

Barrera Hemato-Testicular del Vampiro (Desmodus rotundus). Estudios con microscopía de luz¹

Elizabeth Peña T.² y Jorge A. Aragón S., M. D.³

EXTRACTO

Se inyectaron endovenosamente vampiros machos, adultos con peroxidasa de rábano, y se extrajeron los testículos a diferentes intervalos de tiempo. Los túbulos seminíferos fueron tratados para revelar la presencia de la peroxidasa en su interior; posteriormente, se procesaron para microscopía de luz. Desde el minuto 1 hasta el 90 el producto de la reacción de la peroxidasa aparece aproximadamente en casi la mitad de las secciones de túbulos observadas por campo. En estos túbulos, la peroxidasa generalmente se localiza solo en ciertos sectores de la pared y del compartimiento basal del epitelio seminífero. En este compartimiento, el producto de la reacción de la peroxidasa aparece en los espacios intercelulares y en las vesículas citoplasmáticas de algunas espermatogonias y de ciertos espermatoцитos preleptoténicos. En todos los cortes observados, el compartimiento adluminal aparece libre de la enzima. A partir del minuto 90, a medida que los intervalos de tiempo aumentan, decrece gradualmente la intensidad de la reacción en los túbulos positivos a la peroxidasa. De los 120 minutos en adelante, la peroxidasa no aparece en ninguno de los cortes.

Kormano¹ consideró que, en analogía con la barrera hemato-encefálica⁶, la barrera hemato-testicular residía en el endotelio de los capilares testiculares. Sin embargo, Mancini et al.⁷ habían encontrado que la difusión de proteínas séricas desde los capilares testiculares al espacio extravascular es relativamente fácil y rápida. Waites y Setchell⁸, por su parte, observaron que en el testículo hay un compartimiento que excluye al rubidio. Posteriormente, Setchell et al.⁹ vieron que este compartimiento corresponde a los túbulos seminíferos. Setchell² había postulado la existencia de una barrera, no ya en el endotelio de los capilares testiculares sino en "algún sitio dentro o alrededor de los túbulos seminíferos". En confirmación de esto último, Setchell et al.⁹ hallaron que, con relación a la barrera hemato-testicular, hay varios grados de permeabilidad a las diferentes moléculas. En efecto, al administrar varias sustancias por vía endovenosa y medir su concentración en el fluido de la rete testis, en el plasma sanguíneo y en la linfa testicular, observaron que todas pasan con facilidad y rapidez de la sangre a la linfa testicular. Sin embargo, el rango de permeabilidad de los túbulos seminíferos a estas sustancias es amplio, pues va desde la total exclusión para unas moléculas hasta la transferencia casi completamente libre para otras.

Fawcett et al.¹⁰ procuraron identificar los componentes morfológicos de la barrera hemato-testicular por la inyección intersticial de diferentes sustancias electrónicamente opacas y obtuvieron resultados variables según el marcador empleado. El carbono y el dióxido de torio quedan excluidos de los túbulos seminíferos, evidentemente por la capa de las células mioides con sus uniones estrechas o zonula occludens que se localiza en la pared tubular. La ferritina y la peroxidasa, moléculas más pequeñas, logran atravesar la capa de las células mioides en ciertas áreas de algunos túbulos y penetran al epitelio seminífero donde se localizan en los espacios intercelulares entre las células de Sertoli y entre las células de Sertoli y las espermatogonias. Sin embargo, estos marcadores en ningún caso penetran en el epitelio seminífero más allá de las espermatogonias. La responsabilidad de este bloqueo efectivo recae sobre las

1. Trabajo financiado por PLAMIRH, Donación No.49.144.2.7.
2. Licenciada en Biología, Magister en Morfología, División de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
3. Profesor, Departamento de Morfología, División de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

INTRODUCCION

Kormano¹ y Setchell², independientemente, en el mismo año, 1967, postularon la existencia de la barrera hemato-testicular. Dada la escasa o nula captación por parte del testículo de colorantes^{1,3}, otras sustancias como la actinomicina-D⁴, y los ácidos ascórbico y dehidroascórbico⁵,

uniones estrechas o zonula occludens que presentan las uniones especializadas de las células de Sertoli.

Dym y Fawcett¹¹, al perfundir nitrato de lantano junto con el fijador, destacaron, igualmente, el papel fundamental de barrera que desempeñan las uniones estrechas, tanto de las células mioides como de las células de Sertoli. Dada la localización de las uniones especializadas de las células de Sertoli, dividieron el epitelio seminífero en 2 compartimientos fisiológicos relativamente aislados: 1) una porción basal, comprendida entre estas uniones y la membrana basal del epitelio seminífero, donde se alojan las espermatozonias y los espermatoцитos preleptoténicos, y 2) el compartimiento adluminal, situado entre estas uniones y la luz del túbulo y que contiene las restantes células de la serie espermatogénica.

La permeabilidad de los túbulos seminíferos a la peroxidasa de rábano¹² que es una proteína con propiedades de enzima de bajo peso molecular (40,000) y poco diámetro (20 Å), se ha estudiado hasta el presente en el cobayo¹⁰, el mono¹³, el ratón¹⁴ y la rata¹⁵. Los resultados similares obtenidos en estos mamíferos destacan el importante papel que juegan en la barrera hemato-testicular las uniones estrechas de las células mioides y, muy especialmente, el bloque eficaz que presentan las uniones de las células de Sertoli.

Cabe recalcar la importancia que tiene la barrera hemato-testicular dentro de la idea de la anticoncepción masculina. En efecto, Mancini et al.¹⁶ observaron que la hormona folículo-estimulante (FSH) que se marca e inyecta endovenosamente no se capta por todos los túbulos seminíferos sino que aparece en la pared de unos cuantos solamente, demostrando esto que la hormona es tomada en forma selectiva. Dado el control que sobre la espermatogénesis ejerce la FSH, si se logra activar completamente la barrera para ésta, se podría obtener una esterilidad reversible pues los individuos conservarían intactas sus características sexuales secundarias y su líbido.

El presente trabajo se concretó al estudio de la permeabilidad de los túbulos seminíferos del vampiro (*Desmodus rotundus*) a la peroxidasa con el fin de determinar, en primera instancia, la existencia de la barrera hemato-testicular en esta especie y, en segundo lugar, en caso de encontrarla, cuáles serían sus características morfológicas.

MATERIALES Y METODOS

Animales. Se utilizaron 16 vampiros, *Desmodus rotundus*, machos, adultos (peso entre 33 y 38 gr), 15 para el estudio y 1 como control.

Inyección de Peroxidasa. Para anestésiar a cada vampiro se inyectó por vía intraperitoneal 1.2 mg de pentobarbital sódico (Nembutal^R, Abbott). A los animales de experimentación se les dio una sola dosis de peroxidasa de rábano (Sigma Chemical Co.) que se preparó disolviendo entre 7 y 8 mg de la enzima en 0.1 ml de agua destilada. De esta forma

los *Desmodus* recibieron 2 a 3 mg de peroxidasa por cada 10 gr de peso corporal. La inyección de la peroxidasa se efectuó por vía endovenosa a través de los cuerpos cavernosos. Al vampiro control no se le administró peroxidasa.

Extracción de los tejidos. Mediante una incisión escrotal, se extrajeron los testículos a intervalos de tiempo que variaban entre 1 y 180 minutos después de inyectada la peroxidasa. Los dos testículos de un mismo animal fueron extraídos a intervalos de tiempo distintos.

Fijación. Los testículos, se fijaron por inmersión durante 4 a 5 horas a 4°C en una solución de glutaraldehído al 2.5% en fosfato tamponado 0.1 M, pH 7.5. Se dejaron durante toda la noche a 4°C en una solución de sacarosa al 5% en fosfato tamponado 0.1 M, pH 7.5 y se pasaron luego a fosfato tamponado 0.1 M, pH 7.5 hasta el momento de ser sometidos al resto del proceso.

Reacción para revelar peroxidasa. Con pinzas y agujas se aislaron manualmente los túbulos seminíferos, para procesarlos de acuerdo con la técnica desarrollada por Graham y Karnovsky¹⁷ a fin de revelar la presencia de la peroxidasa en el interior de los tejidos. Esta técnica se modificó en el presente estudio según los pasos 1 y 2 que se describen a continuación, con objeto de obtener una reacción mejor de la peroxidasa y su sustrato para facilitar así el estudio de los cortes en la microscopía de luz. Los túbulos seminíferos fueron procesados de la siguiente forma:

1. Se colocaron en una solución saturada de 3,3' - diaminobencidina (Sigma Chemical Co.) en tampón tris -HCl 0.05M, pH 7.5, que se prepara agregando 2 a 3 mg de 3,3' - diaminobencidina a 10 ml de tampón tris -HCl y filtrando luego. En este medio se colocan los tejidos durante 1 hora, a 4°C, con el fin de obtener una completa penetración de la sustancia oxidable.
2. Después se dejaron los tejidos durante 1 hora, a 4°C, en una solución saturada de 3, 3' -diaminobencidina y H₂ O₂ al 0.001% en tampón tris -HCl 0.05 M, pH 7.5, de acuerdo con la modificación introducida por Nakane y Pierce¹⁸ a la técnica de Graham y Karnovsky¹⁷. Con este paso se logra la adecuada penetración del sustrato (H₂O₂) al interior del tejido.
3. Seguidamente, se colocaron los tejidos durante 30 minutos a temperatura ambiente en un medio de incubación igual al descrito en el paso 2 con el fin de permitir la actividad enzimática de la peroxidasa.

Los túbulos seminíferos utilizados como controles se sometieron al mismo proceso que el de los túbulos experimentales.

Deshidratación e inclusión. Para deshidratar los túbulos seminíferos se pasaron por alcoholes de grado creciente

y por una mezcla de alcohol-xilol y xilol solo, y se incluyeron luego en parafina. Posteriormente se cortaron a 5 micras.

Coloración. Algunos cortes se contrastaron con una solución verde luz al 1% y otros se dejaron sin colorear. A manera de ensayo se colorearon algunos cortes con hematoxilina-eosina, obteniéndose resultados satisfactorios en cuanto a la localización de la peroxidasa y la delimitación de los contornos celulares y nucleares.

RESULTADOS

Al minuto de inyectada la peroxidasa alcanza los vasos testiculares, de donde pasa al tejido intersticial. La pared de algunos túbulos seminíferos toma la peroxidasa en determinados sectores, mientras que otros permanecen totalmente libres de la enzima (Figura 1). En los túbulos donde penetra la peroxidasa, se observa que solo la captan algunas células del compartimiento basal del epitelio seminífero. Estas células corresponden a espermatogonias, y, en ellas, la proteína se localiza en vesículas citoplasmáticas claramente definidas. Es de recalcar que la peroxidasa no sobrepasa los límites del compartimiento basal y que, por tanto, el compartimiento adluminal del epitelio seminífero permanece libre de la enzima.

A los 3 minutos, la peroxidasa aparece en un número mayor de túbulos, pero ciertas porciones de la pared tubular quedan libres de ella. En algunos sectores del túbulo, la enzima se hace presente en las células del compartimiento basal (Figura 2), mientras que en otros invade la pared tubular y los espacios intercelulares entre las células de Sertoli y las espermatogonias.



Figura 1. Microfotografía de luz de secciones transversales de túbulos seminíferos del vampiro, un minuto después de inyectada la peroxidasa. Las flechas señalan algunos sectores de la pared del túbulo seminífero que han captado peroxidasa. Otros segmentos de la pared y los demás túbulos no presentan el producto de reacción de la peroxidasa. X200.

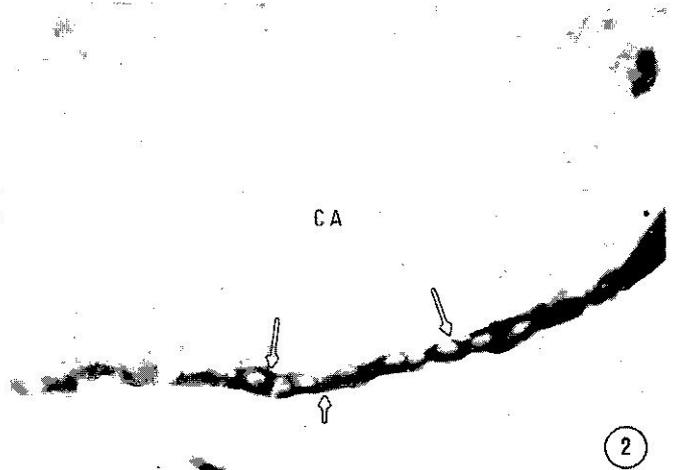


Figura 2. Microfotografía de luz de una porción del epitelio y de la pared de un túbulo seminífero del vampiro, 3 minutos después de inyectada la peroxidasa. El producto de reacción de la peroxidasa se presenta en la pared tubular (flecha corta) y en algunas células del compartimiento basal (flechas largas). Las células del compartimiento adluminal (CA) no contienen peroxidasa. X400.

A los 5 minutos, el fenómeno de captación de la peroxidasa por parte de los túbulos seminíferos es semejante al descrito para los tiempos anteriores. Es decir, en determinados sectores de la pared y del compartimiento basal de un mismo túbulo, aparece el producto de reacción de la peroxidasa, mientras que la proteína no penetra en otros sectores.

Gradualmente, al aumentar los intervalos de tiempo, crece la intensidad de la respuesta a la peroxidasa, para llegar a su máximo 30 minutos después de la inyección.

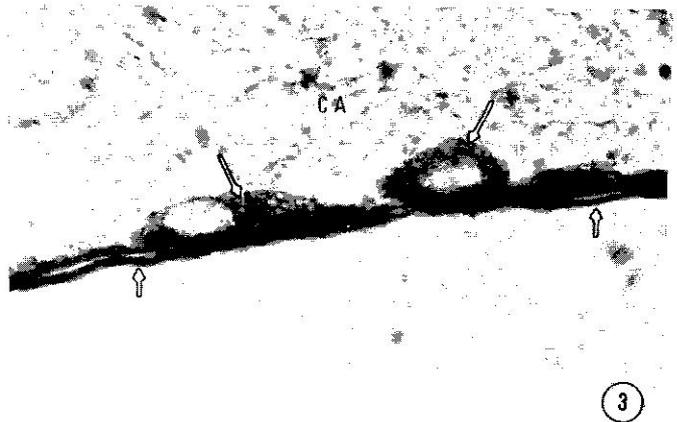


Figura 3. Microfotografía de luz de una porción de túbulo seminífero del vampiro, 30 minutos después de la inyección de peroxidasa. El producto de reacción de la peroxidasa se localiza en las capas lamelares externa e interna de la pared tubular (flechas cortas) y en el compartimiento basal, dentro de algunas espermatogonias. En estas células la peroxidasa está contenida en vesículas citoplasmáticas (flechas largas). El compartimiento adluminal (CA) permanece libre de la enzima. X1000.

De los 10 a los 30 minutos continúa la captación de la peroxidasa por parte de algunos túbulos seminíferos y, al igual que en los tiempos anteriores, la proteína queda limitada solamente a ciertos sectores. La enzima se localiza en la pared tubular en donde invade las capas lamelares externa e interna, pasando de esta última al compartimiento basal. Dentro del compartimiento basal, algunas espermatogonias captan la peroxidasa y aparece su producto de reacción en vesículas citoplasmáticas (Figura 3). Además de ser incorporada a las espermatogonias, también la captan las células más profundas del compartimiento basal, o sea, los espermatocitos preleptoténicos (Figura 4).

A los 60 minutos, la peroxidasa todavía se presenta en algunos sectores de la pared de unos cuantos túbulos seminíferos. Sin embargo, la reacción es poco intensa, y ofrece un aspecto similar al observado en los tiempos iniciales (Figura 5).

A los 90 minutos, la peroxidasa ha desaparecido totalmente del compartimiento basal y solo es posible observar una débil reacción en algunos sectores de la pared tubular.

De los 120 minutos en adelante, el producto de reacción de la peroxidasa no aparece en ninguno de los componentes del túbulo seminífero.

Los controles efectuados resultaron negativos para la peroxidasa. Por consiguiente, a nivel de microscopía óptica no es posible descubrir la presencia de peroxidasa endógena en ninguno de los elementos del túbulo seminífero.

DISCUSION

Graham y Karnovsky¹⁷ aprovecharon las propiedades enzimáticas de la peroxidasa para obtener un producto de reacción a partir de la oxidación de la 3, 3'-diaminobendicina, por intermedio del H_2O_2 . Este producto de reacción se visualiza fácilmente bajo el microscopio de luz debido a su color marrón; además, al fijar los cortes con tetróxido de osmio (OsO_4) el producto de reacción se vuelve denso al haz de electrones y aparece en las microfotografías como un punteado negro fino. Dado el efecto amplificador de la peroxidasa, esta enzima ofrece también la ventaja de que se pueden descubrir cantidades ínfimas de ella con sólo aumentar la cantidad de sustrato y sustancia oxidable o el tiempo de incubación de los tejidos en estas sustancias, lo cual hace de ésta una técnica de alta sensibilidad¹⁷.

En ratas y en cobayos la peroxidasa produce aumento en la permeabilidad de las vénulas, debido a que estimula la liberación de histamina y serotonina por parte de los mastocitos¹⁹. Sin embargo, en los ratones las dosis adecuadas de peroxidasa no inducen la liberación de estas aminas²⁰. Al medir los cambios de presión arterial como prueba indirecta de estos efectos producidos por la peroxidasa en ratas de diferentes cepas y en el hamster sirio, los resultados son variables según la especie, el tipo de peroxidasa y el tipo de anestésico empleados²¹. En el presente trabajo, los

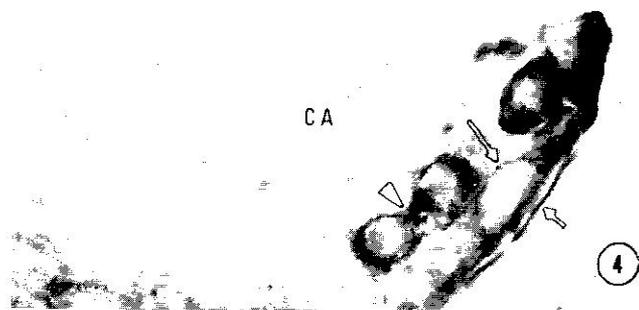


Figura 4. Microfotografía de luz de una porción de la pared y del epitelio de un túbulo seminífero del vampiro, 30 minutos después de la inyección de la peroxidasa. El producto de reacción de la peroxidasa aparece en las capas lamelares externa e interna de la pared tubular (flecha corta). La peroxidasa ha sido captada por las células que están más próximas a la pared tubular, espermatogonias (flecha larga), y por células localizadas más profundamente en el compartimiento basal, que corresponden a los espermatocitos preleptoténicos (triángulo). El producto de reacción de la peroxidasa no aparece en el compartimiento adluminal (CA). X1000.

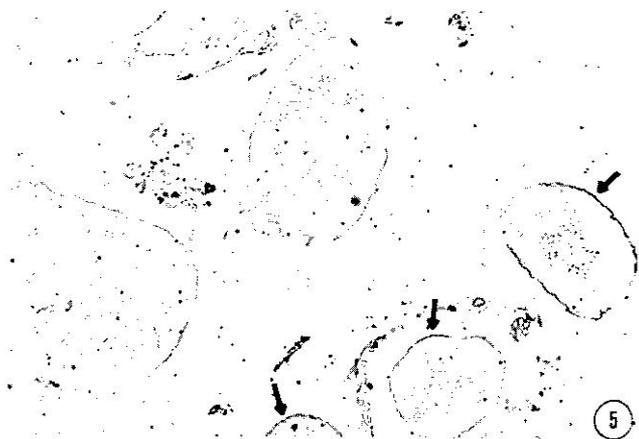


Figura 5. Microfotografía de luz de secciones transversales de túbulos seminíferos del vampiro, 60 minutos después de la inyección de peroxidasa. El producto de reacción de la peroxidasa aparece en algunos túbulos, en determinados sectores de la pared tubular (flechas). Sin embargo, la reacción de la peroxidasa es muy débil, y la proteína no aparece en la mayoría de los túbulos. X200.

vampiros recibieron dosis de peroxidasa demostradas como no tóxicas en otros animales^{20,21}.

Durante el proceso histoquímico de los tejidos, la peroxidasa se puede difundir de los sitios originales donde penetró *in vivo* y adherirse en forma inespecífica a otras estructuras citoplasmáticas. Con el fin de evitar estos artefactos de

difusión Straus²² adiciona una solución hipertónica de sacarosa a los medios de fijación y de lavado. En el presente caso, se siguió el procedimiento indicado por Graham y Karnovsky¹⁷ según el cual, después de fijar los tejidos en glutaraldehído, se lavan por lo menos durante 12 horas en fosfato tamponado que contiene sacarosa al 5%.

En el presente trabajo se comprobó que las modificaciones hechas a la técnica de Graham y Karnovsky¹⁷ son efectivas y permiten procesar túbulos seminíferos enteros. Los resultados en el vampiro demuestran que la captación de la peroxidasa por parte de los túbulos seminíferos es bastante precoz pues al minuto de inyectada se encuentra en la pared y en el compartimiento basal de algunos túbulos. Esto indica que la peroxidasa pasa fácil y rápidamente de los capilares testiculares al tejido intersticial y, en forma igualmente veloz, se difunde por este último hasta alcanzar los túbulos seminíferos. Por esta razón, aunque no se observaron cortes de testículos enteros, se puede deducir que los capilares testiculares y los distintos elementos del tejido intersticial no bloquearon el paso de la peroxidasa en forma efectiva.

El hecho de utilizar túbulos seminíferos enteros en lugar de los pequeños bloques de tejido (40-50 micras de espesor) que hasta el momento se han empleado, hizo necesario introducir algunas modificaciones a la técnica de Graham y Karnovsky¹⁷. Estas modificaciones consistieron, básicamente, en exponer por más tiempo los túbulos seminíferos al medio de incubación, y tuvieron por objeto permitir la penetración adecuada del sustrato (H_2O_2) y la sustancia oxidable (3, 3'-diaminobencidina) al interior de los túbulos. Para ello los túbulos seminíferos enteros, aislados manualmente se incubaron previamente con 3, 3'-diaminobencidina, sola y con H_2O_2 , por 2 horas en total pero a una temperatura (4°C) a la cual la enzima está prácticamente inactiva. Cuando se logra una penetración completa del sustrato y de la sustancia oxidable en todo el espesor del túbulo, se evita que tales compuestos queden limitados a las estructuras más externas del túbulo lo cual lleva a la obtención de resultados erróneos.

Por consiguiente, en el vampiro queda descartado el posible papel de barrera de estas estructuras, por lo menos para la peroxidasa. Resultados similares se han visto con esta enzima en especies diferentes como el cobayo¹⁰, el ratón¹⁴ y el mono¹³.

La ultraestructura de los capilares testiculares del vampiro, seguramente es similar a la de otras especies. Es decir, puede haber un endotelio continuo como el de los capilares musculares, pero sin que las células endoteliales ofrezcan ningún tipo de unión especializada. Según Fawcett et al.¹⁰, a juzgar por la ultraestructura de los capilares testiculares en diferentes especies, hay una permeabilidad vascular semejante a la de los capilares musculares, que es intermedia entre la permeabilidad baja de los capilares cerebrales y la alta de los capilares fenestrados que se encuentran en casi todas las glándulas endocrinas, en el glomérulo renal y en la mucosa intestinal.

En el vampiro, la peroxidasa se acumula rápidamente en la pared o lámina propia de los túbulos seminíferos. Sin

embargo, apenas casi la mitad de las secciones transversales observadas por campo son positivas a la peroxidasa. En tales casos, la peroxidasa no invade la pared tubular en toda su extensión sino que aparece en algunos sectores, a manera de parches.

Con respecto a esto, Fawcett, et al.¹⁰ informan que la permeabilidad de los túbulos seminíferos del cobayo a la ferritina y a la peroxidasa no es uniforme, y Dym y Fawcett¹¹ encuentran el mismo fenómeno en la permeabilidad de los túbulos seminíferos de la rata al nitrato de lantano. Aragón²³ por su parte, al observar en ratones que la peroxidasa es captada únicamente por algunos túbulos y sólo por determinadas zonas de la pared de un mismo túbulo, postula la existencia a nivel de la pared tubular de una barrera relativa "la cual podría ser uniforme para todo un túbulo, o sectorial, para parte de él".

En la permeabilidad de la pared tubular a ciertas sustancias juega papel primordial la capa interlamelar o capa de células mioides. En especies como el cobayo¹⁰, la rata^{24,11}, el ratón²³ y el hamster²⁵, en algunos sectores de la pared tubular, las células mioides presentan áreas limitadas de estrecho contacto entre las hojuelas externas de sus membranas citoplasmáticas, con lo cual se forman uniones especializadas del tipo zonula occludens²⁶ y prácticamente se oblitera el espacio intercelular. En estos mamíferos, el paso de marcadores como el nitrato de lantano, la peroxidasa y la ferritina hacia la capa lamelar interna queda impedido por las uniones especializadas de las células mioides. En contraste, la pared del túbulo seminífero del mono, semejante a la del túbulo seminífero del hombre, presenta de 3 a 5 capas de células mioides y no se encuentran uniones estrechas entre 2 células mioides vecinas. En este caso, la peroxidasa y el nitrato de lantano penetran fácilmente al epitelio seminífero atravesando esta capa de células contractiles peritubulares¹³.

Las células mioides también presentan numerosas vesículas de pinocitosis asociadas con las superficies externa e interna de sus membranas citoplasmáticas^{11,23-25}. Este transporte vesicular constituye otra vía de acceso al epitelio seminífero además del paso a través de los espacios intercelulares abiertos de las células mioides.

Entonces es lícito pensar que en el vampiro la peroxidasa invade determinados segmentos de la pared tubular, bien sea a través de los espacios intercelulares abiertos de las células mioides, o mediante el transporte vesicular que pueden ofrecer estas células. Además, en el vampiro, las secciones transversales de los túbulos seminíferos que muestran peroxidasa en su pared, casi siempre también la presentan dentro del compartimiento basal del epitelio seminífero. Este fenómeno ocurre desde los primeros minutos después de la inyección de la peroxidasa y sigue hasta los 60 minutos, aproximadamente.

En el cobayo¹⁰, la rata¹¹ y el mono¹³, una vez que el marcador se acumula en la pared tubular, más concretamente en la membrana basal del epitelio seminífero, comienza a pasar

hacia el interior del epitelio, cursando por los espacios intercelulares existentes tanto entre las células de Sertoli como entre las células de Sertoli y las espermatogonias. Inclusive, con poco aumento se han observado algunas espermatogonias rodeadas en todo su contorno por una fina línea de marcador. Sin embargo, en estos mamíferos el marcador se detiene a corta distancia por encima de las espermatogonias debido a la presencia a ese nivel de las uniones especializadas de las células de Sertoli. En estas especies, entonces, el marcador queda restringido en los espacios intercelulares del compartimiento basal, pues las uniones especializadas de las células de Sertoli impiden su paso hacia el compartimiento adluminal.

En el vampiro es probable que la peroxidasa haya penetrado en el compartimiento basal siguiendo por sus espacios intercelulares, aunque no es posible determinar esto con certeza por la baja resolución del microscopio de luz. Es de recalcar, sin embargo, que así como en las especies arriba mencionadas, en el vampiro la peroxidasa queda limitada al compartimiento basal, siendo excluida por completo del compartimiento adluminal del epitelio seminífero.

La incorporación del marcador por parte de las células de Sertoli y de algunas células germinativas se ha informado con anterioridad. Reddy y Svoboda²⁷ encuentran en la rata que la peroxidasa, en forma de vesículas de pinocitosis, se acumula inicialmente en el citoplasma de las células de Sertoli tanto en su parte basal como en sus ramificaciones citoplasmáticas y que, algunos minutos después, se ve también en el citoplasma de las células germinativas. Fawcett et al.¹⁰ observan en el cobayo que, ocasionalmente, la ferritina y la peroxidasa aparecen en pequeñas vesículas en el citoplasma de algunas células de Sertoli y de algunas espermatogonias y asumen que estos marcadores fueron tomados de los espacios intercelulares por micropinocitosis. Aragón y Lustig¹⁴ comunican que la célula de Sertoli del ratón capta la peroxidasa de la membrana basal del epitelio seminífero y de los espacios intercelulares del compartimiento basal e, igualmente, señalan en el citoplasma de algunas espermatogonias vesículas de pinocitosis que contienen peroxidasa. Por su parte, Willson et al.²⁸ observan en cobayos que la peroxidasa se distribuye en forma difusa por el citoplasma de algunas células de Sertoli y de algunas espermatogonias solo cuando se administra previamente adyuvante completo de Freund.

En este trabajo, algunas secciones de los túbulos seminíferos presentan la peroxidasa incorporada de manera evidente al citoplasma de ciertas espermatogonias y de varios espermatozoides preleptoténicos. En ambos tipos de células, el producto de reacción de la peroxidasa aparece en vesículas citoplasmáticas. Aunque en el vampiro el producto de reacción de la peroxidasa está en el compartimiento basal de algunos túbulos seminíferos, en ningún corte se observa que rebasa los límites de este compartimiento. Por tanto, con las experiencias anteriores en ratas^{11,15}, ratones¹⁴, monos¹³ y con la presente en vampiros, se hace notorio el papel primordial que juegan las uniones especializadas de las células de Sertoli en la barrera hemato-testicular. Estas uniones

especializadas son, en verdad, el componente más efectivo de la barrera hemato-testicular. En efecto, ellas bloquean por completo el paso hacia el compartimiento adluminal y a la luz del túbulo, de las sustancias que han penetrado dentro del epitelio seminífero a través de los espacios intercelulares del compartimiento basal.

Finalmente en los túbulos seminíferos del vampiro la reacción de la peroxidasa empieza a hacerse débil a partir de los 60 minutos después de inyectar la enzima. En forma gradual, la intensidad de la reacción va disminuyendo hasta que, de 2 horas en adelante, el producto de reacción de la peroxidasa no aparece en ninguna de las secciones de túbulos seminíferos que se estudiaron. Es posible que este fenómeno se deba a 2 factores. En primer lugar, la cantidad de peroxidasa que llega a los túbulos disminuye con el tiempo debido a que la enzima va desapareciendo gradualmente del torrente sanguíneo. En segundo lugar, la peroxidasa que alcanzó a ser captada por los túbulos seminíferos en los minutos iniciales empieza a ser metabolizada después de algún tiempo por las distintas células que la tomaron. Straus²⁹ encontró que en la rata, en un lapso de 4 horas entre 30% y 35% de la cantidad de peroxidasa que se inyectó se excreta en la orina, 6% de la proteína es incorporada por el riñón y algo más de 10% por el hígado. Esto indica que la peroxidasa exógena desaparece gradualmente del plasma sanguíneo bien sea porque es captada por diversos órganos que la metabolizan o porque se elimina como tal en la orina.

En el presente estudio se demuestra la existencia de la barrera hemato-testicular en el vampiro. Según es posible concluir, dadas las limitaciones del microscopio de luz, esta barrera se ajusta a los patrones descritos hasta el momento para otras especies.

SUMMARY

Adult, male, vampire bats were intravenously injected with horseradish peroxidase; the testes were extracted at different time intervals after injection. Seminiferous tubules were treated to reveal presence of peroxidase in their interior and were then processed for light microscopy. In the intervals between 1 and 90 minutes, reaction product appears in, approximately, half of the tubules sections observed by field. In these tubules, peroxidase is usually localized in only certain sectors of the wall and the basal compartment of the seminiferous epithelium. At the basal compartment, peroxidase reaction product appears in the intercellular spaces and in cytoplasmic vacuoles of some spermatogonia and preleptotene spermatocytes. In all of the tissue sections observed, the adluminal compartment appears free of the protein. As the time intervals get larger, the intensity of the reaction in the peroxidase-positive tubules gradually diminishes. From 120 minutes on, peroxidase no longer appears in any of the tubules.

REFERENCIAS

1. Kormanó, M. Dye permeability and alkaline phosphatase activity of testicular capillaries in the postnatal rat. *Histochemie* 9: 327-338, 1967.
2. Setchell, B. P. The blood-testicular fluid barrier in sheep. *J Physiol (London)*, 189: 63, 1967.
3. Kormanó, M. Penetration of intravenous trypan blue into the rat testis and epididymis. *Acta Histochem Bd* 30: 133-136, 1968.
4. Ro, T. S. y Busch, H.: Concentration of ^{14}C -actinomycin D in various tissues following intravenous injection. *Biochim Biophys Acta* 108: 317-318, 1965.
5. Hammarström, L. Autoradiographic studies on the distribution of ^{14}C -labeled ascorbic acid and dehydroascorbic acid. *Acta Physiol Scand* 70: 289, 1966.
6. Reese, T. S. y Karnovsky, M. J. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34: 207-217, 1967.
7. Mancini, R. E., Vilar, O., Alvarez, B. y Seiguer, A. C.: Extra-vascular and intratubular diffusion of labeled serum proteins in the rat testis. *J Histochem Cytochem* 13: 376-385, 1965.
8. Waites, G. M. H. y Setchell, B. P.: Changes in blood flow and vascular permeability of the testis, epididymis and accessory reproductive organs of the rat after the administration of cadmium chloride. *J Endocrin* 34: 329-342, 1966.
9. Setchell, B. P., Voglmayr, J. K. y Waites, G. M. H.: A blood-testis barrier restricting passage from blood into rete testis fluid but not into lymph. *J Physiol* 200: 73-85, 1969.
10. Fawcett, D. W., Leak, L. V. y Heidger, P. M.: Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J Reprod Fert* 10: 105-122, 1970.
11. Dym, M. y Fawcett, D. W.: The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Rep* 3: 308-326, 1970.
12. Keilin, D. y Hartree, E. F.: Purification of horseradish peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methaemoglobin. *Biochem J* 49: 88-104, 1951.
13. Dym, M.: The fine structure of the monkey (*Macaca*) Sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier. *Anat Rec* 175: 639-656, 1973.
14. Aragón, J. A. y Lustig, L.: Uptake of horseradish peroxidase by the testis and epididymis of mice. II. Electron microscopic study of the testis. *J Reprod Fert* 33: 189-195, 1973.
15. Vitale, R., Fawcett, D. W. y Dym, M.: The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. *Anat Rec* 176: 333-344, 1973.
16. Mancini, R. E., Castro, A. y Seiguer, A. C.: Histologic localization of follicle-stimulating and luteinizing hormones in the rat testis. *J Histochem Cytochem* 15: 516-525, 1967.
17. Graham, R. C. y Karnovsky, M. J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* 14: 291-302, 1966.
18. Nakane, P. K. y Pierce, G. B.: Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J Cell Biol* 33: 307-318, 1967.
19. Cotran, R. S. y Karnovsky, M. J.: Vascular leakage induced by horseradish peroxidase in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 126: 557-561, 1967.
20. Karnovsky, M. J.: The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J Cell Biol* 35: 213-236, 1967.
21. Deimann, W., Taugner, R. y Fahimi, H. D.: Arterial hypotension induced by horseradish peroxidase in various rat strains. *J Histochem Cytochem* 24: 1213-1217, 1976.
22. Straus, W. Factors affecting the state of injected horseradish peroxidase in animal tissues and procedures for the study of phagosomes and phagolysosomes. *J Histochem Cytochem* 12: 470-480, 1964.
23. Aragón, J. A.: Permeabilidad del túbulo seminífero del ratón a la peroxidasa. Tesis de Doctorado en Biología de la Reproducción. Universidad de Buenos Aires, 1972.
24. Clermont, Y.: Contractile elements in the limiting membrane of the seminiferous tubules of the rat. *Exp Cell Res* 15: 438-440, 1958.
25. Burgos, M. H., Vitale-Calpe, R. y Aoki, A.: Fine structure of the testis and its functional significance. In *The Testis*, ed. A. D. Johnson, W. R. Gómez y N. L. Vandemark, Academic Press, N. Y., 1: 551-649, 1970.
26. Farquhar, M. G. y Palade, G. E. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17: 375-411, 1963.
27. Reddy, J. K. y Svoboda, D. J.: Peroxidase transport by Sertoli cells of the rat testis. *J Cell Biol* 35: 184A, 1967.
28. Willson, J. T., Jones, N. A., Katsh, S. y Smith, S. W.: Penetration of the testicular-tubular barrier by horseradish peroxidase induced by adjuvant. *Anat Rec* 176: 85-100, 1973.
29. Straus, W.: Comparative analysis of the concentration of injected horseradish peroxidase in cytoplasmic granules of the kidney cortex, in the blood, urine and liver. *J Cell Biol* 48: 620-632, 1971.