diferencias entre epidídimos peripuberales y postpuberales; *caput* (panel izquierdo), *corpus* (panel central) y *cauda* (panel derecho). **B:** diferencias entre segmentos del epidídimo; epidídimos peripuberales (panel izquierdo) y postpuberales (panel derecho). Diagrama de cajas y bigotes (Box-Plot) expresados en mediana (Q1-Q3). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre cajas ( $p < 0,05$ ).

A partir de los resultados obtenidos, se determinó que los testículos y epidídimos postpuberales presentan mayor desarrollo anatómico e histológico que tejidos peripuberales. Los cambios macroscópicos más evidentes hacen mención al mayor peso, volumen y tamaño de los tejidos postpuberales.

Los cambios microscópicos más relevantes de los testículos postpuberales hacen mención al mayor desarrollo de la línea germinal. En cuanto al epidídimo las modificaciones más importantes se observaron en relación a las características del epitelio y tejido muscular. Además se observó que ciertas características histológicas se modificaron según segmento del epidídimo, como por ejemplo, el diámetro del conducto que sólo fue significativo en el segmento *corpus* de epidídimos postpuberales y el lumen del conducto que sólo fue significativo en el segmento *corpus y cauda* de epidídimos postpuberales.

Estas diferencias no sólo fueron observadas entre epidídimos peripuberales y postpuberales si no también entre los segmentos del epidídimo en cada grupo de estudio.

## VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo el criterio de clasificación de los grupos de estudio según peso, tamaño y volumen testicular fue eficaz en discriminar tejidos peripuberales y postpuberales, de los cuales el tamaño y peso testicular fueron las variables más importantes para esta clasificación. En adición, los autores Nishikawa (1955) y Blanchard et al (2001), sugirieron que el peso testicular puede ser utilizado como una herramienta para discriminar animales puberales siendo aún más precisa que la misma edad del animal debido a su estrecha relación con la pubertad, el establecimiento de la espermatogénesis y producción espermática diaria. De forma similar, en un estudio realizado por Mendes (2012) en equinos de raza Criolla Brasileira se observó que, a pesar de que existe una correlación entre la edad y el peso y tamaño testicular, la edad del padrillo no se correlaciona con la presencia de espermatozoides en los túbulos seminíferos, y en consecuencia, con la pubertad. Además este autor observó que no existe correlación entre el peso testicular y el volumen testicular, por lo que, es importante evaluar ambas características reproductivas, de forma similar a lo realizado en este estudio. Cabe destacar, que para determinar pubertad mediante estas variables es necesario considerar factores como la raza, el peso vivo y la estacionalidad reproductiva debido a la influencia de éstas en la variabilidad del tamaño y peso testicular e iniciación de la pubertad (Johnson y Neaves, 1981; Johnson y Thompson, 1983; Skinner y Bowen, 1968; Naden et al, 1990; Johnson et al, 1991a).

El criterio de clasificación establecido en este estudio fue corroborado mediante histología. Así, los testículos clasificados como peripuberales presentaron túbulos con lumen completamente formado y un epitelio seminífero en desarrollo observando una línea germinal compuesta por la mayoría de las generaciones celulares. En contraste, los testículos postpuberales presentaron túbulos con lumen completamente formado y un epitelio seminífero compuesto por una línea germinal completa y células de Leydig activas. Además se utilizaron las muestras histológicas de testículos prepuberales como referencia, los cuales presentaron túbulos seminíferos de escaso desarrollo, epitelio seminífero compuesto únicamente por espermatogonias y células de Sertoli, ausencia o formación inicial del lumen tubular y células de Leydig inactivas y de escaso número, indicando inactividad germinal y hormonal del testículo en concordancia con lo publicado por Clemmons et al, (1995); Heninger, (2005) y Mendes (2012). Este último autor, documentó que en equinos de 1 año de edad (peripuberales) solo el 22% de las células espermáticas en los túbulos seminíferos corresponden a espermatozoides mientras que en equinos de 2 años de edad (postpuberales) el 100% de las células espermáticas corresponden a espermatozoides. Asimismo, los cortes histológicos de epidídimos prepuberales evaluados en el presente estudio no evidenciaron espermatozoides en el *cauda* del epidídimo, mientras que los cortes histológicos de epidídimos peripuberales y postpuberales si evidenciaron la presencia de espermatozoides en el *cauda* del epidídimo.

Otra característica utilizada en el presente trabajo para la clasificación de tejidos peripuberales o postpuberales fue la pigmentación del parénquima testicular. Los testículos clasificados como peripuberales presentaron parénquimas de pigmentación clara (puntaje 2) y pigmentación media oscura (puntaje 3), correspondientes a testículos de 38,6 g y 39,7 g de peso. Estos últimos posiblemente no hayan iniciado aún la pubertad, de acuerdo al bajo peso testicular y a la pigmentación oscura del parénquima testicular observada, características de testículos equinos sin desarrollo de los túbulos seminíferos ni formación del lumen tubular testicular (Bouin y Ancel, 1905; Johnson Neaves, 1981; Clemmons et al, 1995; Heninger, 2005). Por su parte, los testículos clasificados como postpuberales presentaron parénquima de pigmentación oscura (puntaje 4) debido a la acumulación de gránulos de lipofucsina en las células de Leydig, indicando que el 78% corresponderían a testículos de equinos de edades avanzadas (Johnson y Neaves, 1981), y el 22% restante de los testículos que presentaron parénquima claro corresponderían a testículos de equinos cercanos a la finalización de la pubertad (Clemmons et al, 1995).

Las características anatómicas e histológicas de los tejidos reproductivos analizados en este estudio fueron similares a las reportadas por otros autores para testículo (Bouin y Ancel, 1905; Fawcett et al, 1973; Skinner y Bowen, 1968; Naden et al, 1990; Johnson y Neaves, 1981; Clemmons et al, 1995; Mendes, 2012; Moustafa et al, 2015) y epidídimo (Nishikawa, 1955; Arrighi et al, 1993; Arrighi, 2013) de équidos. Sin embargo, en relación a las características histológicas del epidídimo, Arrighi et al (1993) y Arrighi (2013), observaron la presencia de células apicales, basales y principales en el epitelio epididimario, lo cual no fue evidenciado en este estudio, observando sólo la presencia de células principales, basales y del halo.

Además se observó la presencia de un gran número de células inflamatorias y vesículas en el interior del lumen de epidídimos postpuberales, que no han sido evidenciadas por otros autores hasta la fecha. Sería de gran importancia descartar que la presencia de estas células en el lumen epididimario fuera de origen inflamatorio y/o infeccioso con la finalidad de determinar si estos hallazgos son propias de la especie equina y poseen alguna función biológica en la maduración espermática como por ejemplo la de fagocitosis de espermatozoides defectuosos o que han permanecido por largo periodo en el epidídimo, debido a que los epidídimos prepuberales (sin presencia de espermatozoides) no presentaron células inflamatorias en el lumen epididimario.

Está bien documentado que los macrófagos forman parte del intersticio testicular en las especies mamíferas y poseen un rol integral en la función testicular. Sin embargo, la función específica de éstas aún se desconoce. Hasta la fecha se ha evidenciado que los macrófagos testiculares participan en funciones de inmunoregulación testicular y mantención de la esteroidogénesis y espermatogénesis en animales adultos debido a

su estrecha relación con las células de Leydig y de Sertoli (Hedger, 2015). Clemmons et al (1995) evidenciaron que en equinos los macrófagos se encuentran tanto en testículos prepuberales como postpuberales sugiriendo que, previo a la pubertad, éstos están encargados de inhibir la espermatogénesis y durante la pubertad producen factores locales paracrinos involucrados en el inicio de la espermatogénesis. Sin embargo, en el presente estudio solo se observaron macrófagos en los testículos peripuberales y postpuberales, debido a su mayor facilidad de detección que en testículos prepuberales, ya que en testículos equinos adultos los macrófagos son de mayor tamaño y de mayor densidad en el testículo que en tejidos prepuberales (Clemmons et al, 1995). De forma opuesta, Hedger (2015) documentó que los macrófagos en los testículos prepuberales están inactivos, observándose de menor tamaño y en escaso número, por lo que, la falta de observación de macrófagos en los testículos prepuberales analizados en este estudio puede deberse a que no pudieron ser detectados en cortes histológicos a aumentos de 400X. Los macrófagos testiculares se encuentran como monocitos en el intersticio y maduran a macrófagos mediante la estimulación de gonadotrofinas (Hedger, 2015), durante el periodo prepuberal las concentraciones de gonadotrofinas son bajas (Johnson et al, 1983) lo que podría explicar la ausencia y la falta de detección de estas células en los tejidos analizados en este estudio.

En relación a las características macroscópicas evaluadas, se evidenció que los testículos y epidídimos postpuberales presentaron mayor peso, tamaño y volumen que los testículos y epidídimos peripuberales. Este mayor desarrollo tisular evidenciado por el presente estudio también fue observado por segmento epididimario. De este modo, el *caput*, *corpus* y *cauda* de los epidídimos postpuberales presentaron mayor volumen y tamaño que el *caput*, *corpus* y *cauda* de los epidídimos peripuberales. Este mayor desarrollo de los epidídimos postpuberales se asocia al mayor desarrollo histológico evidenciado en los tejidos postpuberales, observando un mayor diámetro del conducto y del lumen epididimario, altura del epitelio y grosor de la musculatura, que sumado a la mayor concentración espermática, conlleva a un aumento del peso, tamaño y volumen epididimario de los tejidos postpuberales. Hasta la fecha la información referente a la pubertad en el epidídimo y sobre todo en el epidídimo equino es casi inexistente. Las revisiones más actuales de epidídimo en general están realizadas por Robaire e Hinton (2015) y en el epidídimo equino por Amann (2011b), no obstante, son limitadas.

En el trabajo realizado por Nishikawa (1955), el peso y largo epididimario descrito para tejidos peripuberales y postpuberales son similares a los obtenidos en este estudio. Sin embargo, en el trabajo de este autor, pudieron observarse pesos epididimarios de hasta de 50 g, mientras que en el presente estudio el peso epididimario máximo obtenido fue de 29 g, debido a que el trabajo de Nishikawa se evaluaron testículos de pesos sobre 200 g, mientras que en este estudio el peso testicular máximo evaluado fue de 197 gramos. Además este autor concluye que epidídimos sobre 20 g de peso son considerados



postpuberales, similar al peso promedio obtenido en este estudio para epidídimos postpuberales (22,89 g).

Este estudio propone el cálculo del volumen epididimal por segmento a partir fórmulas según la forma geométrica de cada segmento, de forma similar a como se calcula en el volumen testicular. Estas fórmulas que podrían ser utilizadas como una herramienta útil en determinar la capacidad de almacenamiento espermático en los diferentes segmentos del epidídimo. Sin embargo, más estudios son necesarios para acreditar la utilización de esta fórmula.

En el caso del testículo, esta diferencia en el peso, tamaño y volumen testicular está dada por el aumento de las concentraciones de LH, FSH y testosterona durante la pubertad (Naden et al, 1990), las cuales actúan en el testículo estimulando la iniciación de la espermatogénesis, lo que un aumento del largo y diámetro de los túbulos seminíferos, formación del lumen tubular, un mayor número y tipo de células germinales, aumento de la población de células de Sertoli, reemplazo de macrófagos por las células de Leydig (Jonhson y Neaves, 1981; Johnson et al, 1983; Clemmons et al, 1995), además de la modificación en la localización y distribución receptores de andrógenos en el testículo (Bilinska et al, 2004). Por su parte, durante la pubertad el tejido del compartimento tubular aumenta en relación al tejido del compartimiento intersticial, observando que en asnos esta relación aumenta de 42% en animales prepuberales a 78% en animales postpuberales, lo que incrementa el peso, tamaño y volumen testicular (Moustafa et al, 2015).

En comparación a los valores de peso, tamaño y volumen testicular de tejidos peripuberales reportados por otros autores, los valores de volumen, ancho y largo testicular de tejidos peripuberales obtenidos en este estudio fueron mayores que los reportados por Mendes (2012) en equinos de 1 año de edad de raza Criolla Brasileira, y superiores a los pesos testiculares de padrillos peripuberales de 1,5 a 2 años de edad observados por Clemmons et al (1995).

El desarrollo de la vascularización del testículo y epidídimo es un factor importante durante la pubertad. Esta mayor irrigación permite un mayor intercambio de hormonas y nutrientes desde la circulación sistémica hacia estos tejidos, dentro del testículo y entre el testículo y el epidídimo, ya que durante la pubertad se generan conexiones vasculares entre los vasos sanguíneos que irrigan al *cauda* del epidídimo y la red vascular intratesticular permitiendo la llegada de altas concentraciones de testosterona para el desarrollo del epidídimo (Kormano, 1967; Robaire e Hinton, 2015). Este mayor desarrollo vascular en los tejidos reproductivos postpuberales también fue evidenciado en este estudio, tanto en el testículo como el epidídimo equino. Esto explicaría la correlación positiva entre el peso del testículo y del epidídimo observadas en este estudio. Así, a

medida que aumenta el peso testicular aumenta el peso del epidídimo, evidenciando un crecimiento conjunto de ambos tejidos durante la pubertad, necesarios para el correcto desempeño en sus funciones reproductivas. Sin embargo, este aumento no es proporcional en ambos tejidos. En los tejidos peripuberales el peso del epidídimo representa una cuarta parte del peso testicular, mientras que en los tejidos postpuberales el peso del epidídimo representa una séptima parte del peso testicular. Se observó que el peso del testículo aumenta significativamente, mientras que el peso del epidídimo aumenta gradualmente hasta que el testículo alcanza los 110 gramos de peso, momento en el que el epidídimo alcanza su peso máximo y luego se mantiene constante. De este modo, el presente estudio propone que el peso del epidídimo equino aumenta durante la pubertad alcanzando su peso máximo y se mantiene constante una vez completada la pubertad, a diferencia del peso testicular que aumenta constantemente desde la pubertad y durante la mayor parte de la vida del animal.

De forma similar, la razón entre el volumen epididimario y testicular es mayor en tejidos peripuberales, siendo también similar a lo observado en la razón entre el peso epididimal y testicular. Esto sugiere que durante la pubertad existe un crecimiento acelerado del testículo y del epidídimo debido a los cambios en la maduración y especialización de los tejidos necesarios para el correcto desempeño de las funciones de morfogénesis y maduración espermática, y que en el caso de los testículos, estos cambios continúan posterior a la adquisición de pubertad y finalizan con la madurez sexual, según lo descrito por Johnson y Neaves (1981) y Han y Lee (2013). Esta diferencia en la tasa de crecimiento entre tejidos reproductivos ha sido observado en otras especies animales y se debe a que los órganos reproductivos en el macho poseen diferentes tasas de crecimiento durante la pubertad según la distribución y número de receptores a andrógenos (Adebayo y Olurode, 2010; Han y Lee, 2013).

Las diferencias observadas en la tasa de crecimiento no solo fueron evidenciadas entre tejidos si no también dentro de un mismo tejido, evidenciando diferentes patrones de crecimiento (largo, ancho y alto) entre los segmentos del epidídimo. De esta forma, el segmento epididimario *cauda* de tejidos postpuberales aumentó en todas sus dimensiones a diferencia del *corpus*, que aumentó solo en largo y ancho, y el *caput* que aumentó únicamente en altura, sugiriendo que durante la pubertad los segmentos del epidídimo crecen a diferente velocidad. Estas diferencias en el desarrollo anatómico según segmento (*caput*, *corpus* y *cauda*) permiten sugerir que los mecanismos que regulan el desarrollo del epidídimo y/o los receptores presentes en cada segmento difieren en entre sí. De forma similar a lo observado por Xu et al (2010), quienes reportaron que la proliferación celular del epidídimo de rata durante el desarrollo postnatal está mediada por fosfatasa, enzimas las cuales no estimulan con la misma intensidad el desarrollo celular en todo el epidídimo, siendo este efecto superior en el desarrollo celular de los segmentos del *caput* y *corpus*.

En relación a las características microscópicas de los segmentos *caput*, *corpus* y *cauda* del epidídimo evaluadas en este trabajo, se evidenció que los epidídimos postpuberales presentaron mayor desarrollo celular y tisular que los epidídimos peripuberales, en todos o alguno de sus segmentos ( $p < 0,05$ ). El *corpus* fue el segmento que presentó mayores modificaciones histomorfométricas asociadas a la pubertad siendo significativamente diferente en todos los parámetros histomorfométricos evaluados. Así, el *corpus* de epidídimos postpuberales presentó conductos de mayor diámetro, lumen de mayor diámetro y perímetro, epitelio de mayor altura, esterocilios de mayor longitud y tejido muscular de mayor grosor y número de capas celulares que el *corpus* de epidídimos peripuberales ( $p < 0,05$ ). Estas diferencias también han sido evidenciadas en otros mamíferos como el murciélago, donde se reportó que el diámetro del lumen, altura del epitelio y grosor de la musculatura de *corpus* fue superior en individuos adultos en comparación con los individuos juveniles (Danmaigoro et al, 2014).

El *caput* fue el segmento del epidídimo que presentó menores modificaciones histomorfométricas asociadas a la pubertad, siendo la única característica relevante la mayor altura del epitelio y mayor grosor y número de capas celulares de tejido muscular en epidídimos postpuberales. En el caso del *cauda*, los cambios histomorfométricos más relevantes asociados a la pubertad fueron observados en el lumen tubular y tejido muscular, evidenciando que el *cauda* de epidídimos postpuberales presentó mayor diámetro, área y perímetro del lumen tubular, y tejido muscular de mayor grosor y mayor número de capas celulares que el *cauda* de epidídimos peripuberales ( $p < 0,05$ ). Estos cambios están asociados a la capacidad anatómica necesaria del *corpus* y del *cauda* para la realización de las funciones de maduración y almacenamiento espermático durante el tránsito de éstos por el epidídimo, en comparación con la función de reabsorción del fluido testicular del *caput*. Las diferencias en el desarrollo celular evidenciadas según segmento (*caput*, *corpus* y *cauda*) sugieren que los mecanismos que regulan el desarrollo celular del epidídimo y/o los receptores presentes en cada segmento difieren entre sí (Xu et al, 2010), de forma similar a los resultados obtenidos en este estudio en el desarrollo anatómico del epidídimo.

Al comparar entre los segmentos del epidídimo en tejidos peripuberales y postpuberales se evidenció que el *cauda* del epidídimo presentó mayor diámetro del conducto, diámetro del lumen, área del lumen, perímetro del lumen y grosor del tejido muscular y número de células musculares que el *corpus*, y este último a su vez, mayor desarrollo que el *caput*, tanto en epidídimos peripuberales como postpuberales. Además se evidenció que el *corpus* presentó mayor altura del epitelio en comparación con el *cauda* y el *caput* en epidídimos peripuberales, y mayor altura del epitelio en comparación con el *cauda*, y este a su vez, mayor altura del epitelio que el *caput* en epidídimos postpuberales. De forma similar, el *corpus* y *caput* presentaron mayor largo de los esterocilios del epitelio que el *cauda*, tanto en epidídimos peripuberales como postpuberales. Diferencias entre

los segmentos del epidídimo también han sido evidenciadas en otras especies mamíferas como la rata de bastón mayor (Adebayo y Olurode, 2010) y el canguro (Khamas et al, 2014). Estos autores reportaron diferencias en el diámetro del conducto, la altura del epitelio, el número de capas musculares y el grosor del tejido muscular entre segmentos de forma similar a lo observado en este estudio. A pesar que los valores de las mediciones varían según la especie, se mantiene la tendencia morfométrica entre los segmentos.

El “segmento inicial” del epidídimo no fue incluido en las evaluaciones histomorfométricas debido a que este segmento no fue distinguible macroscópicamente como los demás segmentos del epidídimo y debido a que las muestras histológicas correspondían a tejido del conducto eferente o *caput* del epidídimo en el total de los tejidos analizados. Según la bibliografía consultada, no existen trabajos que mencionen la existencia de este segmento en el equino (Jiménez y Ruibal, 2004; Amann, 2011a; Arrighi, 2013). Probablemente el epidídimo equino no presente “segmento inicial”, a diferencia de otras especies animales y el humano donde sí ha sido documentada (Benoit, 1926; Abe et al, 1984).

El análisis macroscópico y microscópico realizado en este estudio demuestra que el tejido testicular y epididimario equino se modifica durante la pubertad, evidenciando un aumento en el crecimiento, desarrollo y especialización de estos tejidos. Durante la pubertad ocurren modificaciones en la expresión génica y protéica del testículo y epidídimo equino, que lo cual estimula un aumento de los receptores de gonadotropinas y aromatasas en el testículo y epidídimo equino (Herrera-Luna et al, 2015). Esto último es de gran importancia debido a que la estructura y funcionalidad del epidídimo está regulado por un complejo de factores endocrinos, neuronales, lumicrinos y paracrinis, dentro de los cuales los andrógenos corresponden al componente más importante (Hedger, 2015).

En el caso de los testículos postpuberales, el mayor desarrollo se debe a los cambios celulares, tisulares y hormonales que ocurren durante la pubertad. Dentro de estos, los cambios más relevantes corresponden a la formación del lumen de los túbulos seminíferos, la formación de la barrera hemato-testicular, el desarrollo de la línea germinal, el aumento y diferenciación de las células de Leydig y de Sertoli, y el aumento en las concentraciones plasmáticas de LH, FSH y testosterona (Johnson y Neaves, 1981; Johnson y Thompson, 1983; Naden et al, 1990; Clemmons et al, 1995; Heninger, 2005). Estos eventos puberales están regulados por factores de crecimiento, enzimáticos y moleculares (Abe et al, 1984; Holland y Orgebin-Crist, 1988; Turner et al, 2007; Xu et al 2010; Han y Lee, 2013), como el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (CDKN1B) que regula el desarrollo de los túbulos seminíferos, la hormona anti-Mülleriana y el receptor de andrógenos que regulan la maduración de las células de Sertoli (Almeida et al, 2012) y el factor de crecimiento dependiente de insulina (IGF-I) que se ha vinculado entre otras

funciones a la regulación de la espermatogénesis y de la funcionalidad de las células de Leydig (Yoon et al, 2011). En el caso del epidídimo, es evidente que la expresión de genes, factores de crecimiento presentes en el fluido testicular y epididimario y hormonas como la testosterona regulan el desarrollo de éste durante la pubertad, de forma similar a otros tejidos reproductivos como el testículo (Almeida et al, 2012). Sin embargo, a pesar de la importancia del epidídimo en la fertilidad y a los estudios realizados para comprender este evento, los mecanismos específicos que regulan el crecimiento y diferenciación del epidídimo durante el periodo postnatal son desconocidos hasta la fecha. Abe et al (1984) y Alexander (1972) postularon que el fluido producido por el testículo y la región proximal del epidídimo influyen en la diferenciación de las células principales a lo largo del epidídimo. Sin embargo, la identidad de los factores involucrados en este evento aún no han sido comprobados.

## **1. Proyecciones**

El presente estudio ha abordado de manera exhaustiva y detallada la evaluación anatómica e histológica del testículo y epidídimo de equino alrededor de la pubertad. En el futuro, estudios complementarios orientados al análisis de la expresión de proteínas y transcritos en estos tejidos en animales puberales permitirá profundizar el conocimiento sobre la regulación de la expresión génica en ambos tejidos durante este proceso tan relevante para la fertilidad del animal. La caracterización de los cambios moleculares peripuberales del testículo y epidídimo equino podrán contribuir a la comprensión de las observaciones resultantes de los estudios macroscópicos y microscópicos obtenidos en este trabajo de tesis, contribuyendo al conocimiento de las bases moleculares de la morfogénesis y maduración espermática durante la pubertad en el equino.

## VII. CONCLUSIONES

Según las evaluaciones realizadas en este estudio se concluye que:

- Durante la pubertad ocurren cambios tanto anatómicos como histológicos en el testículo y epidídimo equino, y en los diferentes segmentos del epidídimo.
- Los testículos y epidídimos postpuberales presentan mayor desarrollo anatómico e histológico que tejidos peripuberales.
- Los cambios macroscópicos más evidentes fueron el mayor peso, volumen y tamaño de los tejidos postpuberales.
- Los cambios microscópicos más relevantes de los testículos postpuberales fue el mayor desarrollo de la línea germinal.
- Los cambios microscópicos más relevantes de los epidídimos postpuberales fue el mayor desarrollo del epitelio y del tejido muscular, siendo el *corpus epididimario el segmento con mayores modificaciones*.
- Al comparar entre los segmentos epididimarios, el *cauda* fue el segmento que presentó mayor desarrollo del conducto, del lumen y del tejido muscular en comparación con el segmento *caput* y *corpus*.
- El peso testicular en conjunto con la pigmentación del parénquima testicular y la histología son herramientas confiables para determinar el estado puberal en el equino sin la necesidad de conocer la edad de animal.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe K; Takano H; Ito T., 1984. Interruption of the luminal flow in the epididymal duct of the corpus epididymidis in the mouse, with special reference to differentiation of the epididymal epithelium. *Archivum histologicum japonicum*. 47: 137-147.
- Adebayo AO; Olurode SA., 2010. The morphology and morphometry of the epididymis in the greater cane rat (*Thryonomys swinderianus* Temmincks). *Folia Morphologica*. 69: 246-252.
- Alexander NJ., 1972. Prenatal development of the ductus epididymis in the rhesus monkey. The effects of fetal castration. *American Journal of Anatomy*. 135: 119-134.
- Almeida J; Conley AJ; Mathewson L; Ball BA., 2012. Expression of anti-Müllerian hormone, cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1B), androgen receptor, and connexin 43 in equine testes during puberty. *Theriogenology*. 77: 847-857.
- Amann RP., 2011a. Functional anatomy of the adult male. En: McKinnon AO; Squires EL; Vaala WE; Varner DD (Eds) *Equine reproduction*, 2da ed. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, EE.UU. pp 867-880.
- Amann RP., 2011b. Physiology and Endocrinology. En: McKinnon AO; Squires EL; Vaala WE; Varner DD (Eds) *Equine reproduction*, 2da ed. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, EE. UU. pp 881-908.
- American Horse Council Foundation's. 2005 National Economic Impact Study. Washington DC, EE.UU. [www.horsecouncil.org](http://www.horsecouncil.org).
- Arrighi S; Romanello MG; Domeneghini C., 1993. Ultrastructure of epididymal epithelium in *Equus caballus*. *Annals of Anatomy*. 175: 1-9.
- Arrighi S., 2013. Primary cilia in the basal cells of equine epididymis: A serendipitous finding. *Tissue and Cell*. 45: 140144.
- Benoit J., 1926. Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule chez les mammifères. *Archives d Anatomie, d Histologie et d Embryologie (Strasb)*. 5: 173412.
- Bilinska B; Hejmej A; Pawlak M; Sadowska J; Tischner M., 2004. Immunoexpression of androgen receptors in testes of immature and mature stallions. *Equine Veterinary Journal*. 36: 539-543.
- Blanchard TL; Brinsko SP; Varner DD; Hurtgen JP., 2001. Evaluation of testicular size and function in 1-3-year-old stallions. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*. 47: 232-235.
- Bouin P y Ancel P., 1905. La glande interstitielle du testicule chez le cheval. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*. 3: 391-437.
- Carr DW; Usselman MC; Acott TS., 1985. Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biology of Reproduction*. 33: 588-595.
- Clemmons AJ; Thompson Jr DL; Johnson L., 1995. Local initiation of spermatogenesis in the horse. *Biology of Reproduction*. 52: 12581267.
- Fawcett DW; Neaves WB; Flores MN., 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the onterstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*. 9: 500-532.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Statistics Division (FAO-STAT). <http://faostat3.fao.org/>.



- Danmaigoro A; Onu JE; Sonfada ML; Umaru MA; Oyelowo FO., 2014. Histology and histometric anatomy of the male reproductive system of bat (*Eidolon helvum*). *Journal of Histology*. Hindawi Publishing Corporation. pp 6. doi: 10.1155/2014/834735.
- Han SH; Lee SH., 2013. Differential growth of the reproductive organs during the peripubertal period in male rats. *Development & Reproduction*. 17: 469-475.
- Hedger MP., 2015. The immunophysiology of male reproduction. En: Plant TM; Zeleznik AJ (Eds) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Fourth ed. Academic Press, MO, EE.UU. pp 805892.
- Heninger NL, 2005. The role of testicular germ cell apoptosis during equine spermatogenesis. Tesis doctoral. Universidad de Texas A&M, Texas, Estados Unidos, pp. 125.
- Heninger NL., 2011. Puberty. En: Mckinnon AO; Squires EL; Vaala WE; Varner DD (Eds) *Equine reproduction*. 2nd ed. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, EE.UU. pp 1015-1025.
- Herrera-Luna CV; Dragos S; Walter I; Aurich C., 2015. Effect of stallion age on the expression of LH and FSH receptors and aromatase P450 in equine male reproductive tissues. *Reproduction, Fertility and Development*. pp 11. doi: 10.1071/RD15027.
- Holland MK; Orgebin-Crist MC., 1988. Characterization and hormonal regulation of protein synthesis by the murine epididymis. *Biology of Reproduction*. 38: 487-496.
- Jiménez LM; Ruibal SV., 2004. Aparato genital masculino. En: Ortiz AG; Rodríguez AB (Eds) *Tratado de histología veterinaria*. Masson S.A, España. pp 363-368.
- Johnson J; Neaves WB., 1981. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biology of Reproduction*. 24: 703-712.
- Johnson L; Thompson Jr DL., 1983. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biology of Reproduction*. 29: 777-789.
- Johnson L; Varner DD; Tatum ME; Scrutchfield WL., 1991a. Season but not age affects Sertoli cell number in adult stallions. *Biology of Reproduction*. 45: 404-410.
- Johnson L; Varner DD; Thompson Jr DL., 1991b. Effect of age and season on the establishment of spermatogenesis in the horse. *Journal of Reproduction and Fertility*. 44: 87-97.
- Johnson L, Carter GK, Varner DD, Taylor TS, Blanchard L, Rembert MS, 1994. The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia. *Journal of Reproduction and Fertility*. 100: 315-321.
- Khamas W; Al-Tikriti M; Albayati M; Tkalcic S; Eng C., 2014. Histological description of the testis, epididymis and ductus deferens of the Northern Great Grey Kangaroo (*Macropus giganteus giganteus*). *Journal of Cytology & Histology*. pp 6. doi: 10.4172/2157-7099.1000287
- Kimura Y; Yanagimachi R., 1995. Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biology of Reproduction*. 53: 855-862.
- Kormano M., 1967. An angiographic study of the testicular vasculature in the postnatal rat. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*. 126: 138-153.

- Love CC; Garcia MC; Riera FR; Kenney RM., 1990. Use of testicular volume to predict daily sperm output in the stallion. En: Proceedings of the 36th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Kentucky, EE.UU. pp 15-21.
- Mendes LQ., 2012. Aspectos Biométricos e histológicos de testículos de garanhões da raça crioula. Tesis de pós-graduação em Medicina Animal, Equinos Laboratório de Reprodução Animal - REPROLAB, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. pp 30.
- Moustafa MNK; Sayed R; Zayed AE; El-Hafeez HH., 2015. Morphological and morphometric study of the development of seminiferous epithelium of donkey (*Equus asinus*) from birth to maturity. *Journal of Cytology & Histology*, 6: 1-8.
- Naden J; Amann RP; Squires EL., 1990. Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behavior in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*. 88: 167176.
- Nishikawa Y., 1955. Studies on the development of the testis and epididymis of the horse II. The development of the epididymis and the properties of sperm collected from epididymis. *Bulletin of the National Institute of Agricultural Science*. 10: 351-364.
- Orgebin-Crist M-C., 1967. Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: fertilizing ability and embryonic mortality in does inseminated with epididymal spermatozoa. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*. 7: 373-389.
- Robaire B; Hinton BT., 2015. The epididymis. En: Plant TM; Zeleznik AJ (Eds.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4ta ed. Academic Press, MO, EE.UU. pp 691771.
- Senger PL., 2012. The organization and function of the male reproductive system. En: Senger PL (Eds) *Pathways to pregnancy and parturition*, 3ra ed. Current Conception, Inc., Orlando, EE. UU. pp 44-79.
- Skinner JD; Bowen J., 1968. Puberty in the Welsh Stallion. *Journal of Reproduction and Fertility*. 16: 133-135.
- Turner TT; Johnston DS; Jelinsky SA; Tomsig JL; Finger JN., 2007. Segment boundaries of the adult rat epididymis limit interstitial signaling by potential paracrine factors and segments lose differential gene expression after efferent duct ligation. *Asian Journal of Andrology*. 9: 565-73.
- Xu B; Lang Y; Ley RJ; Hinton BT., 2010. P-MAPK1/3 and DUSP6 regulate epididymal cell proliferation and survival in a region-specific manner in mice. *Biology of Reproduction*. 83: 807817.
- Yoon MJ; Berger T; Roser JF., 2011. Localization of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) and IGF-I Receptor (IGF-IR) in equine testes. *Reproduction in Domestic Animals*. 46: 221228.