



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“MORFOLOGÍA GENERAL E IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE  
CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL APARATO  
REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS CLÍNICAMENTE SANOS”**

**T E S I S  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE  
LA SALUD ANIMAL**

**P R E S E N T A :  
GABRIELA CASTILLO HERNÁNDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL  
FES-CUAUTITLÁN Dr. JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
FES-CUAUTITLÁN Dr. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR  
FMVZ Dra. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA**

**MÉXICO, D.F. FEBRERO 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

***Dedicada:***

***A mi padre Antonio Castillo Reyes***

***A mi madre Erika Mangler Hernández Montejo***

***A mis hermanos Laura y Axel Jesus Castillo Hernández***

***A mi querido Omar Salvador***

“No es el conocimiento, sino el acto de aprendizaje; y no la posesión, sino el acto de llegar a ella, lo que concede el mayor disfrute”.

Carl Friedrich Gauss

“Mide lo que sea medible y haz medible lo que no lo sea”

Galileo Galilei

## **Agradecimientos institucionales:**

A la FES Cuautitlán UNAM, por el financiamiento al proyecto que me permitió realizar mis estudios de maestría, en la Cátedra **GC-01 PATOLOGÍA y ENFERMEDADES DE LOS RUMIANTES.**

.

Al Laboratorio de Bacteriología del CENID-Microbiología INIFAP y al Laboratorio de Investigación Morfología Veterinaria y Biología Celular donde se desarrollaron los trabajos de investigación.

A los integrantes del comité tutorial: Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez, Dr. Carlos Gerardo García Tovar y Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda por la orientación de esta tesis.

A los miembros del jurado: Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez, Dr. Humberto Alejandro Martínez Arellano, Dra. Beatriz Arellano Reynoso, Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat, Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello por haber revisado esta tesis haciendo valiosos comentarios.

Al personal del laboratorio del CENID-Microbiología INIFAP: Dr. Efrén Díaz Aparicio, Dra. Gabriela Palomares, Dr. Francisco Morales por su apoyo para el diagnóstico serológico.

Agradecer también al Dr. Germán Isauro Garrido Fariña responsable del Laboratorio de Investigación Morfología Veterinaria y Biología Celular por facilitar en todo momento el trabajo en el laboratorio y por su colaboración en diferentes etapas del proyecto.

Agradecimientos personales:

A Dios por iluminarme en el camino de la Veterinaria y la Ciencia.

A mis padres por todo su apoyo, confianza y cariño incondicional en todo momento.

A mis hermanitos queridos por permitirme ser un ejemplo en su vida, Laura y Axel.

Al Dr. Jorge Tortora por brindarme la oportunidad como su ayudante y colaborar en este proyecto de tesis.

Al Dr. Germán Garrido por tenerme paciencia y por su apoyo en todo momento.

A mis queridos amigos del Laboratorio: Sra. Dra. Reina, Sra. Leo, Dra. Tere, Toñito, Beto y Prof. Chayito por todos esos momentos felices en el laboratorio.

A la memoria de mi gran amiga Sra. Dra. Lúlu, por todos sus consejos, pláticas y ayudas en mi deberes de laboratorio, que dondequiera que este, se que está muy feliz y contenta.

A mis primitos Ramón y Alejandro por los buenos momentos en estos últimos años.

A mis amiguitos René, Liliana Ester, Liliana Sánchez, por todas su porras y consejos.

A Víctor y José Luis por su amistad y apoyo.

A mi muy queridísimo Omar Salvador por estar a mi lado.

A mi estimada FES-Cuautitlán-UNAM

Y a todos y todas que de alguna forma ayudaron directa o indirectamente en este trabajo.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO.....	5
2.1. TESTÍCULO.....	5
2.2. EPIDÍDIMO.....	7
2.3. CONDUCTO DEFERENTE.....	7
2.4. URETRA.....	8
2.5. PENE.....	8
2.6. PREPUCIO.....	9
2.7. GLÁNDULAS ANEXAS.....	9
2.7.1. Ámpulas del conducto deferente.....	9
2.7.2. Vesícula seminal.....	10
2.7.3. Glándula bulbouretral.....	10
2.7.4. Próstata diseminada.....	11
3. INMUNIDAD EN LAS MUCOSAS.....	12
3.1. DEFENSAS INNATAS EN LA SUPERFICIE DE MUCOSAS...	12
3.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA DE LAS SUPERFICIES MUCOSAS.....	13
3.3. TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LAS MUCOSAS .....	14
3.4. LINFOCITOS DE MUCOSAS.....	14
4. RESPUESTA INMUNE EN EL APARATO REPRODUCTOR.....	15
4.1. CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE EN EL TESTÍCULO.....	15
4.2. CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE EN EL EPIDÍDIMO.....	16
4.3. CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE EN LA VESÍCULA SEMINAL.....	17
4.4. CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE EN GLÁNDULA BULBOURETRAL.....	17

4.5.	CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE EN LA PRÓSTATA.....	18
4.6.	CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA URETRA.....	18
4.7.	CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE EN LA URETRA PÉLVICA DEL CARNERO.....	19
4.8.	LEUCOCITOSPERMIA.....	19
5.	<b>TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE.....</b>	<b>21</b>
6.	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>22</b>
7.	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>23</b>
8.	<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>23</b>
9.	<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>23</b>
10.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
10.1.	ANIMALES.....	25
10.2.	TOMA DE MUESTRAS.....	25
10.3.	PRUEBA DE TARJETA.....	26
10.4.	INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR (IDGA).....	26
10.5.	MEDICIÓN Y PESAJE DE LAS GLÁNDULAS ANEXAS.....	26
10.6.	INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE MACRÓFAGOS+, CÉLULAS PLASMÁTICAS IgA+, IgG+ E IgM+ EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS.....	27
10.7.	INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE LINFOCITOS CD4+ Y CD8+ EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS.....	28
10.8.	CONTEO CELULAR.....	30
10.9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
11.	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
11.1.	RESULTADOS SEROLÓGICOS.....	33
11.2.	RESULTADOS MORFOMÉTRICOS.....	33
11.3.	PRESENCIA DE CÉLULAS INFLAMATORIAS EN EL	

	CONTENIDO URETRAL SEMINAL.....	35
<b>11.4.</b>	<b>DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DEL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS.....</b>	<b>37</b>
	<b>11.4.1. Testículo.....</b>	<b>38</b>
	<b>11.4.2. Cabeza del epidídimo.....</b>	<b>40</b>
	<b>11.4.3. Cuerpo del epidídimo.....</b>	<b>42</b>
	<b>11.4.4. Cola del epidídimo.....</b>	<b>44</b>
	<b>11.4.5. Uretra.....</b>	<b>46</b>
	<b>11.4.6. Ámpula del conducto deferente.....</b>	<b>48</b>
	<b>11.4.7. Vesícula seminal.....</b>	<b>50</b>
	<b>11.4.8. Glándula bulbouretral.....</b>	<b>52</b>
	<b>11.4.9. Próstata diseminada.....</b>	<b>54</b>
<b>11.5.</b>	<b>DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS+ PRESENTES EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS.....</b>	<b>56</b>
<b>11.6.</b>	<b>DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS LINFOCITOS CD4+ Y CD8+ PRESENTES EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS .....</b>	<b>63</b>
<b>11.7.</b>	<b>DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS IgG+, IgA+ E IgM+ PRESENTES EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS.....</b>	<b>68</b>
<b>12.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>76</b>
<b>13.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>83</b>
<b>14.</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>84</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>91</b>



## ÍNDICE DE CUADROS

### 10. MATERIAL Y MÉTODOS

10.6.	INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE MACRÓFAGOS+, CÉLULAS PLASMÁTICAS IgA+, IgG+ E IgM+ EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS	
	<b>CUADRO 1.</b> CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS EN LA INMUNOFLUORESCENCIA.....	28
10.7.	INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE LINFOCITOS CD4+ Y CD8+ EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS	
	<b>CUADRO 2.</b> CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	29
11.	RESULTADOS	
11.1	RESULTADOS SEROLÓGICOS	
	<b>CUADRO 3.</b> RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS EN LOS 62 ANIMALES MUESTREADOS, PORCENTAJES DE ANIMALES POSITIVOS.....	33
11.2	RESULTADOS MORFOMÉTRICOS	
	<b>CUADRO 4.</b> NÚMERO PROMEDIO DE LAS MEDIDAS Y PESOS DE LAS GLÁNDULAS ACCESORIAS DE LOS GRUPOS OP Y OA.....	33
11.3.	PRESENCIA DE CÉLULAS INFLAMATORIAS EN EL CONTENIDO URETRAL SEMINAL	
	<b>CUADRO 5.</b> NÚMERO PROMEDIO DE LEUCOCITOS EN ANIMALES NORMALES.....	36
	<b>CUADRO 6.</b> NÚMERO PROMEDIO DE LEUCOCITOS	

	POR CAMPO EN LAS MUESTRAS DE CONTENIDO URETRAL SEMINAL.....	36
11.5	DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS+ PRESENTES EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS	
	<b>CUADRO 7.</b> NÚMERO PROMEDIO DE MACRÓFAGOS+ POR mm <sup>2</sup> EN LOS DIFERENTES ÓRGANOS DEL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS DE DIFERENTE EDAD.....	58
	<b>CUADRO 8.</b> NÚMERO PROMEDIO DE MACRÓFAGOS+ POR mm <sup>2</sup> , DIFERENCIAS ENTRE ÓRGANOS EN CADA GRUPO.....	59
11.6	DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS PLÁSMATICAS IgG+, IgA+ E IgM+ PRESENTES EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS	
	<b>CUADRO 9.</b> NÚMERO PROMEDIO DE LINFOCITOS CD4+ y CD8+/ mm <sup>2</sup> EN LOS DIFERENTES ÓRGANOS DEL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS DE DIFERENTE EDAD.....	64
11.7.	DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS IgG+, IgA+ E IgM+ PRESENTES EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS	
	<b>CUADRO 10.</b> NÚMERO PROMEDIO CÉLULAS CPLASMÁTICAS IgA+, IgG+ E IgM+ POSITIVAS EN LOS DIFERENTES ÓRGANOS DE LOS APARATOS REPRODUCTORES POR mm <sup>2</sup> .....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

### 4. RESPUESTA INMUNE EN EL APARATO REPRODUCTOR

#### 4.8. LEUCOCITOSPERMIA

- Figura 1. Esquema del aparato reproductor humano mostrando la distribución de algunas células involucradas en la respuesta inmune adquirida..... 20**

### 10. MATERIAL Y MÉTODOS

- Figura 2. Diseño experimental..... 32**

### 11. RESULTADOS

#### 11.2 MORFOMETRÍA

- Figura 3. Medidas de largo, ancho y profundo de la uretra pélvica..... 34**

- Figura 4. Aparato reproductor y sus glándulas anexas..... 35**

#### 11.3. PRESENCIA DE CÉLULAS INFLAMATORIAS EN EL CONTENIDO URETRAL SEMINAL

- Figura 5. Frotis de contenido uretral seminal..... 37**

- Figura 6. Corte histológico de uretra peneana y pélvica..... 38**

#### 11.4. DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DEL APARATO REPRODUCTOR

- Figura 7. Corte histológico de un testículo de un animal adulto ovino..... 39**

- Figura 8. Corte histológico de testículo de animal prepuberal ovino..... 40**

- Figura 9. Corte histológico de la cabeza del epidídimo, animal adulto ovino..... 41**

- Figura 10. Corte histológico de la cabeza del**

	epidídimo, animal prepuberal ovino.....	42
Figura 11.	Corte histológico del cuerpo del epidídimo, animal adulto ovino.....	43
Figura 12.	Corte histológico del cuerpo del epidídimo, animal prepuberal ovino.....	44
Figura 13.	Corte histológico de la cola del epidídimo, animal adulto ovino.....	45
Figura 14.	Corte histológico de la cola del epidídimo, animal prepuberal.....	46
Figura 15.	Corte histológico de la uretra pélvica, animal adulto ovino.....	47
Figura 16.	Corte histológico de la uretra pélvica, animal prepuberal.....	48
Figura 17.	Corte histológico del ámpula del conducto deferente, animal adulto ovino.....	49
Figura 18.	Corte histológico del ámpula del conducto deferente, animal prepuberal ovino.....	50
Figura 19.	Corte histológico de la vesícula seminal, animal adulto ovino.....	51
Figura 20.	Corte histológico de la vesícula seminal, animal prepuberal ovino.....	52
Figura 21.	Corte Histológico de la glándula bulbouretral, animal adulto ovino.....	53
Figura 22.	Corte histológico de la glándula bulbouretral, animal prepuberal ovino.....	54
Figura 23.	Corte histológico de la próstata diseminada, animal adulto ovino.....	55
Figura 24.	Corte histológico de la próstata diseminada, animal prepuberal ovino.....	56

<b>11.5</b>	<b>DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS+ PRESENTES EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS</b>	
	<b>Figura 25. Gráfica del número promedio de macrófagos por mm<sup>2</sup> en los diferentes órganos del aparato reproductor de los tres grupos de ovinos evaluados.....</b>	<b>60</b>
	<b>Figura 26. Marcación de macrófagos positivos en la uretra pélvica de animales adultos ovinos...</b>	<b>61</b>
	<b>Figura 27. Marcación de macrófagos positivos en la vesícula seminal y el epidídimo, animal adulto ovino.....</b>	<b>61</b>
	<b>Figura 28. Marcación de macrófagos positivos en el testículo de animales prepuberales.....</b>	<b>62</b>
	<b>Figura 29. Marcación de macrófagos positivos en el linfonodo, animal adulto ovino.....</b>	<b>62</b>
<b>11.6.</b>	<b>DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS LINFOCITOS CD4+ Y CD8+ PRESENTES EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS</b>	
	<b>Figura 30. Gráfica del número promedio de linfocitos CD4+ por mm<sup>2</sup> en los diferentes órganos del aparato reproductor de los tres grupos de ovinos evaluados.....</b>	<b>65</b>
	<b>Figura 31. Gráfica del número promedio de linfocitos CD8+ por mm<sup>2</sup> en los diferentes órganos del aparato reproductor de los tres grupos de ovinos evaluados.....</b>	<b>66</b>
	<b>Figura 32. Marcación de linfocitos CD4+ en la próstata diseminada.....</b>	<b>67</b>

	<b>Figura 33. Marcación de linfocitos CD4+ en las glándulas anexas.....</b>	<b>67</b>
	<b>Figura 34. Marcación de linfocitos CD8+.....</b>	<b>68</b>
<b>11.7.</b>	<b>DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS IgG+, IgA+ E IgM+ PRESENTES EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS</b>	
	<b>Figura 35. Gráfica del número promedio de células contenedoras de IgG+ por mm2 en los diferentes órganos del aparato reproductor.</b>	<b>70</b>
	<b>Figura 36. Gráfica del número promedio de células contenedoras de IgM+ por mm2 en los diferentes órganos del aparato reproductor.</b>	<b>71</b>
	<b>Figura 37. Gráfica del número promedio de células contenedoras de IgM+ por mm2 en los diferentes órganos del aparato reproductor.</b>	<b>72</b>
	<b>Figura 38. Marcación de células contenedoras de IgG+ en diferentes órganos.....</b>	<b>73</b>
	<b>Figura 39. Marcación de células contenedoras de IgM+ en diferentes órganos.....</b>	<b>74</b>
	<b>Figura 40. Marcación de células contenedoras de IgA+ en diferentes órganos.....</b>	<b>75</b>
	<b>Figura 41. Marcación de células contenedoras de IgA+ en uretra pélvica.....</b>	<b>76</b>

## ABREVIATURAS

APC	Células presentadoras de antígeno	MIS	Sistema inmune de las mucosas
BALT	Tejido linfoide asociado a los bronquios	MUC	Mucina
CALT	Tejido linfoide asociado a conjuntiva	MIP	Proteínas inflamatorias de macrófagos
CD	Denominación de grupo	MOS	Macrófago
CIMS	Sistema inmune común de las mucosas	NALT	Tejido linfoide asociado a la nasofaringe
CCI	Célula contenedora de Inmunoglobulinas	PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
DCs	Célula dendrítica	OPP	Ovinos prepuberales
ESC	Extracto salino calentado	OP	Ovinos puberales
FAE	Epitelio asociado al folículo	OA	Ovinos adultos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino	PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
HRP	Peroxidasa del rábano	LPS	Lipopolisacárido
IDGA	Inmunodifusión en gel agar	RALT	Tejido linfoide asociado al aparato reproductor
IgA	Inmunoglobulina A	SBD	Defensina
IgG	Inmunoglobulina G	SC	Componente o pieza secretoria
IgM	Inmunoglobulina M	SIgA	IgA secretoria
LIE	Linfocito intraepitelial	SPSS	Paquete estadístico para las ciencias sociales
LLP	Linfocito de la lámina propia	TCR	Receptor de linfocito T
MALT	Tejido linfoide asociado a las mucosas	TLR	Receptor de tipo Toll –pIgR
mIgA	IgA monomérica	WC	<i>Workshop cluster</i>

## RESUMEN

La respuesta inmune en el aparato reproductor masculino ha sido poco explorada, su mucosa presenta las células de respuesta inmune comunes a las demás mucosas (CIMS), que deben cumplir funciones de defensa en las infecciones y ser tolerantes a las células germinales que presentan antígenos diferenciales. Recientemente se ha intensificado el estudio de este sistema, sobre todo en la respuesta a las enfermedades de transmisión sexual.

En este trabajo se identificaron y cuantificaron las poblaciones celulares CD4+, CD8+, macrófago y células contenedoras (plasmáticas) de IgA+, IgG+ e IgM+ (CCI), mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, en el aparato reproductor de machos ovinos de diferentes edades, serológicamente negativos a brucelas lisas, *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*. Se colectaron muestras de aparato reproductor, frotis de contenido uretral y suero de 62 machos ovinos, sacrificados en rastro. Se realizó la descripción histológica, se cuantificó la leucocitospermia y la morfometría de las glándulas anexas. Para los conteos celulares se dividieron los animales en tres grupos: ovinos prepuberales menores de 6 meses de edad, OPP; ovinos puberales entre 6 meses y un año de edad, OP y ovinos adultos, mayores de 2 años de edad, OA. De los 62 animales muestreados ningún animal fue positivo a brucelas lisas, el 1.6% fue positivo a *B. ovis*, el 3.2% a *A. seminis* y el 4.8% a *H. somni*. El 85% de los animales mostró algún rango de leucocitospermia, con predominio de neutrófilos (PMN), en la histología se observó que estas células migraron mayoritariamente en la uretra peneana, el 7.5% además de tener PMN, también mostró la presencia de células mononucleares, de tipo monocito y linfocito. En vesículas seminales y glándulas bulbouretrales, los grupos OP y OA presentaron mayor cantidad de macrófagos que el grupo OPP ( $p < 0.05$ ), los macrófagos se localizaron en el tejido conectivo. En la uretra pélvica la mayor cantidad de macrófagos ocurrió en el grupo OP, seguido del OA y por último el OPP ( $p < 0.05$ ), las marcas fueron más abundantes en el epitelio de transición. En el testículo el grupo OPP presentó mayor cantidad de macrófagos comparado con los grupos OP y OA ( $p < 0.05$ ) y se localizaron en el tejido conectivo. No se encontraron diferencias en linfocitos CD4+ y CD8+ en ámpula, uretra peneana y pélvica, testículo, ni en los tres sectores del epidídimo ( $p > 0.05$ ), la mayor parte de las marcas se localizó en el tejido conectivo. Los conteos de las CCI fueron bajos en todos los órganos, no hubo diferencia entre grupos para ninguna inmunoglobulina, en testículo del grupo OPP se presentaron células marcadas para IgA+ e IgG+.



## **General morphology and immune cell populations in the reproductive tract of clinical healthy lambs and rams.**

### **ABSTRACT**

Immune response in the male reproductive system has hardly been explored. Its mucosa contains the same cells of common immune system of mucous membranes (CIMS). These cells have to fulfill defense functions against infections and also have to tolerate germ cells differentials antigens. Immune response in the reproductive tract has recently intensified principally focused on sexual transmission diseases.

In this work were identified and quantified CD4 +, CD8 +, macrophage, plasmatic cells IgA +, IgG + and IgM + population cells through immunofluorescence and immunohistochemistry. Different ages and serologically negatives sheep males to brucellosis, *B. ovis*, *A. seminis* and *H. somni* were sampled. Samples from reproductive tract organs, smear of urethral content and serum of 62 males were collected at slaughterhouse. Histological description, leucocytospermia (leukocytes in urethral content) quantification and annexed glands morphometry were performed. For cell counts samples were divided in three groups: OPP, from prepuberal lambs under 6 months of age; OP, puberal rams between 6 months and 1 year old and OA, adults rams older than 2 years. From 62 sampled animals none was positive to brucellosis, 1.6% were positive to *B. ovis*, 3.2% to *A. seminis* and 4.8% to *H. somni*. Most animals (85%) showed some range of leucocytospermia, with neutrophil (PMN) predominance. Neutrophil migrated mostly in the penile urethra. A part of animals (7.5%) also showed in addition to PMN, mononuclear cells, monocyte and lymphocyte type. Seminal vesicles and bulbourethral glands, from OP and OA groups showed greater amount of macrophages compared with the OPP Group ( $p < 0.05$ ). Macrophages were found mostly in the connective tissue of these glands. In the pelvic urethra a greater amount of macrophages were found in the OP group followed by OA and finally OPP ( $p < 0.05$ ). Urethra marks were located mainly in transition epithelium. Testicles from OPP group presented a greater amount of macrophages compared with OP and OA groups ( $p < 0.05$ ), and were found in connective tissue. No differences were observed in CD4 + and CD8 + lymphocytes counts in ampoules, penile and pelvic urethra, testicle and epididymis sectors ( $p > 0.05$ ) marks were located in connective tissue. CCI counts were low in examined organs, without differences between groups for any immunoglobulin. Positive IgA and IgG cells were observed in the testis of OPP group.

## 1. INTRODUCCIÓN

En contraste con lo que ocurre con las secreciones del aparato reproductor femenino, sobre las que se han realizado numerosos estudios referidos a la magnitud y las propiedades de los anticuerpos presentes en las mismas, la respuesta en el aparato reproductor masculino ha sido poco explorada (Moldoveanu *et al*, 2005). El aparato reproductor masculino, en su mucosa contiene elementos del sistema inmune común de las mucosas (CIMS), el cual tiene que cumplir con funciones de defensa contra las infecciones y además tiene que tolerar a las células germinales que presentan antígenos diferenciales (Christ *et al*, 1997). Recientemente se ha intensificado el estudio de los mecanismos de respuesta inmune en el aparato reproductor enfocado sobre todo a la lucha contra las enfermedades de transmisión sexual (Anderson y Pudney, 1999).

El estudio comparativo de la distribución y propiedades moleculares de los anticuerpos en el suero y en las secreciones del tracto genital masculino indica que las de este último se asemejan más a las presentes en el suero que a las características típicas de una secreción de mucosa. En contraste con la saliva, la leche y el moco intestinal, donde la IgA secretoria (SIgA) es dominante y la IgA monomérica (mIgA) está presente en cantidades trazas; el plasma seminal posee como isotipo dominante a la IgG y niveles comparables de las dos formas de IgA (SIgA y mIgA). Moldoveanu *et al*, 2005, encuentran que solo el 50% de la IgA aparece como SIgA en el plasma seminal, esto podría deberse a la digestión de la pieza secretoria (SC) por las proteasas presentes en abundancia en el semen. Para el caso de los humanos, la composición de las secreciones preeyaculatorias se asemeja a las de las secreciones externas típicas.

En los hombres, la uretra peneana es un sitio de infección primaria por patógenos de transmisión sexual. La investigación sobre la inmunología de mucosas en este sitio ha sido limitada en parte debido a los problemas de muestreo, pero la evidencia disponible indica que la uretra contiene una gran cantidad de mediadores inmunológicos con los cuales puede montar una

respuesta vigorosa innata y adaptativa frente a los organismos infecciosos (Pudney *et al*, 2011).

En carneros, se tiene poca información acerca de la distribución de las células involucradas en la respuesta inmune en el aparato reproductor y de los casos de leucocitospermia, Acosta y col., 2006, 2009, determinaron la distribución de algunas células implicadas en la respuesta inmune de la uretra pélvica del borrego, encontrando células plasmáticas (Saravanamuthu *et al.*, 1991), macrófagos, linfocitos y células dendríticas, con lo cual sugieren que la uretra pélvica podría actuar como un sitio de inducción y efector de la repuesta inmune local contra las infecciones.

## **2. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO**

El aparato reproductor del macho está integrado por los testículos, el sistema de conductos excretores, el pene y las glándulas genitales accesorias, los cuales contribuyen a la función primaria de la reproducción, producción de espermatozoides, formación de semen y síntesis de hormonas sexuales masculinas (Banks *et al*, 1996; Bacha *et al*, 2001).

### **2.1. TESTÍCULO**

En rumiantes los testículos están colocados en la región inguinal, en posición vertical. Son órganos elipsoidales, suspendidos por un cordón espermático, conjunto de estructuras que incluyen al conducto deferente, vasos sanguíneos y nervios dentro de una doble cubierta de peritoneo y separados dentro del escroto, por el tabique escrotal. El tamaño y peso de los testículos depende de la edad, la raza y del desarrollo corporal del animal, se estima su peso en aproximadamente el 0.5% del peso corporal. Sus funciones son la producción de espermatozoides a través de la espermatogénesis y la producción de andrógenos (Salisbury y Vandermark, 1978; Hafez *et al*, 2002; Dyce *et al*, 2007).

La superficie testicular está recubierta por una fina lámina serosa, la túnica vaginal visceral, que se extiende por encima de una capa fibrosa llamada túnica albugínea de tejido conectivo denso, que envuelve a todo el parénquima testicular y es la responsable de su forma ovoide que lo caracteriza. El parénquima testicular está contenido dentro de esta fuerte cápsula y presenta una turgencia que se aprecia a la palpación. Una parte de esta última se hunde hacia el centro del parénquima del órgano formando el mediastino testicular. Desde éste irradian periféricamente los tabiques que lo dividen en lóbulos, a su vez ellos contienen a los túbulos seminíferos en los que se producen los espermatozoides. (Banks *et al*, 1996; Bacha *et al*, 2001; Hafez *et al*, 2002; Dyce *et al*, 2007).

En un corte transversal del túbulo seminífero podrá observarse, desde la pared hacia la luz de los mismos, una membrana basal, células mioides, células sustentaculares que actúan a modo de barrera hemato-testicular y las células germinales en sus distintos estadios, ubicadas en las prolongaciones citoplásmicas de las anteriores. Las células sustentaculares presentan forma piramidal, sostienen y nutren el epitelio germinativo, constituyendo el almacén del túbulo seminífero, estas células impiden la relación directa del contenido tubular con la sangre y las células de respuesta inmune (Bacha *et al*, 2001; Dyce *et al*, 2007).

Los espacios intersticiales contienen vasos sanguíneos y linfáticos, ramas de nervios y células intersticiales (células de Leydig) que son las responsables de la producción de testosterona, la cual es secretada activamente desde la vida fetal, cayendo a niveles muy bajos o bien cesando al momento del nacimiento para reanudarse nuevamente a la pubertad (May, 1974; Getty *et al*, 1982; Shaller *et al*, 1992; Horst *et al*, 2005).

## 2.2. EPIDÍDIMO

Es un túbulo único, largo y enrollado, con un soporte de elementos de tejido conectivo que lo fijan al testículo. Su peso es diverso en función de las grandes diferencias existentes en el tamaño de los animales, en el carnero adulto su peso ronda entre los 20 y 30 g y su longitud entre 50 y 60 m. Se divide en tres regiones: cabeza, ubicada en el polo proximal del testículo, cuerpo, corre por el borde medial y caudal testículo y cola, situada en el polo distal del mismo y almacena una importante cantidad de espermatozoides. Las funciones epididimarias, son el transporte, la sobrevivencia y la maduración funcional de los espermatozoides. En el epidídimo al igual que en el testículo se observa la túnica albugínea de tejido conectivo denso. El epitelio que reviste a los conductos eferentes es pseudoestratificado con estereocilios, lo rodea una lámina propia delgada de miofibroblastos y tejido conectivo (Bacha *et al*, 2001, Hafez *et al*, 2002; Gázquez *et al*, 2004; Dyce *et al*, 2007).

## 2.3. CONDUCTO DEFERENTE

El conducto deferente es un órgano tubular que transporta a los espermatozoides desde la cola del epidídimo hasta la uretra. Toma su origen en la cola del epidídimo, transita por el borde epididimario del testículo y después se continúa dentro del cordón espermático hacia el canal inguinal. Después de cruzar el canal inguinal sigue un trayecto que recuerda el asa de una taza y finalmente desemboca en la uretra. La última parte del conducto deferente presenta un ensanchamiento, la ampolla del conducto deferente donde se encuentran las glándulas ampulares. El conducto deferente está constituido por una túnica serosa, una túnica muscular y una túnica mucosa. En todo el trayecto está sostenido por un pliegue del peritoneo, el mesoconducto deferente (Banks *et al*, 1996; Bacha *et al*, 2001).

## 2.4. URETRA

La uretra del macho está compuesta de una porción pélvica, en el interior de la pelvis y una porción peniana, que está incorporada al pene y se considera como un componente de este órgano. Ambas porciones están conectadas por el istmo uretral, sitio donde la uretra gira sobre el arco isquiático para entrar al pene. Presenta dos orificios, el uretral interno, que comunica con la vejiga urinaria y el uretral externo, situado en el extremo del pene y es por donde la orina es eliminada al exterior. La uretra pelviana es un órgano tubular estructurado por tres túnicas, mucosa, muscular y adventicia. La túnica muscular es de músculo estriado, está formada por el músculo uretral y actúa como esfínter (Banks *et al*, 1996; Bacha *et al*, 2001; Dyce *et al*, 2007).

## 2.5. PENE

Es el órgano masculino de la cópula, se compone de un extremo libre o glande, un cuerpo y una raíz formada por dos pilares cubiertos por los músculos isquiocavernosos. Se sitúa a nivel de la región púbica y abdominal caudal, con el dorso del pene dirigido hacia la sínfisis pelviana y a la pared abdominal ventral. Estructuralmente el pene está conformado por tres columnas de tejido eréctil: dos cuerpos cavernosos y un cuerpo esponjoso. Los cuerpos cavernosos consisten en sinusoides vasculares separadas por tabiques de tejido conectivo que forman en conjunto las cavernas de los cuerpos cavernosos. Estos tabiques derivan de una envoltura fibrosa resistente que rodea al miembro y que forma un tabique entre los dos cuerpos cavernosos, es la túnica albugínea de los cuerpos cavernosos. El tabique que separa ambos cuerpos cavernosos desde su origen hacia la parte distal se va haciendo menos aparente hasta que desaparece permitiendo que el tejido de los dos cuerpos cavernosos se mezcle. Ventral a los cuerpos cavernosos está la uretra, envuelta por el cuerpo esponjoso del pene, de estructura similar pero más delicada que la de los cuerpos

cavernosos. Los espacios sanguíneos son de mayor tamaño al estar separados por tabiques más finos ya que la túnica albugínea del cuerpo esponjoso es más delicada. En conjunto los espacios y tabiques forman las cavernas del cuerpo esponjoso (Banks *et al*, 1996; Bacha *et al*, 2001).

## 2.6. PREPUCIO

El prepucio es un pliegue invaginado de la piel que rodea la extremidad libre del pene cuando éste no está en erección. Está conformado por una lámina externa constituida por los estratos normales de la piel y una lámina interna cubierta por una mucosa que se continúa con la del pene. En el extremo del prepucio se localiza el orificio prepucial (Banks *et al*, 1996; Bacha *et al*, 2001).

## 2.7. GLÁNDULAS ANEXAS

Las glándulas genitales accesorias son un grupo de glándulas asociadas al trayecto del conducto deferente y la uretra, que participan con su secreción en la formación del semen, además de favorecer el movimiento, la nutrición, la maduración, la longevidad y el vigor de los espermatozoides. En ovinos corresponden a la porción glandular del conducto deferente o ámpula, las vesículas seminales, la próstata que en ovinos solo presenta la porción diseminada y las glándulas bulbouretrales (Gázquez *et al*, 2004; Frandson *et al*, 2006).

### 2.7.1. Ámpula del conducto deferente

El ámpula del conducto deferente (*ampulla ductus deferentis*), es un ensanchamiento de la parte terminal del conducto deferente, formada por un engrosamiento glandular de su pared. Produce sustancias ricas en carbohidratos y aminoácidos (Getty *et al*, 1982; Shaller *et al*, 1992; Dellmann, 1999; Eurell *et al*, 2006; Frandson *et al*, 2006).

En ovinos, se reconoce como una glándula tubuloalveolar ramificada, con dilataciones en forma de sacos, está revestida por un epitelio pseudoestratificado compuesto por células cuboides o cilíndricas y escasas células basales. La lámina propia es de tejido conectivo laxo. La túnica muscular está formada por una capa circular interna y una longitudinal externa. La túnica serosa es abundante en tejido conectivo laxo (Aughey *et al*, 2001; Bacha *et al*, 2001; Gázquez *et al*, 2004; Eurell *et al*, 2006).

### **2.7.2. Vesícula seminal**

La vesícula seminal (*Glandula vesicularis*) también es conocida como glándula vesicular. Es una glándula par, de superficie lobulada, situada dorsalmente al cuello y cuerpo de la vejiga urinaria. En los rumiantes y el caballo el conducto excretor de esta glándula se une un poco antes de su desembocadura con el conducto deferente para formar el conducto eyaculador. El producto secretado por esta glándula forma del 25-30% del volumen seminal en rumiantes y le aporta el componente energético principal la fructosa (May, 1974; Getty *et al*, 1982; Shaller *et al*, 1992; Gázquez *et al*, 2004; Horst *et al*, 2005; Frandson *et al*, 2006).

En los ovinos histológicamente es una glándula tubuloalveolar, formada por lóbulos y lobulillos, los tabiques interlobulares contienen abundantes fibras musculares lisas. Presenta un epitelio pseudoestratificado, con escasas células basales. Su lámina propia es un tejido conectivo laxo. La túnica muscular presenta dos capas, una circular interna y una longitudinal externa. La túnica adventicia está compuesta de tejido conectivo laxo con numerosas fibras elásticas y plexos nerviosos (Aughey *et al*, 2001; Bacha *et al*, 2001; Gázquez *et al*, 2004; Eurell *et al*, 2006; Samuelson, 2007).

### **2.7.3. Glándula bulbouretral**

La glándula bulbouretral (*Glandula bulbouretralis*), es par, situada sobre la cara dorsal de la uretra pélvica a nivel del arco isquiático, el conducto de la



glándula se abre en el extremo caudal de la uretra pélvica (depresión uretral), en los ovinos tiene una longitud de 1cm x 0.5cm de ancho. Posee una cápsula bien desarrollada y tabiques internos con abundantes fibras de músculo liso. Su secreción es principalmente moco (May, 1974; Shaller *et al*, 1992; Hafez, 2002; Horts *et al*, 2005; Eurell *et al.*, 2006).

En los ovinos es una glándula tubuloalveolar, con un epitelio columnar simple; el sistema de conductos está revestido por un epitelio cuboidal. La lámina propia es escasa y se encuentra formada por tejido conectivo laxo. La cápsula del órgano es de tejido conectivo denso con abundantes fibras de músculo liso, también se encuentran fibras de músculo esquelético estriado provenientes del músculo bulboesponjoso. El tejido conectivo capsular se continúa con el de los septos (Dellmann *et al*, 1999; Aughey *et al*, 2001; Bacha *et al*, 2001; Gázquez *et al*, 2004; Eurell *et al*, 2006; Samuelson, 2007).

#### **2.7.4. Próstata diseminada**

En los carneros sólo se presenta la porción diseminada, la próstata diseminada (*pars disseminata prostate*), formada por tejido glandular que se localiza en la submucosa de la uretra pélvica, dorsalmente y reducida ventralmente, se extiende en sentido caudal, y drena por numerosos pequeños conductillos, que se extienden hasta alcanzar los conductos de las glándulas bulbouretrales (May, 1974; Shaller *et al*, 1992; Hafez, 2002).

Histológicamente es una glándula serosa tubuloalveolar compuesta, revestida por un epitelio cúbico simple, las células epiteliales presentan burbujas apicales que indican la actividad secretoria de tipo apócrino, con gránulos acidófilos. El sistema de conductos está revestido por un epitelio columnar simple cerca de la luz de la uretra, los alveolos están rodeados por tejido conectivo laxo de la lámina propia. (Aughey *et al*, 2001; Bacha *et al*, 2001; Gázquez *et al*, 2004; Eurell *et al*, 2006).

### 3. INMUNIDAD EN LAS MUCOSAS

Los aparatos respiratorio, digestivo y reproductivo se encuentran en el interior del cuerpo pero continuamente están expuestos al ambiente exterior, por lo que sirven como puertas de acceso que tienen la función de la aceptación de antígenos beneficiosos y la función del rechazo de antígenos no beneficiosos; por ejemplo cuando se toma oxígeno por medio del aparato respiratorio, nutrientes esenciales a través del digestivo o los espermatozoides entran en el aparato reproductivo femenino, los órganos están en alto riesgo para la invasión de microorganismos patógenos. Las células del epitelio de las mucosas cubren la superficie de estos órganos de la misma manera que la piel cubre el exterior del cuerpo, formando barreras físicas e inmunológicas que protegen de la invasión de patógenos. Además de la asociación de estas mucosas a los órganos, estos poseen una flora residente, la cual convive pacíficamente con el anfitrión y crean un ambiente mutuamente beneficioso. Por eso la mucosa necesita distinguir la flora residente de los patógenos. Los materiales benéficos o bacterias residentes necesitan ser activamente absorbidos o tomadas mientras que los materiales o bacterias perjudiciales deben ser selectivamente excluidos; este mecanismo es controlado por el sistema inmune de la mucosa (MIS) (McNeilly *et al*, 2008, Shintaro *et al*, 2012).

#### 3.1. DEFENSAS INNATAS EN LA SUPERFICIE DE MUCOSAS

Una característica importante de las superficies mucosas de las vías respiratorias y gastrointestinales, así como de los órganos reproductivos, es la función de barrera proporcionada por el epitelio. En el caso de las vías respiratorias y el tracto gastrointestinal inferior, esta barrera se compone de una sola capa de células epiteliales unidas por complejos de unión (uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas); en el tracto gastrointestinal superior (hasta el omaso) y en los órganos reproductivos, uretra y el resto, es la estratificación del epitelio escamoso existente. Además de formar una barrera física, las células

epiteliales y sus glándulas asociadas producen defensas no específicas o innatas, incluyendo mucinas y péptidos antimicrobianos (Mestecky *et al*, 2000; McNeilly *et al*, 2008; Shintaro *et al*, 2012).

Aunque la mayor parte del trabajo en péptidos antimicrobianos ha sido llevado a cabo en ratones y humanos, también han sido identificados en ovinos. Estos incluyen dos defensinas, SBD-1 y SBD-2, ocho catelicidinas e intelectina. Sin embargo, mientras que la expresión de péptidos (excluyendo catelicidinas) se ha demostrado en los sitios de la mucosa in vivo, sus actividades antimicrobianas no se han determinado aún en el ganado ovino (McNeilly *et al*, 2008).

Recientemente se ha demostrado que la respuesta inmune innata en las superficies mucosas presenta un grado de reconocimiento a moléculas propias de bacterias, como el LPS (polisacárido de bacterias gran negativas), esto se debe principalmente al descubrimiento de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores tipo toll- (TLR) en las células epiteliales, linfocitos, fagocitos y las células dendríticas (DC) en tejidos de las mucosas de los humanos y ratones, que responden a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como el lipopolisacárido, la flagelina, las lipoproteínas, glucolípidos y los ácidos nucleicos de bacterias, virus, parásitos o de origen fúngico. La unión de PRR a PAMP resulta en la liberación de las señales de distintas citoquinas y quimioquinas, que modulan los mecanismos de la respuesta inmune innata y adaptativa (Mestecky *et al*, 2000; Entrican *et al*, 2006; McNeilly *et al*, 2008).

### **3.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA DE LAS SUPERFICIES MUCOSAS**

En general el MIS consiste en sitios inductivos y efectores. Los sitios inductivos consisten tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) representado por las placas de Peyer en el intestino delgado, en los sitios inductivos las células epiteliales de la mucosa introduce antígenos tomados de la luz, estos antígenos son procesado y presentados por células presentadoras de antígenos (APCs) como las células dendríticas (DCs) (Shintaro *et al*, 2012).

### 3.3. TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LAS MUCOSAS

Los principales tipos de MALT en el ganado ovino, con base en su ubicación anatómica, son el tejido linfoide nasal (NALT), tejidos linfoide de los bronquios (BALT) y tejido linfoide del intestino (GALT); y también se ha descrito el tejido linfoide asociado a conjuntiva (CALT) y el tejido linfoide asociado a los pezones. Por otro lado, el tejido linfoide asociado al aparato reproductor en raras ocasiones se denomina RALT y ha sido poco explorado. Dado que mucho del tejido linfoide asociado a las mucosas se encuentra difusamente esparcido y existen diferencias entre las especies, la organización del MALT no se encuentra completamente descrita (Mestecky *et al*, 2000; Cuff, 2001; Rusell *et al*, 2002; Liebler-Tenorio y Pabst, 2006, McNeilly *et al*, 2008).

NALT y BALT se encuentran en la nasofaringe y adyacente a los bronquios y bronquiolos, respectivamente. El GALT está en el intestino en porciones de yeyuno-ileal, colon y el recto terminal. El tejido epitelial que cubre a los folículos linfoides de la mucosa es especializado y conocido como epitelio asociado al folículo (FAE) y contiene células-M. Estas células son especializadas en la endocitosis de partículas antigénicas, que por medio del transporte vesicular trans-epitelial desde la superficie de la mucosa luminal lo trasladan a la corteza folicular. El NALT tiene un papel importante en la inducción y la modulación de la inmunidad de la mucosa en la parte superior del tracto superior respiratorio (Anderson, 1996; Mestecky *et al*, 2000; Rusell *et al*, 2002, Shintaro *et al*, 2012).

### 3.4. LINFOCITOS DE MUCOSAS

Además del sistema MALT, las mucosas del estómago, los intestinos delgado y grueso, los tractos respiratorios superior e inferior y otras mucosas, contienen también grandes cantidades de linfocitos y células plasmáticas libres, no organizados. Estos linfocitos están situados en el tejido conectivo que forma la lámina propia y entre las células epiteliales.

Los linfocitos de la lamina propia (LLP) son principalmente linfocitos T, presentan el receptor TCR  $\alpha/\beta$  (Receptor del antígeno del linfocito T); también se observa la

presencia de numerosas células plasmáticas. Estas células plasmáticas secretan principalmente IgA, que atraviesa y adquiere la pieza SC en las células epiteliales y es liberada a la luz.

Los linfocitos intraepiteliales (LIE) son principalmente células T, en los rumiantes más del 40% de estas células presentan el receptor TCR  $\gamma/\delta$ , los LIE presentan características fenotípicas diferentes de los LLP.

La mayoría de las células T LLP y LIE pertenecen a la subpoblación CD45RO de células de memoria (Murphy *et al*, 2008; Pelves *et al*, 2007; Tizard, 2009).

#### **4. RESPUESTA INMUNE EN EL APARATO REPRODUCTOR**

##### **4.1. CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE EN EL TESTÍCULO**

La inmunidad en el testículo es particular por muchos aspectos, primero debido a la presencia de antígenos ocultos de las células germinales, una función importante del testículo es proveer un ambiente especial de homeostasis a estas células, mediante la barrera hemato-testicular que anatómicamente y fisiológicamente secuestra a las células germinales, las oculta de las células inmunes. La barrera está formada por las células sustentaculares unidas por uniones cerradas y regula el tránsito de metabolitos y macromoléculas, las inmunoglobulinas y el complemento no pueden pasar a la luz de los túbulos seminíferos. Estudios en modelos animales han indicado la presencia de antígenos ocultos de las células germinales fuera de la barrera (espermatogonia y espermatocitos preleptoténicos) (Yule, *et al.*, 1988), esto sugiere que hay otros factores que actúan para evitar una respuesta autoinmune contra los antígenos ocultos no secuestrados (Yule, *et al.*, 1990). Injertos alogénicos sobreviven un tiempo prolongado en el testículo (Head *et al.*, 1983), esto es atribuido a las altas concentraciones de testosterona, considerada hormona inmunosupresora, que mantiene el ambiente inmunoprivilegiado. Las células T y otras células inmunes normalmente no están restringidas en el intersticio testicular, entonces el estatus de inmunoprivilegio se

creo que está dado por factores locales que inhiben su función, una variedad de proteínas solubles inmunosupresivas inhiben la activación de células T y se han aislado y probado *in vitro* (Pollanen *et al.*, 1990), además otros factores han sido identificados en el testículo que inhiben funciones linfocíticas, uno de ellos es la proteasa inhibitoria 9 (protease inhibitor 9) y el inhibidor de granzima B (inhibitor of granzyme) (Bladergroen *et al.*, 2001). Otro mecanismo ha sido descrito en células sustentaculares de ratón, las cuales expresan cantidades grandes de Fas-ligando, proteína que induce apoptosis en linfocitos activados que expresen el receptor Fas. Ratones transgénicos deficientes en la expresión de Fas ligando en las células de sustentaculares, desarrollan orquitis (Bellgrau *et al.*, 1995).

Los macrófagos son abundantes en el intersticio testicular de muchas especies de mamíferos, incluyendo al humano, se sugiere que el macrófago es necesario para conservar las características normales del tejido, esto debido a que producen 25-hidroxicolesterol el cual estimula la síntesis de testosterona en la células intersticiales (Connell and Christensen, 1975; Pudney, 1986; Pollanen y Niemi, 1987, Nes *et al.*, 2000), también han sido observados monocitos en los límites de los túbulos seminíferos de humanos (Hermon and Lalli, 1987).

#### 4.2. CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE EN EL EPIDÍDIMO

Las células T CD8+ son predominantes en el epitelio mientras que las CD4+ predominan en la lámina propia del epidídimo de humanos (Richie *et al.*, 1984). Los macrófagos son abundantes a lo largo de toda la mucosa del epidídimo dentro del epitelio y la lámina propia. En algunos casos, se han observado altas concentraciones de macrófagos en el epitelio y el lumen. Observaciones preliminares sugieren un gradiente en la concentración de macrófagos residentes en la mucosa del epidídimo, los mayores números aparecen en la cabeza y el cuerpo, en comparación a la región caudal (J. Pudney, observaciones no publicadas citado por Mesteky, *et al.*, 2005). Ocasionalmente se ha detectado la expresión de MHC clase II en el epitelio del epidídimo, la expresión de pIgR ha sido detectado en todas las regiones del epidídimo, pero se han observado pocas

células plasmáticas en humanos (J. Pudney, observaciones no publicadas citado por Mestecky, *et al*, 2005).

#### 4.3. CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE EN LA VESÍCULA SEMINAL

Se tiene poca información sobre las células de respuesta inmune de las vesículas seminales. En humanos se han detectado linfocitos T y macrófagos en el epitelio y la lámina propia de la mucosa de las vesículas seminales, La expresión de pIgR ha sido ocasionalmente observada en el epitelio, pero no se han observado MHC de clase II o células plasmáticas en humanos (Mestecky *et al*, 2005).

En un estudio en carneros infectados experimentalmente con *A. seminis*, se observaron células dendríticas CD1b en ámpulas y vesículas seminales con procesos inflamatorios, en el grupo control, no se encontraron, o fueron escasas al igual que las células IgA+, IgM+ e IgG+, con lo cual el autor sugiere que podría facilitar el establecimiento bacteriano. Mientras las glándulas bulbouretrales y la próstata diseminada, por el contrario, demostraron alto número de estas mismas células (Acosta *et al*, 2007).

#### 4.4. CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE EN LA GLÁNDULA BULBOURETRAL

Es poca la información que se tiene sobre la inmunidad en este órgano (Mestecky *et al*, 2005), se ha reportado la presencia de linfocitos en las glándulas bulbouretrales de los humanos (Migliari *et al*, 1992).

Se han observado pocos linfocitos CD8+ intraepiteliales así como un pequeño número de macrófagos y linfocitos CD4+, presentes principalmente en la lámina propia de ratones. El sitio de mayor producción y transporte de IgA se observa en las glándulas bulbouretrales de los ratones, mientras que en humanos los linfocitos B son escasos (Mestecky *et al.*, 2005).

#### 4.5. CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE EN LA PRÓSTATA

La próstata humana contiene numerosos linfocitos en el epitelio y la lámina propia y pueden demostrarse cúmulos focales de linfocitos y abundan los macrófagos. Comúnmente se han detectado células plasmáticas contenedoras de IgA e IgM, sugiriendo que la mucosa de la próstata es activa en la respuesta inmune local del aparato reproductor. (Bene, *et al.*, 1988; Doble *et al.*, 1990).

#### 4.6. CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA URETRA

En los hombres, la uretra peneana es un sitio de infección primaria por patógenos de transmisión sexual. La investigación sobre la mucosa de éste sitio ha sido limitada debido en parte a los problemas de muestreo, pero evidencia disponible indica que la uretra contiene una gran variedad mediadores inmunológicos los cuales pueden montar una vigorosa respuesta tanto innata como adaptativa contra los agentes infecciosos (Pudney *et al.*, 2010). Las superficies mucosas están recubiertas por una capa de moco que juega un papel importante en la inmunidad innata como primera línea de defensa, como la captura y eliminación de microbios. El moco obtiene sus características estructurales de las mucinas, una familia de glicoproteínas. Recientemente se han caracterizado mucinas expresadas por el epitelio de la uretra: MUC1, MUC3, MUC4, MUC13, MUC15, MUC17 Y MUC20 (Russo *et al.*, 2006).

También en el epitelio de la uretra es uno de los pocos órganos genitales que expresa TLR 9, un receptor que detecta ácido nucleico viral y juega un papel importante como defensa antiviral. Células inmunes en la uretra también expresan TLR 1 (Hemmi *et al.*, 2000).

De los factores adquiridos se han encontrado, linfocitos CD4+ los cuales se restringen principalmente a la lámina propia, al igual que marcas para IgA+ e IgM+.



#### 4.7. CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE EN LA URETRA PÉLVICA DEL CARNERO

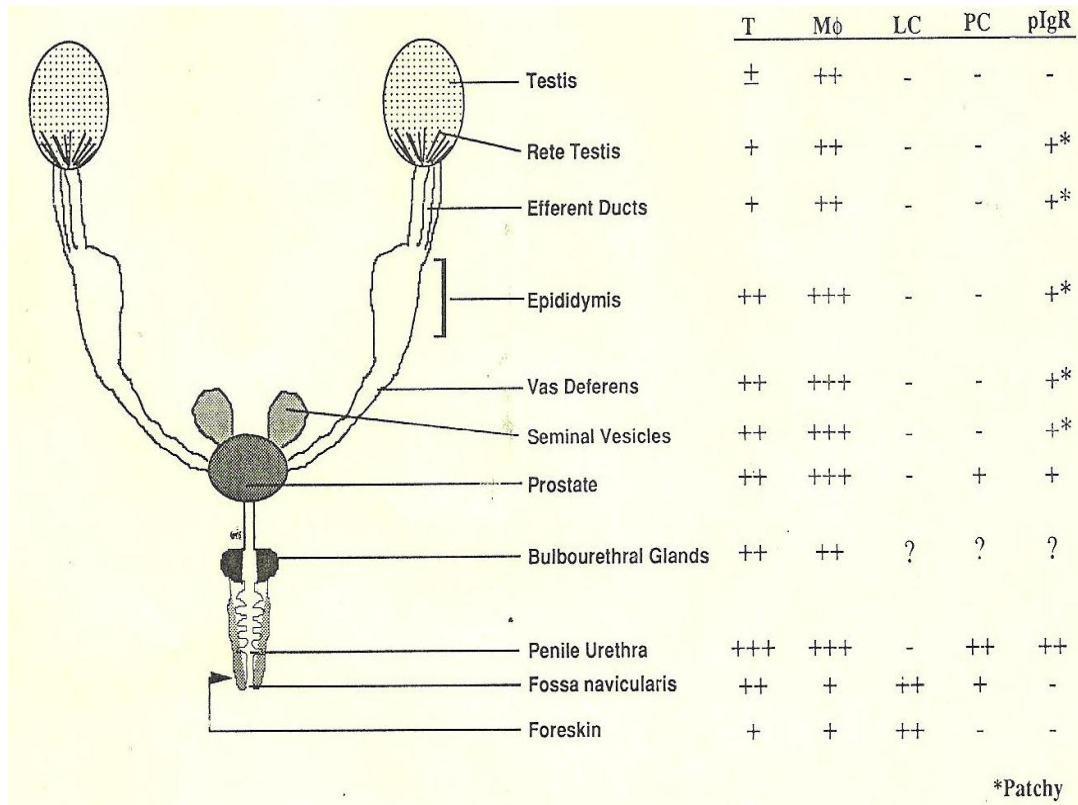
Se ha descrito la distribución de células implicadas en la respuesta inmune en la uretra pélvica del borrego, delimitándolas en las áreas intraepitelial y del conectivo (lamina propia), en un trabajo realizado por Acosta y col., 2009, en el que encontraron abundantes células plasmáticas IgA+, escasas células plasmáticas IgM+ y no encontraron células plasmáticas IgG+ en la mucosa de la uretra pélvica. Las células IgA+ e IgM+ se ubicaron en el tejido conectivo, en el caso de las IgA+ se encontraban próximas a la membrana basal del epitelio. Las células IgM+ se encontraron ubicadas en la mucosa. También encontraron linfocitos CD4+ y CD8+ tanto en el conectivo como intraepiteliales, las células TCR  $\gamma\delta$  (WC1) se ubicaron principalmente intraepiteliales y los macrófagos se localizaron mayoritariamente en el conectivo.

La presencia de macrófagos (CD14), linfocitos CD4, CD8, TCR  $\gamma\delta$  (WC1), ICCs IgM e IgA y células CD45RO, sugiere que la uretra pélvica podría actuar como sitio de inducción y efector de la repuesta inmune (Acosta, 2006; Acosta, *et al*, 2009).

#### 4.8. LEUCOCITOSPERMIA

Los leucocitos están presentes en todo el aparato reproductor masculino y se encuentran en casi todos los eyaculados humanos (Nabil *et al.* 2004; Patchy *et al.* 1992; Trum *et al.* 1998). Los granulocitos son el tipo más frecuente de leucocito en semen (50-60%), seguidos por los macrófagos (20-30%) y linfocitos T (2-5%). La leucocitospermia está definida por la Organización Mundial de la Salud como la presencia de leucocitos peroxidasa-positivos en concentraciones superiores a  $1 \times 10^6$  por ml de semen, el origen de los leucocitos presentes en semen no ha sido determinado (Trum, *et al.*, 1998; Aziz, *et al.* 2004).

**Figura 1. Esquema del aparato reproductor humano mostrando la distribución de algunas células involucradas en la respuesta inmune adquirida**



Tomada de Mesteky et al, 2005. (T) linfocitos T, (Mφ) macrófago, (LC) células de dendríticas, (PC) células plasmáticas y (pIgR) células epiteliales que expresan el receptor polimérico de inmunoglobulinas.

Ortiz de Montellano en 2004, describe en machos cabríos normales la presencia de leucocitospermia (neutrófilos) asociada a situaciones de estrés determinadas por las relaciones de dominancia entre los animales, la migración de neutrófilos se asoció a picos de cortisol y testosterona y a defectos en la calidad seminal. Estudios preliminares indican los mismos cambios en carneros.

Durante el metaestro en ratonas, un gran número de neutrófilos se infiltran en el epitelio y pasan a la luz vaginal, presumiblemente debido a una quimiocina específica de neutrófilos, MIP-2. El papel de la infiltración de neutrófilos, sin

embargo, sigue siendo poco claro, pero los resultados sugieren que la infiltración de neutrófilos en vagina depende de los niveles de hormonas esteroideas (Sasaki, *et al.*, 2009).

## **5. TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE**

La inmunofluorescencia y la inmunohistoquímica son técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos en las células o tejidos. Estas técnicas se basan en la capacidad de anticuerpos marcados de unirse específicamente a sus antígenos correspondientes, esta reacción es visible cuando el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración. En las técnicas de inmunofluorescencia se utilizan fluoró cromos que absorben energía de una longitud de onda específica y la remiten en otra determinada de mayor longitud de onda, la cantidad de energía emitida y su longitud de onda dependen tanto del propio fluoró cromos como de su ambiente químico. El isotiocianato de fluoresceína emite luz verde amarillenta intensa. Estas técnicas se utilizan con muestras en fresco, congeladas o fijadas. (Bryson, *et al.*, 1999).

Las técnicas inmunohistoquímicas enzimáticas permiten una localización más precisa de las reacciones, ya que la tinción es permanente, estable, puede contrastarse y puede ser evaluada con microscopio de luz. Los anticuerpos monoclonales han permitido aumentar la especificidad, sensibilidad y posibilidades del uso de esta técnica. Existen diversos tipos de técnicas según el anticuerpo a utilizar (monoclonal o policlonal), material disponible (fresco, congelado o fijado en formalina) y antígenos a estudiar (de superficie o membrana, citoplasmáticos o nucleares) (Buys, *et al.*, 2007).

## 6. JUSTIFICACIÓN

Son pocas las descripciones sobre las poblaciones de células de respuesta inmune en el aparato reproductor de los machos y del carnero y no las hay sobre sus posibles variaciones en consideración a la edad y condición puberal. Los mecanismos de respuesta inmune y la patogenia de las enfermedades del aparato reproductor del macho no han sido esclarecidos completamente, lo cual dificulta el planteo de estrategias de prevención y control. Conocer la distribución normal de las células de respuesta inmune permitirá una mejor comprensión de su participación en los casos de enfermedad. Al efectuar este estudio descriptivo en una población de machos ovinos normales de diferentes edades, libres de enfermedad en el aparato reproductor, se espera aportar más información sobre las células de respuesta inmune y del Tejido Linfoide Asociado al Tracto Reproductor.

## 7. HIPÓTESIS

La distribución de células de respuesta inmune del aparato reproductor del carnero se modifica con la edad y la pubertad.

## 8. OBJETIVO GENERAL

Identificar y cuantificar las poblaciones celulares participantes en la respuesta inmune (CD4+, CD8+, MOS, CCI IgA+, CCI IgG+ y CCI IgM+) del aparato reproductor del carnero en animales serológicamente negativos a brucelas lisas, *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*, en una población abierta y clínicamente sanos.

## 9. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar mediante pruebas serológicas machos ovinos negativos a brucelas lisas, *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni*.
2. Determinar las medidas y pesos anatómicos de las glándulas genitales accesorias de machos ovinos serológicamente negativos a brucelas lisas, *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*.
3. Describir la histología normal de las glándulas anexas del aparato reproductor de animales pre y postpúberales.
4. Cuantificar la leucocitospermia en machos serológicamente negativos a brucelas lisas, *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*.
5. Estudiar la distribución y cuantificar los macrófagos en el aparato reproductor de machos ovinos de diferentes edades, seronegativos a

brucelas lisas, *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*, clínicamente sanos, mediante pruebas de inmunofluorescencia.

6. Estudiar la distribución y cuantificar los linfocitos CD4+ y CD8+ en el aparato reproductor de machos ovinos de diferentes edades, seronegativos a brucelas lisas, *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*, clínicamente sanos, mediante pruebas de inmunohistoquímica.
7. Estudiar la distribución y cuantificar las células contenedoras de inmunoglobulinas (IgA+, IgG+ e IgM+) en el aparato reproductor de machos ovinos normales de diferentes edades, seronegativos a brucelas lisas, *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*, clínicamente sanos, mediante pruebas de inmunofluorescencia.

## 10. MATERIAL Y MÉTODOS

### 10.1. ANIMALES

Se recolectaron muestras de aparatos reproductores masculinos, frotis de esmegma y suero de 62 machos ovinos cruzas de pelo, sacrificados en rastro.

Para la descripción histológica se utilizaron las muestras de 60 animales serológicamente negativos a brucelas lisas, *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*.

Para la cuantificación de la leucocitospermia se utilizaron 40 frotis de material seminal provenientes de estos animales.

Para los conteos celulares (macrófagos, CD4+, CD8+, IgA+, IgG+ e IgM+) en los diferentes órganos se utilizaron las muestras de 15 animales de los cuales se obtuvo el aparato reproductor completo (testículo, epidídimo: cabeza, cuerpo y cola, vesícula seminal, ámpula del conducto deferente, glándula bulbouretral, próstata diseminada, uretra pélvica y peneana), del resto de los animales aunque se obtuvieron los aparatos incompletos, las muestras fueron evaluadas para describir su anatomía e histología, los animales se distribuyeron en tres grupos:

Grupo 1: (n=3) muestras provenientes de animales menores de 6 meses de edad, ovinos prepuberales (OPP).

Grupo 2: (n=6) muestras provenientes de animales entre 6 meses y un año de edad, ovinos puberales (OP).

Grupo 3: (n=6) muestras provenientes de animales mayores de 1 año de edad, ovinos adultos (OA).

### 10.2. TOMA DE MUESTRAS

El periodo de recolección de las muestras fue de 6 meses durante los cuales se tomaron al sacrificio de 62 animales: 60 vesículas seminales, 45 ámpulas, 37 uretras pélvicas, 27 glándulas bulbouretrales, 29 uretras peneanas, 18 testículos, 18 epidídimos (cabeza, cuerpo y cola), y 40 frotis de material "seminal". Los frotis se realizaron a partir de una gota obtenida escurriendo el contenido de la uretra peneana. Se tomó un fragmento de cada órgano, se fijaron

en formalina amortiguada al 10%, se procesaron por la técnica de inclusión en parafina y posteriormente se obtuvieron cortes de 4 micras; los cortes se tiñeron con H.E al igual que los frotis que fueron fijados con etanol absoluto (Garrido, 2008) para su evaluación histológica. Se reservaron cortes para su posterior utilización en las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

### **10.3. PRUEBA DE TARJETA**

Para la detección de posibles infecciones por brucelas lisas se utilizó la prueba de tarjeta, se utilizó un antígeno formulado con una suspensión coloreada de *Brucella abortus*, cepa 1119-3, inactivado por calor, concentrado al 3% y ajustado a un pH ácido, lo que le permite detectar anticuerpos de *Brucella abortus* y *melitensis* en el suero sanguíneo de animales infectados (PRONABIVE, Reg. SAGARPA B-0653-023) (Núñez, *et al.*, 1997).

### **10.4. INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR (IDGA)**

Esta técnica se empleó para la detección de anticuerpos contra *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* en el suero de los animales muestreados. Para la detección de *B. ovis* y *A. seminis* se empleó como antígeno el extracto salino calentado (ESC), utilizando la cepa de referencia *B. ovis* Reo 198, se siguió la técnica descrita por Myers; la cepa de referencia 15768 para *A. seminis* y la cepa de referencia de ATCC (American type culture collection) para *H. somni* y la técnica descrita por Stephens *et al.*, 1990.

### **10.5. MEDICIÓN Y PESAJE DE LAS GLÁNDULAS GENITALES ANEXAS**

De los aparatos reproductores obtenidos se diseccionó cada una de las glándulas, permitiendo así la medición y el pesaje individual de cada una. Se midieron y pesaron 40 pares de ámpulas (derecha e izquierda), 43 pares de vesículas seminales (derecha e izquierda), 26 pares de bulbouretrales (derecha e izquierda) y 29 uretras pélvicas provenientes de los animales de alrededor de 1 año. La medición se realizó en cm con un Vernier, se tomó el ancho, largo y



profundo de cada glándula. El pesaje se realizó en gramos con una balanza granataria.

#### **10.6. INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE MACRÓFAGO+, CÉLULAS PLASMÁTICAS IgA+, IgG+ E IgM+ EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS**

Para el marcaje de los macrófagos se utilizaron los cortes en parafina, el primer paso en la técnica consistió en el desparafinado e hidratado de la laminilla, posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS 1x, luego se realizó un bloqueo con leche descremada al 0.5% durante 25 minutos a temperatura ambiente, seguido de tres lavados de 5 minutos con PBS 1x, después se realizó una permeabilización con PBS-Tritón al 1% durante 20 minutos y luego se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS 1x. Se colocó el anticuerpo primario de ratón anti-macrófago humano (Cat. sc-71533, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluido 1:400 en PBS 1x, la incubación se realizó durante 1 hora a 37°C. Se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS 1x y se colocó el anticuerpo secundario, cabra anti-ratón IgG conjugado con FITC (Cat. Sc-2010, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluido 1:400 en PBS 1x durante 45 minutos a temperatura ambiente (Cuadro 1). Finalmente se lavó nuevamente 3 veces 5 minutos con PBS 1x, y se montó con glicerogel y se observó en un microscopio de inmunofluorecencia Olympus BX 60 (Olympus Optical Co., LTD, Tokyo, Japón). Se utilizó como control un corte en el cual se sustituyó el anticuerpo primario por PBS 1x, para luego seguir la técnica descrita arriba. Este control se incluyó ante la posibilidad de marcación inespecífica por el conjugado anti IgG de ratón. Como control positivo se utilizó un corte de linfonodo en el que se encuentra marca positiva para los macrófagos.

Para el marcaje de las células Igs positivas se siguió la misma técnica, solo se omitió el paso del anticuerpo secundario, porque el anticuerpo primario venia ya conjugado con FITC.

**CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS EN LA INMUNOFLUORESCENCIA**

DESIGNACIÓN DEL ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	PROCEDENCIA	DILUCIÓN	LABORATORIO
Anti-IgA	Anti IgA ovina	Antisuero policlonal de conejo	1:400	BETHYL
Anti-IgG	Anti IgG ovina	Antisuero policlonal de conejo	1:400	BETHYL
Anti-IgM	Anti IgM ovina	Antisuero policlonal de conejo	1:400	BETHYL
Marcador de Macrófago	Macrófago humano	Ratón IgG1 sobrenadante	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti ratón IgG-FITC	Anti IgG ratón	Cabra IgG sobrenadante	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

**10.7. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE LINFOCITOS CD4+ Y CD8+ EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS**

Para el marcaje de linfocitos CD4+ y CD8+ se utilizaron los cortes en parafina, de igual forma que para la inmunofluorescencia, el primer paso consistió en el desparafinado e hidratado de la laminilla, posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0.1%, luego se realizó un bloqueo de la peroxidasa endógena con PBS 1x- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% por 15 minutos a temperatura ambiente, después se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0.1%, en seguida se realizó el bloqueo con PBS-albumina al 1% durante 20 minutos, después tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0.1%, luego se realizó una corta digestión con tripsina (Cat. T3924, Trypsin-EDTA solution, Sigma-Aldrich, Química) al 0.001% durante 3 minutos a temperatura ambiente, después tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0.1%, se permeabilizó con PBS-Tritón al 1% durante 5 minutos y se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0.1%, luego se colocó un recuperador de antígenos comercial (cat. S-1699, Target

Retrieval Solution 10X, DAKO®) por 15 minutos y seguido se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0.1%. Se colocaron los anticuerpos primarios anti-CD4 (Cat. Sc-80724, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluido 1:25 en PBS 1x y anti-CD8 (Cat. Sc-59119, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluido 1:50 en PBS 1x, la incubación se realizó durante 2 horas a 37°C (Cuadro 2). Se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS 1x y se colocó el anticuerpo secundario, cabra anti-ratón IgG Biotinilado (Cat. sc-2050, Santa Cruz Biotechnology, Inc), se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente, después se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS 1x, seguido se colocó el complejo HRP-estreptavidina (Cat. sc-2050, Santa Cruz Biotechnology, Inc), por 30 minutos, se realizaron nuevamente tres lavados de 5 minutos con PBS 1x, mientras se incubaban las muestras con el complejo se preparó el sustrato HRP, se aplicó por 20 minutos y posteriormente se realizó una tinción de contraste con hematoxilina diluida con agua destilada 1:4 durante 1 minuto, después las laminillas se sumergieron en una solución de carbonato de litio al 1% durante 3 minutos para obtener una coloración azul de los núcleos. Finalmente se deshidrataron, aclararon y montaron con resina sintética. Como control positivo se utilizó un corte de linfonodo en el que se encuentra marca positiva para estas células.

**CUADRO 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA**

DESIGNACIÓN DEL ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	PROCEDENCIA	DILUCIÓN	LABORATORIO
Anti-CD4	CD4 humano	monoclonal de ratón	1:25	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-CD8	CD8 humano	Monoclonal de ratón	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti ratón IgG-Biotinilado	Anti IgG ratón	Cabra IgG sobrenadante	1	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

## 10.8. CONTEO CELULAR

El conteo celular tanto en la inmunofluorescencia como en la inmunohistoquímica, se realizó en 10 campos de 40 X 10 utilizando un microscopio Olympus BX 60 (Olympus Optical Co., LTD, Tokyo, Japón) adaptado a un equipo de cómputo que contiene un *software* de análisis de imágenes, Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver spring, USA). Se contaron las células presentes en el centro del campo, proyectada por el programa, y se contabilizó la superficie del tejido mediante dicho programa.

En el epidídimo y testículo se escogieron cortes donde se apreciaran túbulos y se contaron las células alrededor de los mismos, tanto en el tejido conectivo como en el epitelio. En las glándulas bulbouretrales, ámpula del conducto deferente y vesícula seminal se contaron las células marcadas encontradas en el parénquima glandular epitelial y en el tejido conectivo y en la uretra se contabilizaron las células marcadas en la mucosa.

Para el conteo de células polimorfonucleares en los frotis de contenido seminal se examinaron 10 campos de 40 X 10, utilizando un microscopio Olympus BX 60 (Olympus Optical Co., LTD, Tokyo, Japón).

## 10.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

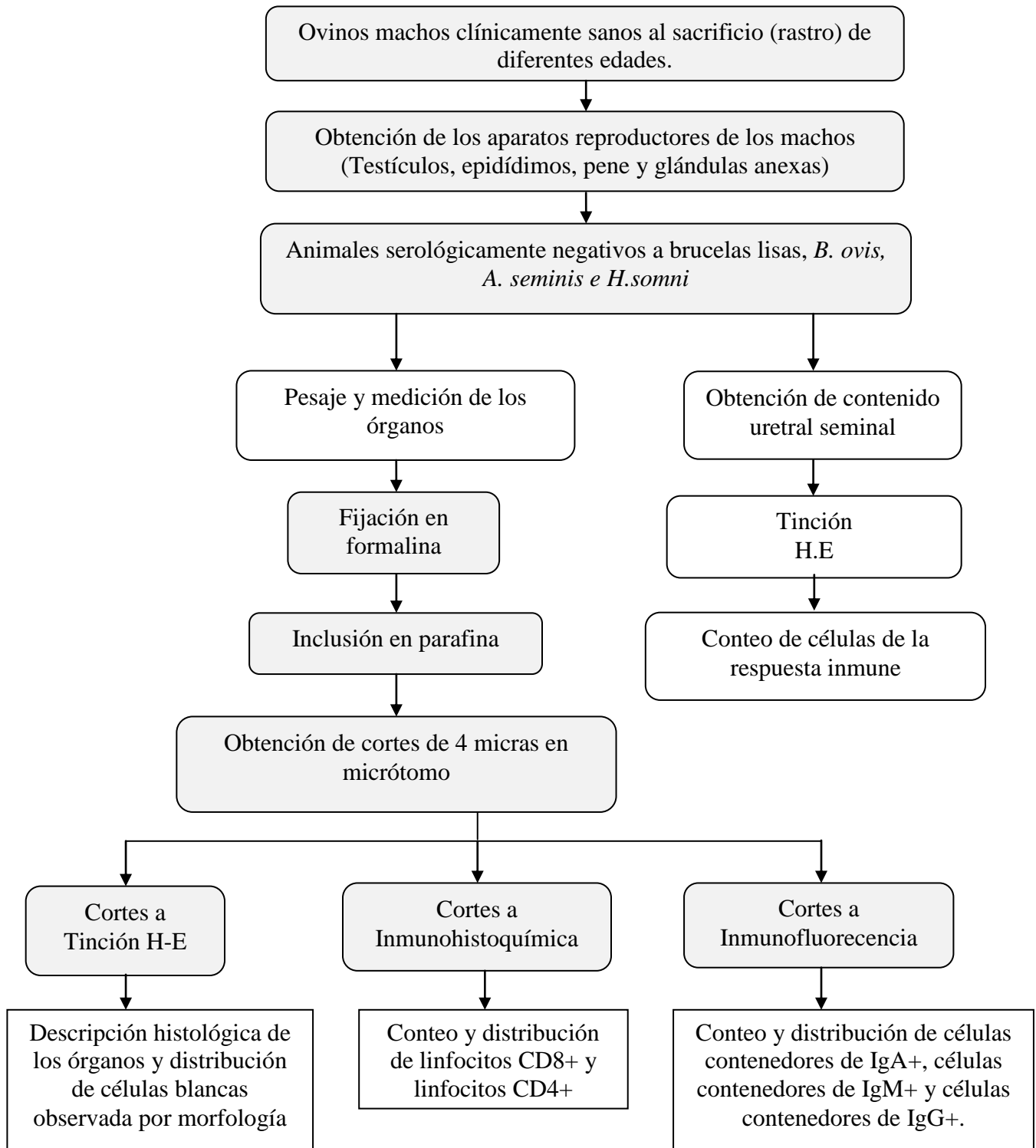
Para los resultados de las medidas y pesos de las glándulas accesorias se reportó la media y su desviación estándar.

Para los conteos celulares de linfocitos CD4+ y CD8+, células plasmáticas IgG+, IgA+ e IgM+, se buscaron diferencias entre grupos OPP, OP y OA, realizando la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Mann-Whitney, si demostraron diferencias significativas en la primera.

Los gráficos se presentan exponiendo la media  $\pm$  desviación estándar o la media  $\pm$  el error estándar. En todos los casos se consideró la existencia de diferencia estadística cuando  $p < 0.05$ . Las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney se corrieron con el software SPSS 16 para Windows (SPSS Corp.,

Chicago, USA) y para las medias de los pesos y medidas de las glándulas se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus Version 5.0.

**Figura 2. Diseño experimental**



## 11. RESULTADOS

### 11.1. RESULTADOS SEROLÓGICOS

De los 62 animales muestreados, los 62 resultaron negativos a la prueba de tarjeta para brucelas lisas, 61 negativos a la prueba de IDGA para *B. ovis*, 60 Negativos a la prueba de IDGA para *A. seminis* y 59 negativos a la prueba de IDD para *H. somni*. Ninguno de los animales fue positivo a más de una prueba (cuadro 3).

**CUADRO 3. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS EN LOS 62 ANIMALES MUESTREADOS, PORCENTAJES DE ANIMALES POSITIVOS**

GRUPO	BRUCELAS LISAS	IDD B. OVIS	IDD A. SEMINIS	IDD H. SOMNUS
OPP	0%	0%	1.6%	1.6%
OP	0%	1.6%	0%	0%
OA	0%	0%	1.6%	3.2%

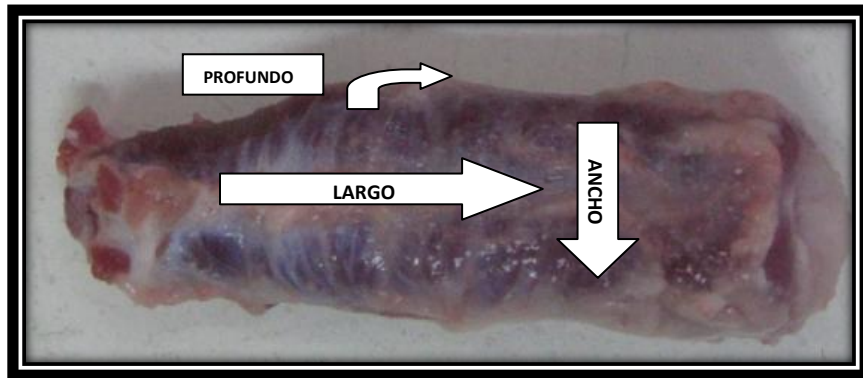
### 11.2. RESULTADOS MORFOMÉTRICOS

Las medidas promedio que se obtuvieron para las diferentes glándulas en animales de los grupos OP y OA, se muestran en el (cuadro 4). No se realizaron comparaciones entre grupos debido a que las muestras obtenidas del OPP fueron escasas

**CUADRO 4. NÚMERO PROMEDIO DE LAS MEDIDAS Y PESOS DE LAS GLÁNDULAS ACCESORIAS DE LOS GRUPOS OP Y OA**

Órgano	n	Longitud	Ancho	Profundo	Peso
Ámpula del conducto deferente	40	5.8 ± 1 cm	0.5 ± 0.2 cm	0.5 ± 0.2cm	1.9 ± 0.5 g
Vesícula seminal	43	2.6 ± 0.5 cm	1.7 ± 0.5 cm	1.2 ± 0.4 cm	4.3 ± 2 g
Glándula bulbouretral	26	1.5 ± 0.4 cm	1 ± 0.3 cm	1.1 ± 0.4 cm	1.8 ± 0.7 g
Uretra pélvica	29	5 ± 1 cm	1.5 ± 0.4 cm	1.1 ± 0.5 cm	10.6 ± 2.5 g

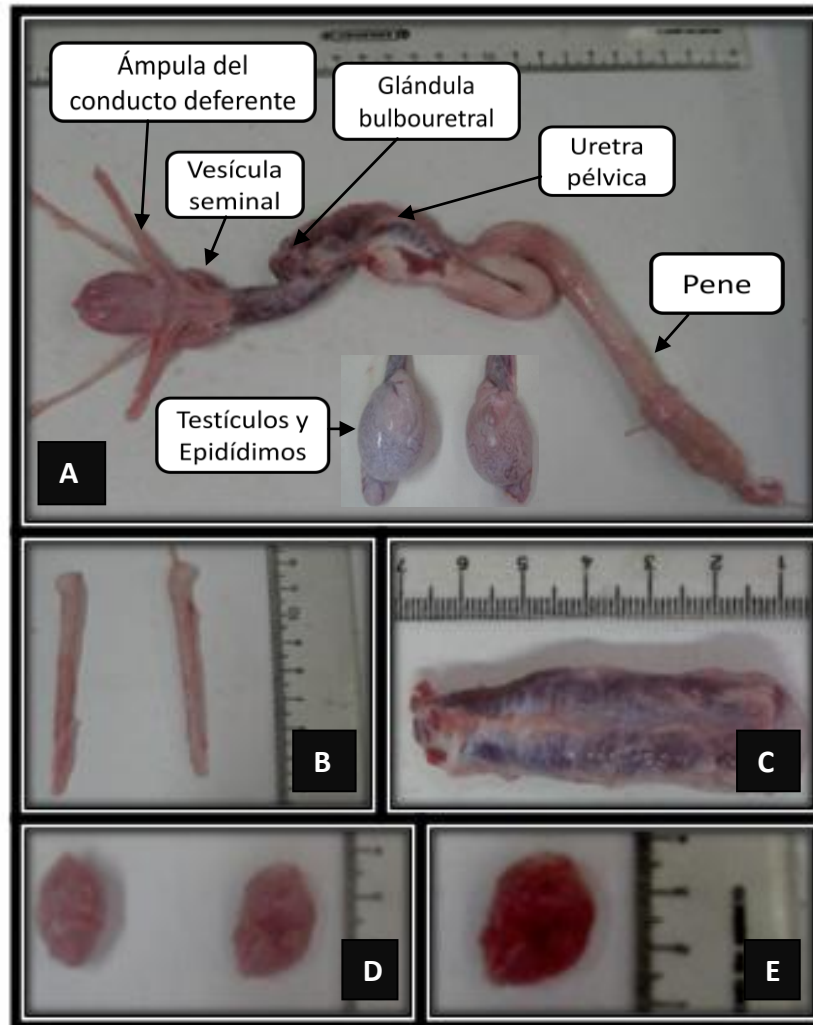
**Figura 3. Medidas de largo, ancho y profundo de la uretra pélvica**



*En la imagen se muestra una uretra pélvica de carnero, las flechas indican cómo fueron tomadas las medidas.*



**Figura 4. Aparato reproductor de ovino y sus glándulas anexas**



**A.** Aparato reproductor de macho ovino sin alteraciones aparentes. **B.** Ámpulas del conducto deferente diseccionadas. **B.** Uretra pélvica diseccionada. **C.** Vesículas seminales diseccionadas. **E.** Glándula bulbouretral diseccionada.

### **11.3. PRESENCIA DE CÉLULAS INFLAMATORIAS EN EL CONTENIDO URETRAL SEMINAL**

De 40 animales del grupo OP y OA a los que se les tomó frotis de esmegma, el 85% mostró presencia de leucocitos, sobre todo de neutrófilos y el 7.5% de éstos evidenció presencia de células mononucleares de tipo monocito y linfocito. Los conteos variaron en rangos de 0 a 300 células en promedio por campo. Estos conteos se dividieron en cuatro categorías: en la primera, animales

que no presentaron células blancas (15%), en la segunda de 1 a 10 células (25%), en la tercera de 11 a 50 células (27.5%) y en la última más de 51 células (32.5%) de los animales (cuadro 5). En el cuadro 6 se presenta los resultados distribuidos en los grupos OP y OA.

**CUADRO 5. CONTEO PROMEDIO DE LEUCOCITOS EN ANIMALES NORMALES**

<i>Cantidad promedio de polimorfonucleares por campo 400X</i>	<i>% de animales</i>
0 células	15
1-10 células	25
11-50 células	27.5
Más de 51	32.5

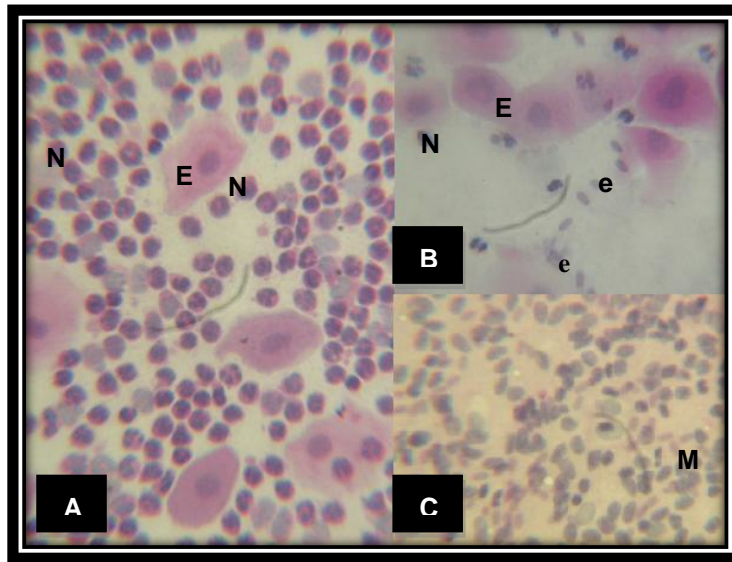
**CUADRO 6. CONTEO PROMEDIO DE LEUCOCITOS POR CAMPO EN LAS MUESTRAS DE CONTENIDO URETRAL SEMINAL**

<b>GRUPOS</b>	<b>PROMEDIO DE CÉLULAS</b>	<b>No. ANIMALES</b>
<b>OP</b>	-	<b>3</b>
	+	<b>8</b>
	++	<b>5</b>
	+++	<b>11</b>
<b>OA</b>	-	<b>3</b>
	+	<b>2</b>
	++	<b>6</b>
	+++	<b>2</b>

(-) no se observaron células inflamatorias, (+) de 1 a 10 células, (++) de 11 a 50 células, (+++) más de 51 células por campo.

Del grupo OPP no se obtuvieron muestras de esmegma.

**Figura 5. Frotis de contenido uretral seminal**

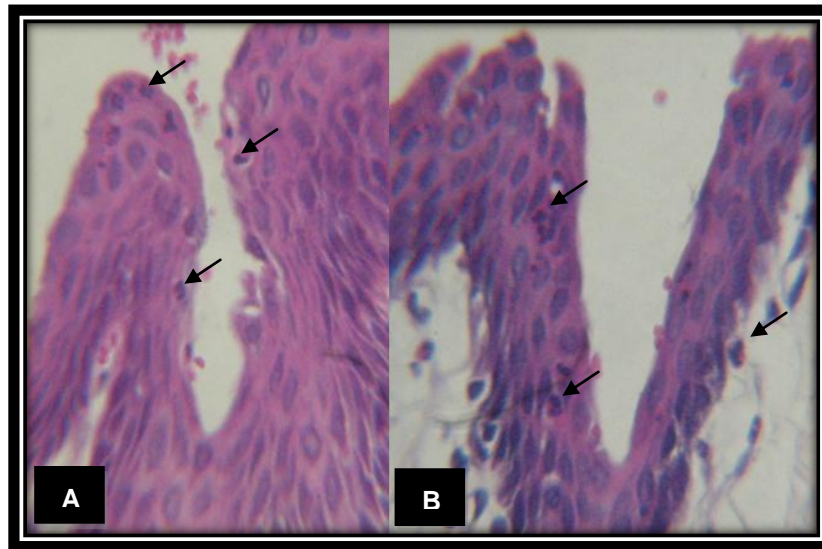


**A.** Frotis de contenido uretral seminal con más de 51 leucocitos (H-E, 400X). **B.** Frotis de contenido uretral seminal con 1 a 10 leucocitos (H-E, 400X). **C.** Frotis de contenido uretral seminal con células tipo linfocito y monocito (H-E, 400X). (**N**) Neutrófilo, (**M**) Mononuclear, (**e**) Espermatozoide, (**E**) Célula escamosa.

#### 11.4. DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DEL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS

En las evaluaciones histológicas la infiltración y migración de neutrófilos se observó mayoritariamente en la uretra peneana, seguido de la uretra pélvica y con menor grado en el ámpula del conducto deferente y vesícula seminal (figura 6).

**Figura 6. Corte histológico de uretra peneana y pélvica**



**A.** Corte histológico de uretra peneana (H-E, 400X). **B.** Corte histológico de uretra pélvica (H-E, 400X). En ambos cortes se observa la migración de neutrófilos (flechas negras) a través del epitelio escamoso.

#### 11.4.1 Testículo

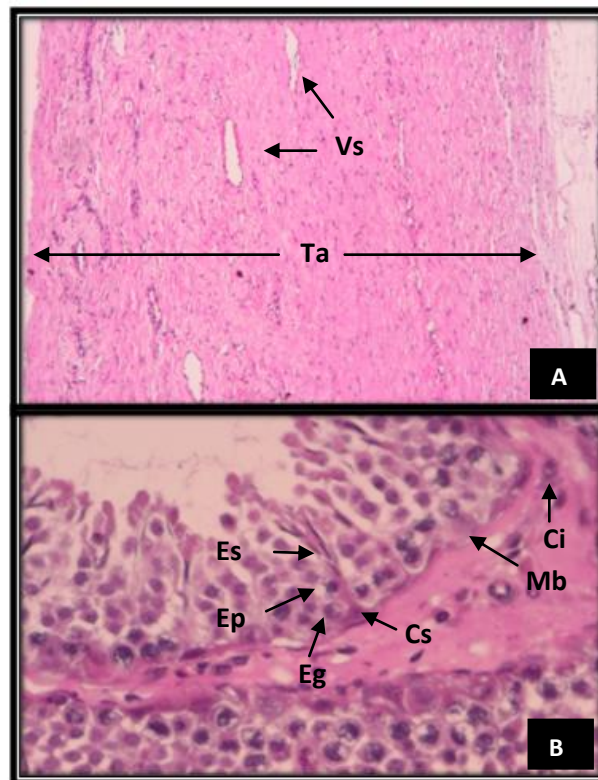
Cuando el testículo es extraído del escroto, la capa parietal de la túnica vaginal permanece adherida al escroto, mientras que la capa visceral, el peritoneo que cubre los testículos y los epidídimos permanece íntimamente asociado a la cápsula subyacente del testículo, la túnica albugínea, en los animales muestreados se tomó la muestra incluyendo la túnica albugínea y el análisis histológico consideró desde la túnica albugínea hasta la luz de los túbulos seminíferos.

En los grupos OP y OA la túnica albugínea presentó una capa de abundante tejido conectivo denso y vasos sanguíneos. En los espacios interlobulares se observó un tejido conectivo laxo y vasos sanguíneos. En los túbulos seminíferos se observaron las células sustentaculares presentando una forma piramidal y las células germinales en sus distintos estadios, ubicadas en las

prolongaciones citoplásmicas de las anteriores, también se observan células intersticiales.

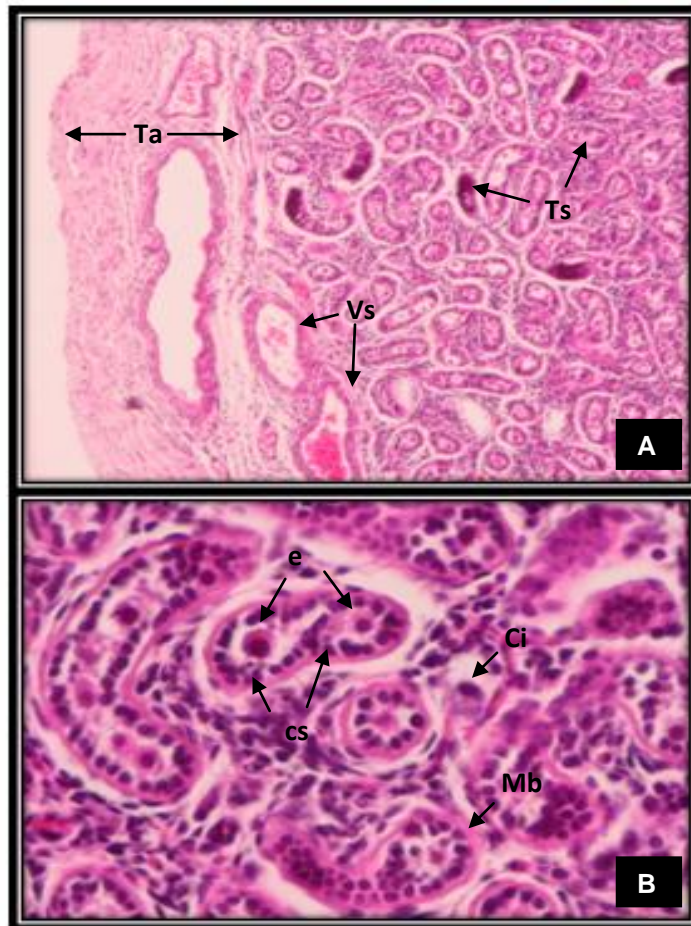
En los túbulos seminíferos del grupo OPP se observan dos tipos celulares, las células de soporte que tienen un núcleo pequeño y oscuro y las espermatogonias con núcleo pálido y mayor citoplasma, en el intersticio se observan células intersticiales y abundantes células de tejido conectivo. También se aprecia la túnica albugínea con las mismas características de la de un animal puberal (figura 7 y 8).

**Figura 7. Corte histológico de un testículo de un animal adulto ovino**



**A.** Corte histológico de la túnica albugínea del testículo, animal adulto ovino (H-E, 100X). Túnica albugínea (**Ta**), Vaso sanguíneo (**Vs**). **B.** Corte histológico del túbulo seminífero, animal adulto ovino (H-E, 400X) Célula intersticial (**Ci**), Membrana basal (**Mb**), Célula sustentacular (**Cs**), Espermatogonia (**Eg**), Espermatocito primario (**Ep**), Espermatida secundaria (**Es**).

**Figura 8. Corte histológico de testículo de animal prepuberal ovino**



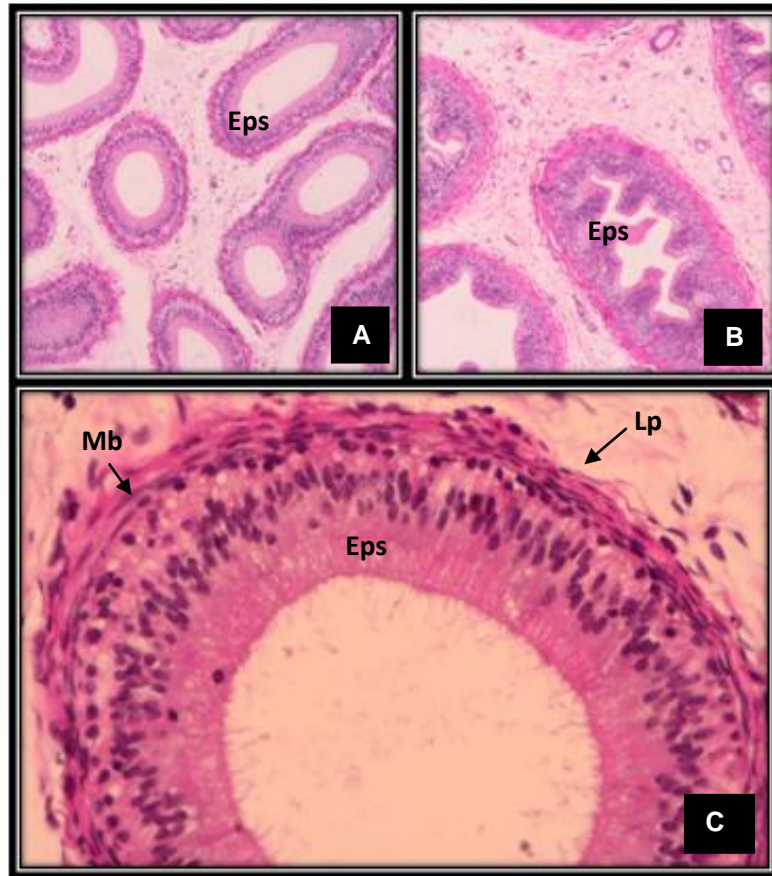
**A.** Corte histológico de testículo, animal prepuberal ovino (H-E, 100X). Túnica albugínea (**Ta**), Vasos sanguíneos (**Vs**), Túbulos seminíferos (**Ts**) **B.** Corte histológico de testículo, animal prepuberal ovino (H-E, 400X). Célula intersticial (**Ci**), Membrana basal (**Mb**), Célula sustentacular (**cs**), espermatogonia (**e**).

#### 11.4.2. Cabeza del epidídimo

En los grupos OP y OA la cabeza del epidídimo al igual que en el testículo, presentó la túnica albugínea de tejido conectivo denso. El epitelio que reviste a los conductos epidemarios es pseudoestratificado con estereocilios, lo rodea una lámina propia delgada de tejido conectivo, comparado con las otras dos regiones del epidídimo. En el grupo OPP se observó la túnica vaginal, el epitelio

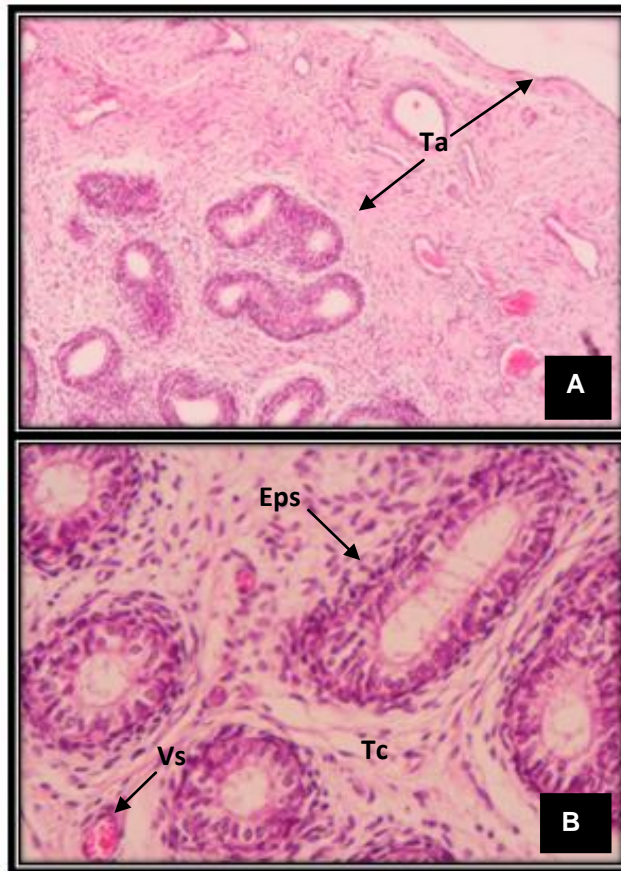
pseudoestratificado con estereocilios y células basales y tejido conectivo intertubular más abundante (figura 9 y 10).

**Figura 9. Corte histológico de la cabeza del epidídimo, animal adulto ovino**



**A.** Corte histológico de la cabeza del epidídimo, animal adulto ovino (H-E, 40X). **B.** Corte histológico de la cabeza del epidídimo, animal adulto ovino (H-E, 100X). **C.** Corte histológico de la cabeza del epidídimo, animal adulto ovino (H-E, 400X). Epitelio pseudoestratificado (**Eps**), Membrana basal (**Mb**), Tejido conectivo laxo (**Tc**), Lámina propia (**Lp**).

**Figura 10. Corte histológico de la cabeza del epidídimo, animal prepuberal ovino**



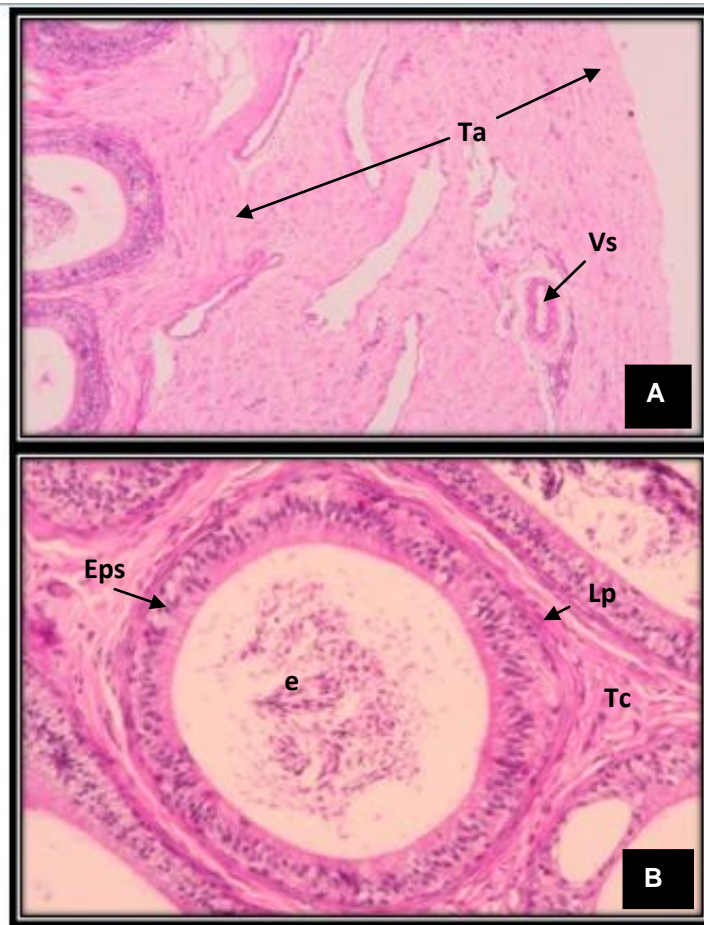
**A.** Corte histológico de la cabeza del epidídimo, animal prepuberal ovino (H-E, 100X).  
**B.** Corte histológico de la cabeza del epidídimo, animal prepuberal ovino (H-E, 400X).  
Epitelio pseudoestratificado (**Eps**), Tejido conectivo laxo (**Tc**), Túnica albugínea (**Ta**), Vasos sanguíneos (**Vs**).

### 11.4.3. Cuerpo del epidídimo

En los grupos OP y OA se observó un epitelio pseudoestratificado con estereocilios más cortos comparado con la región de la cabeza, las demás estructuras se apreciaron igual. En el grupo OPP se observa un epitelio columnar con pocas células en el intersticio (Figura 11 y 12).



**Figura 11. Corte histológico del cuerpo del epidídimo, animal adulto ovino**



**A.** Corte histológico del cuerpo del epidídimo, animal adulto ovino (H-E, 100X). **B.** Corte histológico del cuerpo del epidídimo, animal adulto ovino (H-E, 400X). Túnica albugínea (**Ta**), Vasos sanguíneos (**Vs**), Tejido conectivo laxo (**Tc**), Lámina propia (**Lp**), Epitelio pseudoestratificado (**Eps**), Espermatozoides (**e**).

**Figura 12. Corte histológico del cuerpo del epidídimo, animal prepuberal ovino**

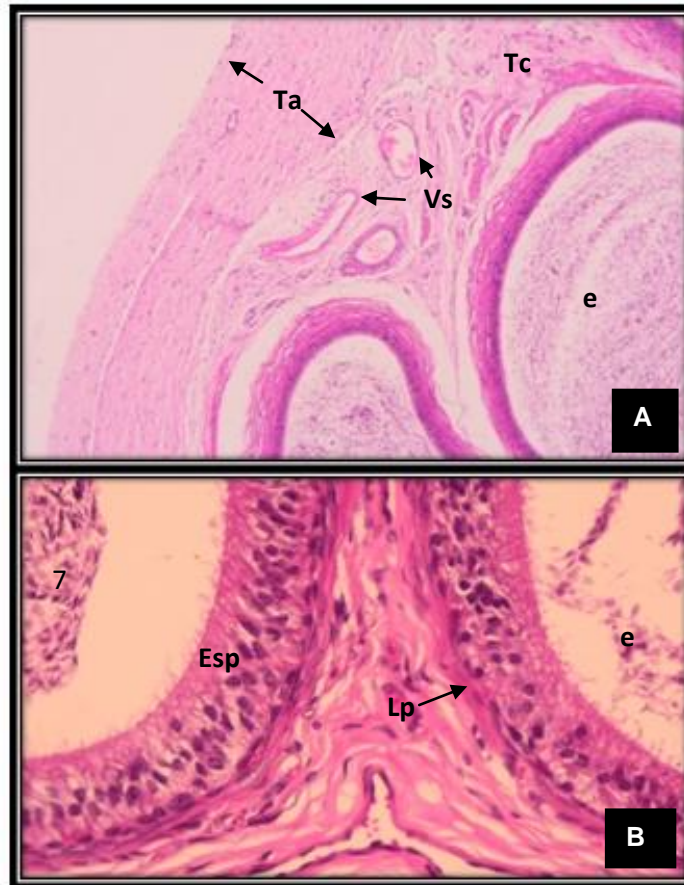


**A.** Corte histológico del cuerpo del epidídimo, animal prepuberal ovino (H-E, 100X). **B.** Corte histológico del cuerpo del epidídimo, animal prepuberal ovino (H-E, 400X). *Túnica albugínea (Ta), Vasos sanguíneos (Vs), Tejido conectivo laxo (Tc), Lámina propia (Lp), Epitelio columnar (Ec).*

#### **11.4.4. Cola del epidídimo**

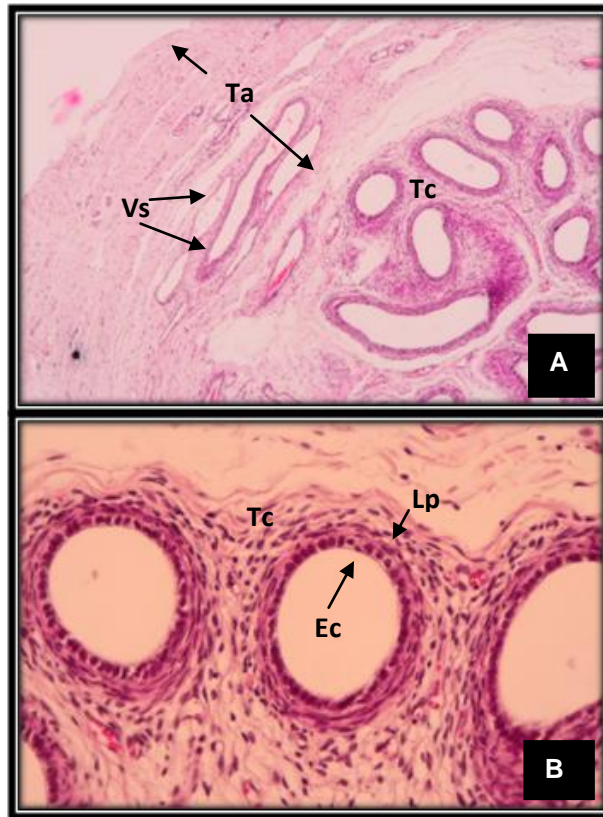
En los grupos OP y OA la cola del epidídimo se observó al igual que en las otra dos partes del epidídimo (cabeza y cuerpo) un epitelio pseudoestratificado con estereocilios, una lámina propia, la luz del túbulo del epidídimo es grande comparado con las otras dos regiones, alrededor del túbulo se aprecia una abundante lamina propia. En el grupo OPR se observa un epitelio columnar con abundantes células en el intersticio (figura 13 y 14).

**Figura 13. Corte histológico de la cola del epidídimo, animal adulto ovino**



**A.** Corte histológico de la cola del epidídimo, animal adulto ovino (H-E, 100X). **B.** Corte histológico de al cola del epidídimo, animal adulto ovino (H-E, 400X). Túnica albugínea (**Ta**), Vasos sanguíneos (**Vs**), Tejido conectivo laxo (**Tc**), Lámina propia (**Lp**), Epitelio pseudoestratificado (**Eps**), Espermatozoides (**e**).

**Figura 14. Corte histológico de la cola del epidídimo, animal prepuberal**



**A.** Corte histológico de la cola del epidídimo, animal prepuberal ovino (H-E, 100X). **B.** Corte histológico de la cola del epidídimo, animal prepuberal ovino (H-E, 400X). Tunica albugínea (**Ta**), Vasos sanguíneos (**Vs**), Tejido conectivo laxo (**Tc**), Lámina propia (**Lp**), Epitelio columnar (**Ec**).

#### 11.4.5. Uretra

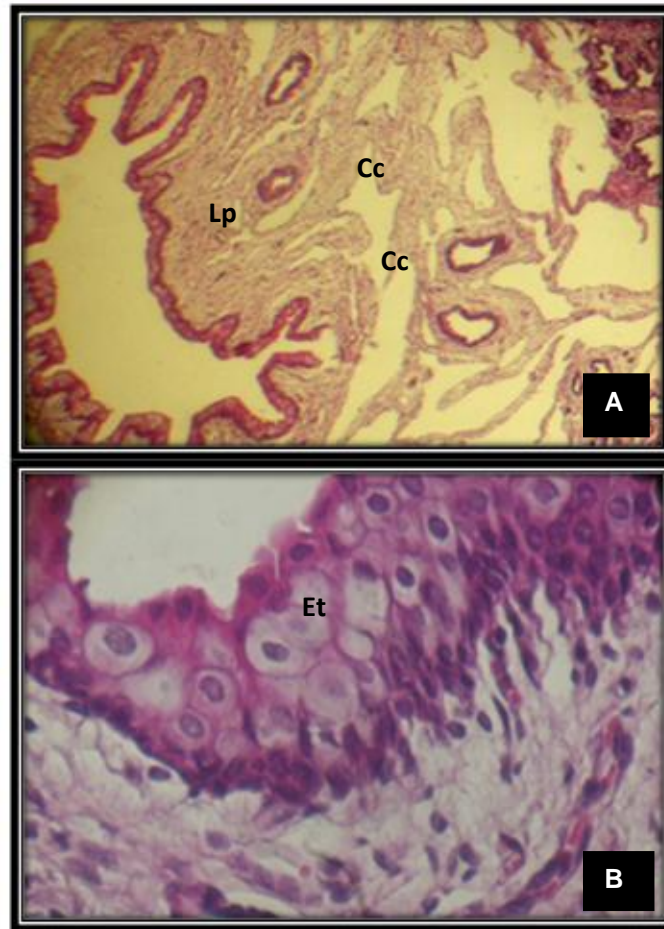
En los grupos OP y OA el epitelio de la uretra se observó principalmente de transición, sobre una lámina propia de tejido conectivo denso, por fuera de ésta los cuerpos cavernosos recubiertos de endotelio, la túnica muscular consta de músculo estriado, la túnica adventicia varió de tejido conectivo laxo a denso según la porción. En el grupo OPP se observan las mismas estructuras, un epitelio de transición, una lámina propia mucosa, cuerpos cavernosos, musculo estriado y una túnica adventicia (figura 15 y 16).

**Figura 15. Corte histológico de la uretra pélvica, animal adulto ovino**



**A.** Corte histológico de la uretra pélvica, animal adulto ovino (H-E, 100X). **B.** Corte histológico de la uretra pélvica, animal adulto ovino (H-E, 400X). Cuerpos cavernosos (**Cc**), Lámina propia (**Lp**), Epitelio de transición (**Et**).

**Figura 16. Corte histológico de la uretra pélvica, animal prepuberal ovino**



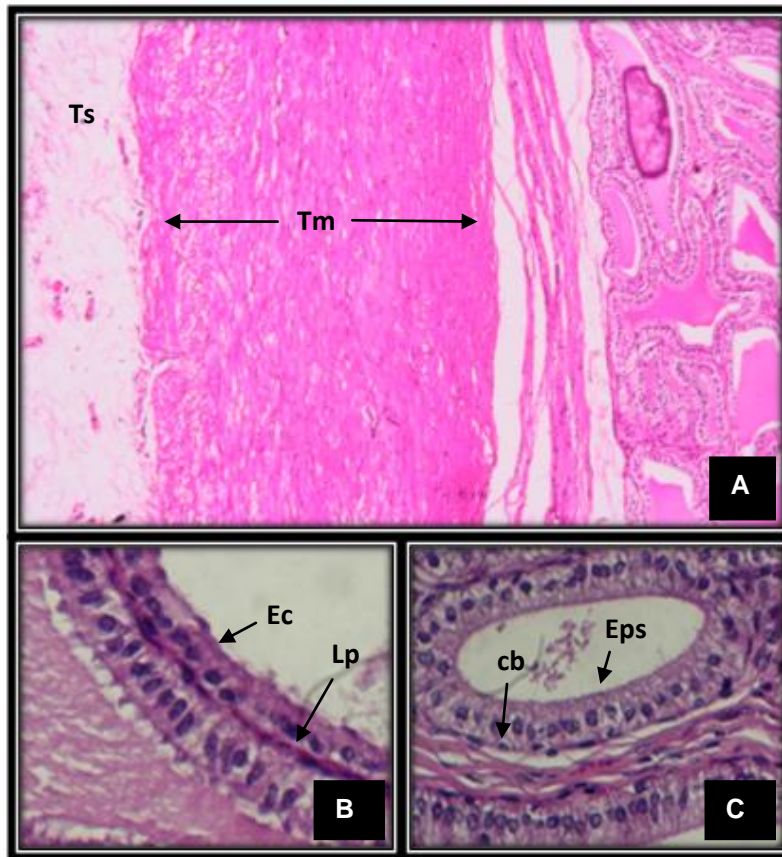
**A.** Corte histológico de la uretra pélvica, animal prepuberal ovino (H-E, 100X). **B.** Corte histológico de la uretra pélvica, animal prepuberal ovino (H-E, 400X). Cuerpos cavernosos (Cc), Lámina propia (Lp), Epitelio de transición (Et).

#### 11.4.6. Ámpula del conducto deferente

En los grupos OP y OA la luz del ámpula se presentó revestida por un epitelio columnar y pseudoestratificado, compuesto por células cuboides o cilíndricas y escasas células basales. La lámina propia presentó tejido conectivo laxo. La túnica muscular se observó por una capa circular interna y una longitudinal externa. La túnica serosa evidenció abundante tejido conectivo laxo. En el grupo OPP se observó que la glándula aún no está totalmente desarrollada y

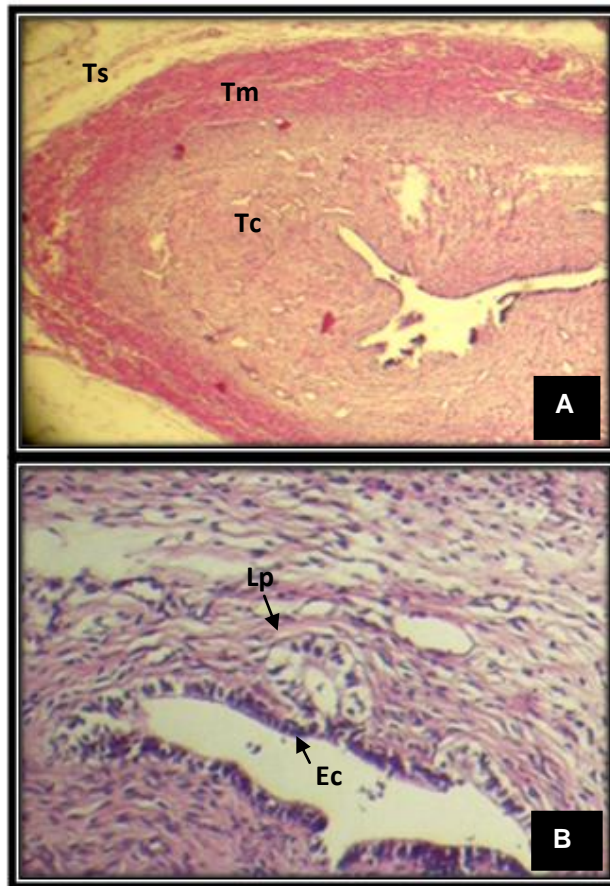
consta de un epitelio columnar simple, tejido conectivo y una túnica muscular (figura 17 y 18).

**Figura 17. Corte histológico del ámpula del conducto deferente, animal adulto ovino**



**A.** Corte histológico del ámpula del conducto deferente, animal adulto ovino (H-E, 100X). **B.** Corte histológico del ámpula del conducto deferente, animal adulto ovino (H-E, 400X). **C.** Corte histológico del ámpula del conducto deferente, animal adulto ovino (H-E, 400X). Túnica serosa (**Ts**), Epitelio columnar (**Ec**), Epitelio pseudoestratificado (**Eps**), Célula basal (**cb**), Lámina propia (**Lp**), Túnica muscular (**Tm**).

**Figura 18. Corte histológico del ámpula del conducto deferente, animal prepuberal ovino**



**A.** Corte histológico del ámpula del conducto deferente, animal prepuberal ovino (H-E, 100X). **B.** Corte histológico del ámpula del conducto deferente, animal prepuberal ovino (H-E, 400X). Epitelio columnar (**Ep**), Lámina propia (**Lp**), Tejido conectivo (**Tc**), Túnica muscular (**Tm**), Túnica serosa (**Ts**).

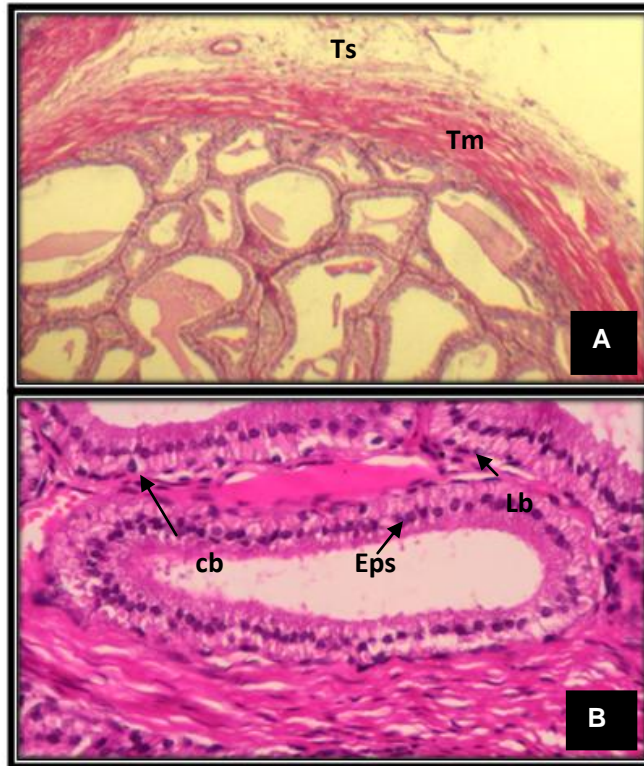
#### 11.4.7. Vesícula seminal

Histológicamente es una glándula tubuloalveolar, formada por lóbulos y lobulillos. En los grupos OP y OA, el túbulo presentó un epitelio pseudoestratificado, con células basales. Su lámina propia evidenció tejido conectivo laxo. La túnica muscular presentó dos capas, una circular interna y una longitudinal externa. La túnica adventicia demostró tejido conectivo laxo y abundantes plexos nerviosos. En el grupo OPP se observa poco desarrollo de los



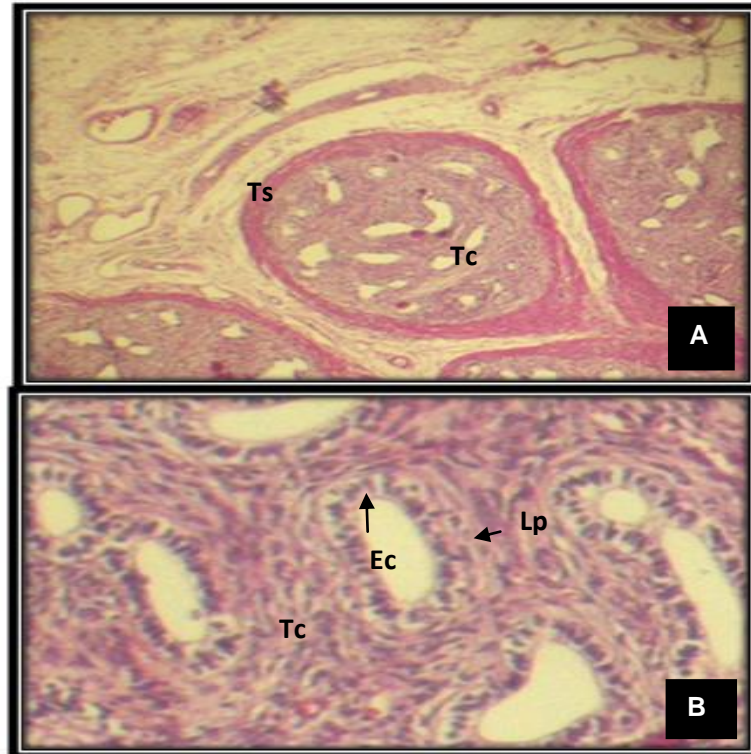
alveolos y acinos glandulares, con epitelio columnar simple y abundante tejido conectivo, y las túnicas muscular y adventicia (figura 19 y 20).

**Figura 19. Corte histológico de la vesícula seminal, animal adulto ovino**



**A.** Corte histológico de la vesícula seminal, animal adulto ovino (H-E, 100X). **B.** Corte histológico de la vesícula seminal, animal adulto ovino (H-E, 400X). **Ts**, **Tunica serosa** (**Ts**), **Epitelio pseudoestratificado** (**Eps**), **Célula basal** (**cb**), **Lámina basal** (**Lb**), **Túnica muscular** (**Tm**).

**Figura 20. Corte histológico de la vesícula seminal, animal prepuberal ovino**

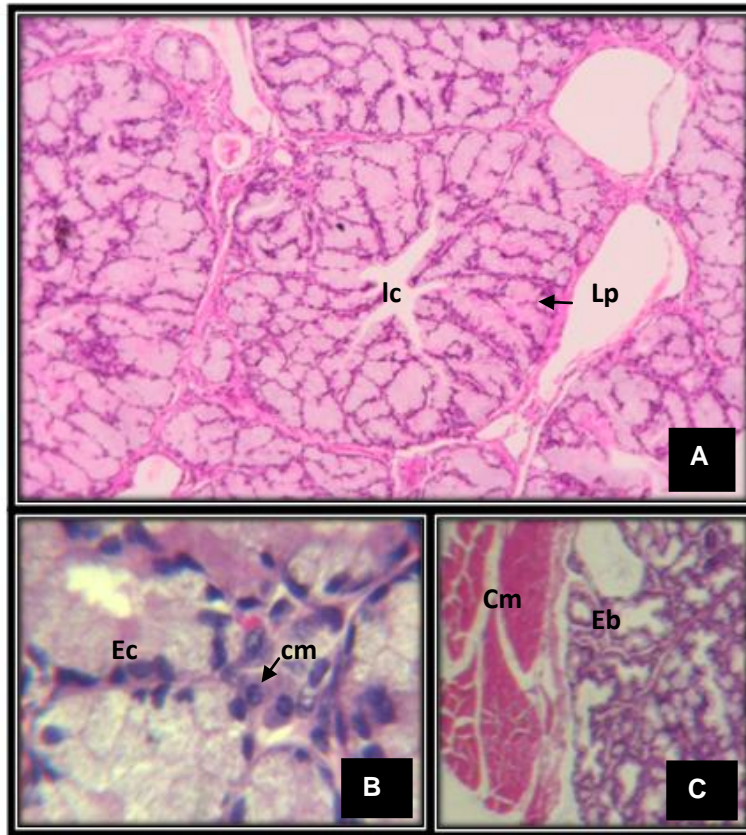


**A.** Corte histológico de la vesícula seminal, animal prepuberal ovino (H-E, 100X). **B.** Corte histológico de la vesícula seminal, animal prepuberal ovino (H-E, 400X). Epitelio columnar (**Ep**), Lámina propia (**Lp**), Tejido conectivo (**Tc**), Túnica muscular (**Tm**), Túnica serosa (**Ts**).

#### **11.4.8. Glándula bulbouretral**

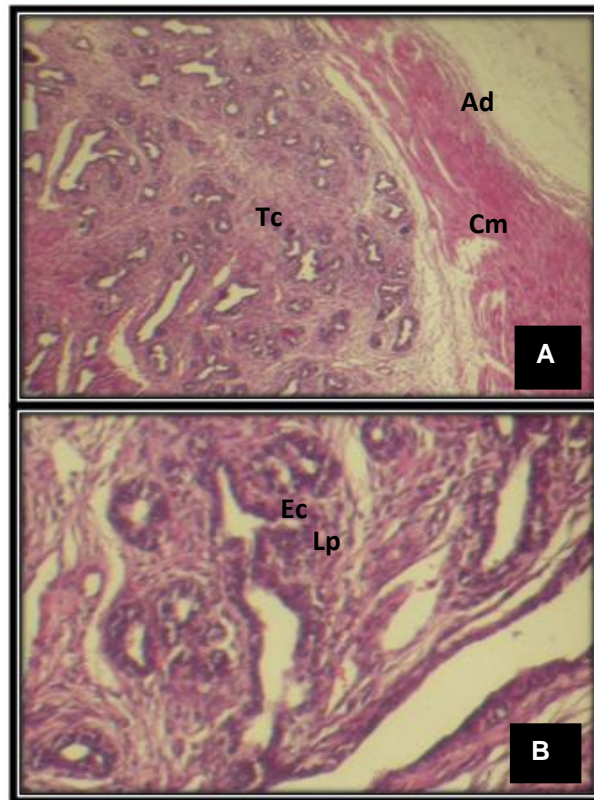
Es una glándula tubuloalveolar, en los grupos OP y OA con epitelio columnar simple en su parte glandular y los túbulos revestidos por un epitelio cuboidal. La lámina propia es escasa y formada por tejido conectivo laxo. La cápsula del órgano es tejido conectivo denso con abundantes fibras musculares. El tejido conectivo capsular se continúa con el de los septos. Eventualmente se observó la presencia de células mononucleares en el intersticio y entre las células del epitelio. En el grupo OPP al igual que en las anteriores glándulas, se observa poco desarrollo de la estructura, con epitelio cuboidal simple con abundante tejido conectivo y se observar las tunicas muscular y adventicia (figura 21 y 22).

**Figura 21. Corte Histológico de la glándula bulbouretral, animal adulto ovino**



**A.** Corte histológico de la glándula bulbouretral, animal adulto ovino (H-E, 100X). **B.** Corte histológico de la glándula bulbouretral, animal adulto ovino (H-E, 400X). **C.** Corte histológico de la glándula bulbouretral, animal adulto ovino (H-E, 40X). Epitelio columnar (**Ec**), Epitelio cuboidal (**Eb**), Lámina propia (**Lp**), Cápsula muscular (**Cm**), Luz de conductos (**lc**), Células mononucleares (**cm**).

**Figura 22. Corte histológico de la glándula bulbouretral, animal prepuberal ovino**

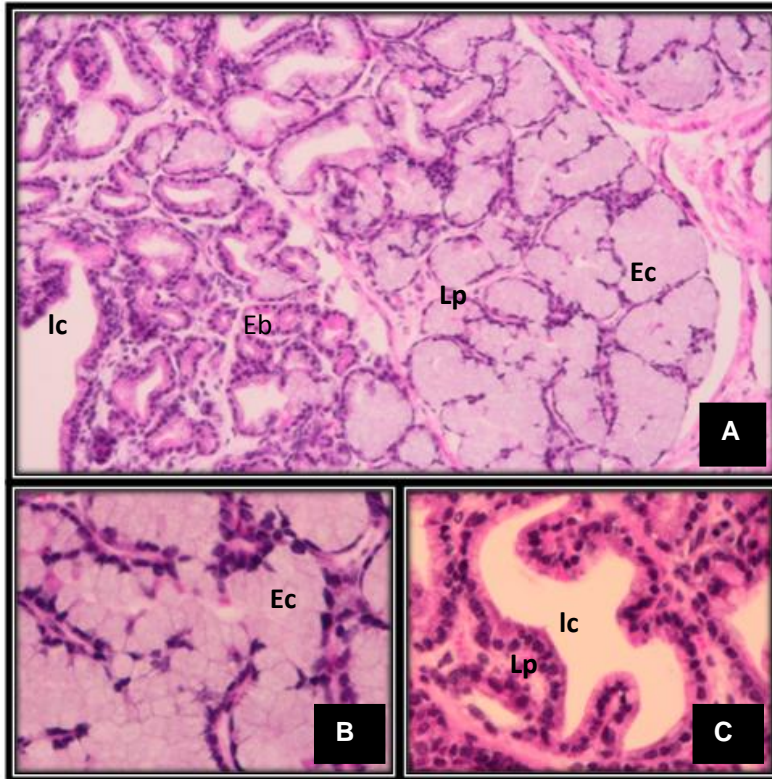


**A.** Corte histológico de la glándula bulbouretral, animal prepuberal ovino (H-E, 100X). **B.** Corte histológico de la glándula bulbouretral, animal prepuberal ovino (H-E, 400X). Epitelio columnar (**Ec**), Lámina propia (**Lp**), Cápsula muscular (**Cm**), Luz de los conductos (**lc**), Adventicia (**Ad**).

#### 11.4.9. Próstata diseminada

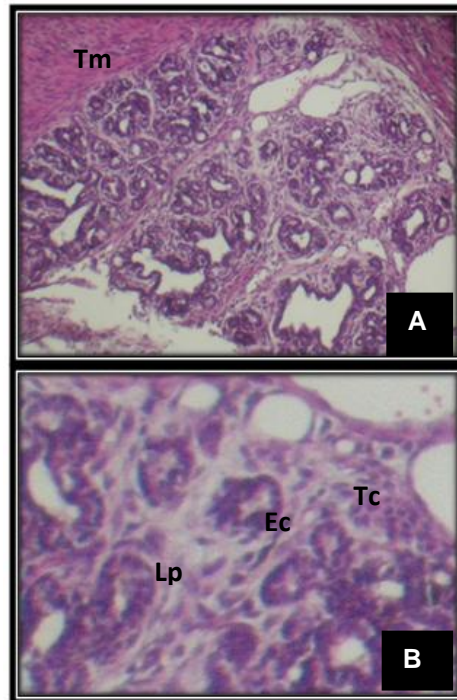
Histológicamente es una glándula serosa tubuloalveolar compuesta, en los grupos OP y OA la glándula presentó un epitelio cúbico simple, las células epiteliales presentaron vesículas apicales que indican la actividad secretoria de tipo apócrino, con gránulos acidófilos. Cerca de la luz de la uretra, el sistema de conductos está revestido por un epitelio columnar simple, los alvéolos están rodeados por tejido conectivo laxo de la lámina propia. En la próstata del grupo OPP se observó epitelio cuboidal, tejido conectivo laxo y fue evidente el poco desarrollo de las estructuras glandulares (figura 23 y 24).

**Figura 23. Corte histológico de la próstata diseminada, animal adulto ovino**



**A.** Corte histológico de la próstata diseminada, animal adulto ovino (H-E, 100X). **B.** Corte histológico de la próstata diseminada, animal adulto ovino (H-E, 400X). **C.** Corte histológico de la próstata diseminada, animal adulto ovino (H-E, 400X). Epitelio columnar (**Ec**), Epitelio cuboidal (**Eb**), Lámina propia (**Lp**), Cápsula muscular (**Cm**), Luz de conductos (**lc**), Células mononucleares (**cm**).

**Figura 24. Corte histológico de la próstata diseminada, animal prepuberal ovino**



**A.** Corte histológico de la próstata diseminada, animal prepuberal ovino (H-E, 100X). **B.** Corte histológico de la próstata diseminada, animal prepuberal ovino (H-E, 400X). Epitelio columnar (**Ec**), Lámina propia (**Lp**), Túnica muscular (**Tm**), Tejido conectivo (**Tc**).

#### 11.5. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS+ PRESENTES EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS

En el cuadro 7 y en la figura 25 se resumen los promedios obtenidos con su DS de macrófago en cada grupo y por órgano. En las ámpulas, próstata diseminada, uretra peneana, cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. En las vesículas seminales y glándulas bulbouretrales, los grupos OP y OA presentaron mayor cantidad de marcas positivas para macrófagos comparado con el grupo OPP ( $p < 0.05$ ) Las marcas fueron encontradas mayoritariamente en el tejido conectivo de estas glándulas. En la uretra pélvica se encontró mayor cantidad de marca para el grupo OP seguido del grupo OA y por último, en el grupo OPP todos fueron diferentes entre sí

( $p < 0.05$ ). En la uretra las marcas se localizaron sobre todo en el epitelio de transición. En el testículo, el grupo OPP presentó una mayor cantidad de marcas comparado con los grupos OP y OA ( $p < 0.05$ ), estas marcas se localizaron en el tejido conectivo. En las glándulas bulbouretrales, uretra pélvica y peneana, los cuerpos y las colas de los epidídimos del grupo OPP no se encontraron marcas positivas, en todos los epidídimos el conteo de estas células fue bajo. En el cuadro 8 se observan los órganos con mayor número de marcas en cada grupo. Para los OPP el testículo tuvo mayor cantidad de macrófagos comparado con los demás grupos, en los grupos OP y OA la uretra pélvica fue la estructura que mostró mayor cantidad de macrófagos.

**CUADRO 7. NÚMERO PROMEDIO DE MACRÓFAGOS+ POR mm<sup>2</sup> EN LOS DIFERENTES ÓRGANOS DEL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS DE DIFERENTE EDAD**

Órgano	Grupo	Número de MOS+/mm <sup>2</sup>
Vesícula	OPP	0.2 ± 0.3
	OP	4.7 ± 2.2 <sup>a</sup>
	OA	8.1 ± 7.9 <sup>a</sup>
Ámpula	OPP	0.2 ± 0.3
	OP	0.6 ± 1.1
	OA	1.0 ± 1.3
Próstata Diseminada	OPP	1.6 ± 0.6
	OP	2.8 ± 1.0
	OA	3.6 ± 3.0
Bulbouretral	OPP	0.0 ± 0.0
	OP	5.3 ± 2.4 <sup>a</sup>
	OA	3.5 ± 1.9 <sup>a</sup>
Uretra pélvica	OPP	0.0 ± 0.0
	OP	37.7 ± 18.6 <sup>b</sup>
	OA	12.9 ± 14.3 <sup>c</sup>
Uretra peneana	OP	1.1 ± 0.9
	OP	5.8 ± 6.1
	OA	4.6 ± 0.0
Testículo	OPP	8.5 ± 4.2 <sup>d</sup>
	OP	0.5 ± 0.5
	OA	0.5 ± 0.6
Epidídimo Cabeza	OPP	1.8 ± 3.1
	OP	2.8 ± 4.6
	OA	3.7 ± 4.5
Epidídimo Cuerpo	OPP	0.0 ± 0.0
	OP	2.8 ± 4.6
	OA	0.9 ± 2.3
Epidídimo Cola	OPP	0.0 ± 0.0
	OP	0.9 ± 2.3
	OA	3.6 ± 4.5

OPP Ovinos Prepuberales (menos de 6 meses), OP Ovinos Pueberales (entre 6 y 12 meses), OA Ovinos Adultos (más de 12 meses), (± DS)

<sup>a</sup> significancia comparado con el grupo OPP, p<0.05

<sup>b</sup> significancia comparado con el grupo OPP y OA, p<0.05

<sup>c</sup> significancia comparado con el grupo OPP, p<0.05

<sup>d</sup> significancia comparado con el grupo OP y OA, p<0.05



**CUADRO 8. NÚMERO PROMEDIO DE MACROFAGOS+ POR mm<sup>2</sup>, DIFERENCIAS ENTRE ÓRGANOS EN CADA GRUPO**

Grupo	Vs	Am	Pd	Bu	Upel	Upe	Tes	Eca	Ecu	Eco
OPP	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.3	1.6 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.9	8.5 ± 4.2 <sup>a</sup>	1.8 ± 3.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
OP	4.7 ± 2.2	0.6 ± 1.1	2.8 ± 1.0	5.3 ± 2.4	37.7 ± 18.6 <sup>b</sup>	5.8 ± 6.1	0.5 ± 0.5	2.8 ± 4.6	2.8 ± 4.6	0.9 ± 2.3
OA	8.1 ± 7.9 <sup>c</sup>	1.0 ± 1.3 <sup>c</sup>	3.6 ± 3.0 <sup>c</sup>	3.5 ± 1.9 <sup>c</sup>	12.9 ± 14.3 <sup>b</sup>	4.6 ± 5.4 <sup>c</sup>	0.5 ± 0.6 <sup>d</sup>	3.7 ± 4.5 <sup>c</sup>	0.9 ± 2.3 <sup>cd</sup>	3.6 ± 4.5 <sup>c</sup>

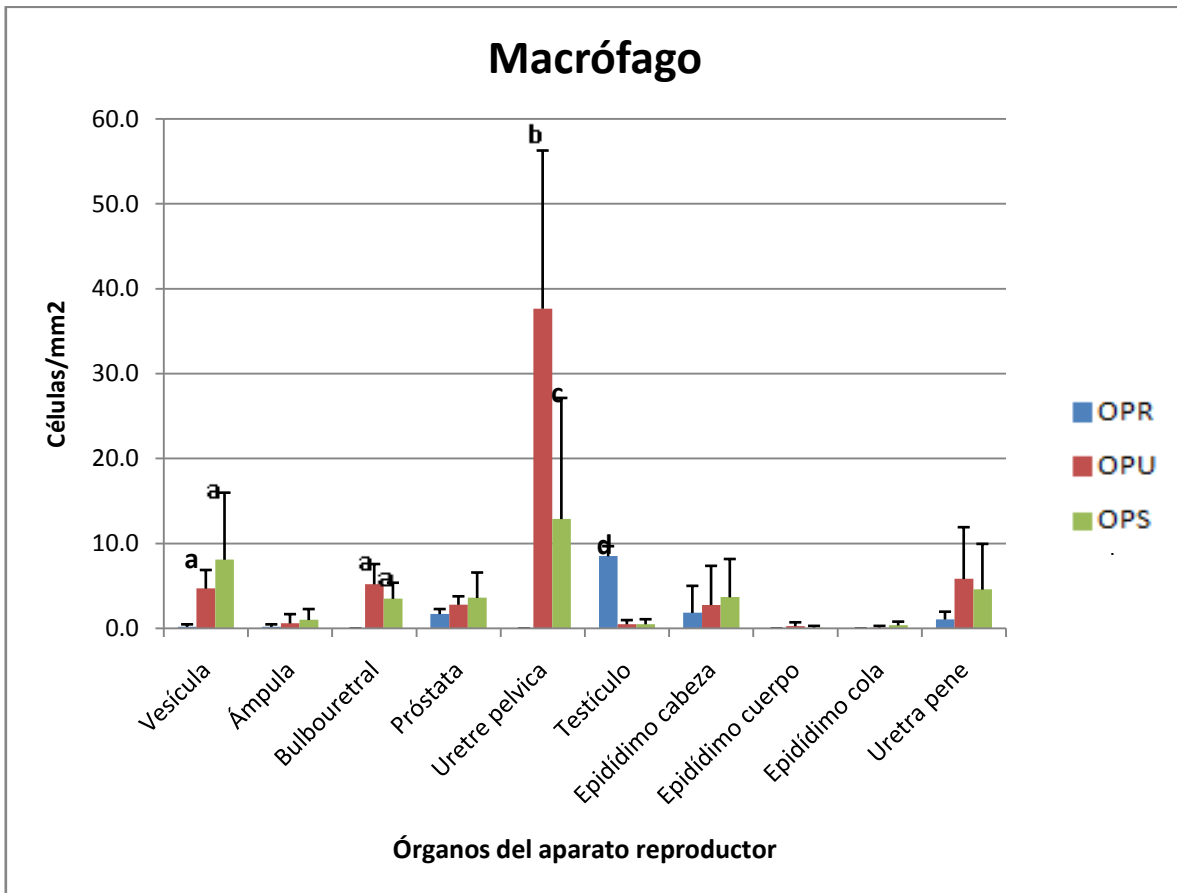
OPP Ovinos Prepuberales (menos de 6 meses), OP Ovinos Pueberales (entre 6 y 12 meses), OA Ovinos Adultos (más de 12 meses), (± DS), vesícula seminal (Vs), ámpula del conducto deferente (Am), próstata diseminada (Pd), glándula bulbouretral (Bu), uretra pélvica (Upel), uretra peneana (Upe), testículo (Tes), cabeza del epidídimo (Eca), cuerpo del epidídimo (Ecu) y cola del epidídimo (Eco).

<sup>a</sup> significancia comparado con los órganos Vs, Am, Pd, Bu, Upel, Upe, Eca, Ecu y Eco, p<0.05

<sup>b</sup> significancia comparado con los órganos Vs, Am, Pd, Bu, Upe, Tes, Eca, Ecu y Eco, p<0.05

<sup>c</sup> significancia comparado con los órganos Tes y Ecu, p<0.05

**Figura 25. Grafica del número promedio de macrófagos por mm<sup>2</sup> en los diferentes órganos del aparato reproductor de los tres grupos de ovinos evaluados**



OPP Ovinos Prepuberales (menos de 6 meses), OP Ovinos Pueberales (entre 6 y 12 meses), OA Ovinos Adultos (más de 12 meses), ( $\pm$  DS)

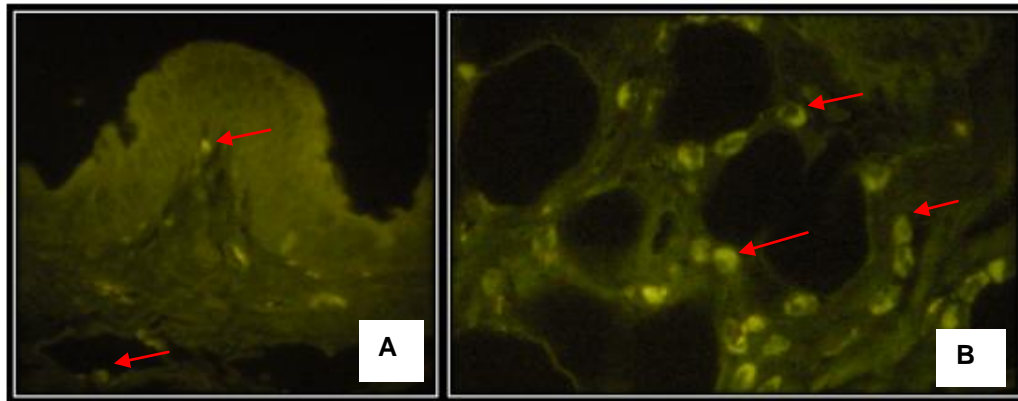
<sup>a</sup> significancia comparado con el grupo OPP,  $p < 0.05$

<sup>b</sup> significancia comparado con el grupo OPP y OA,  $p < 0.05$

<sup>c</sup> significancia comparado con el grupo OPP,  $p < 0.05$

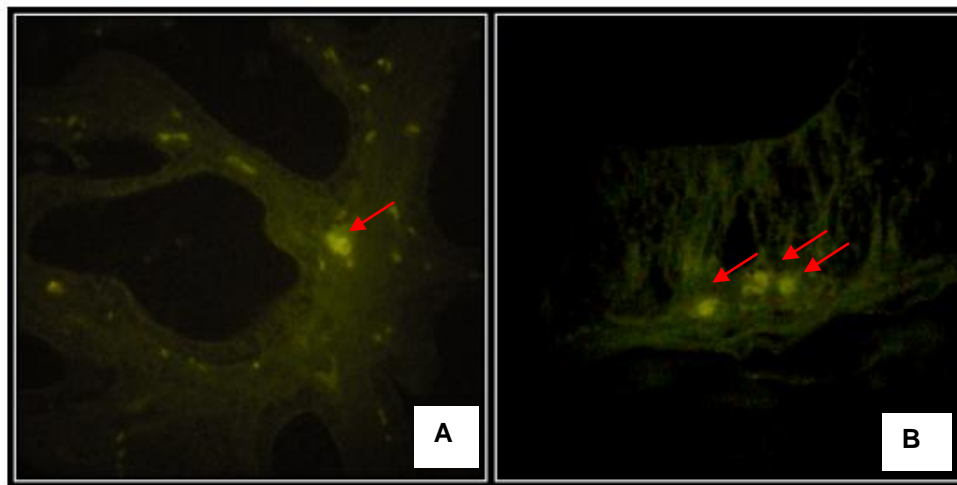
<sup>d</sup> significancia comparado con el grupo OP y OA,  $p < 0.05$

**Figura 26. Marcación de macrófagos positivos en la uretra pélvica de animales adultos ovinos**



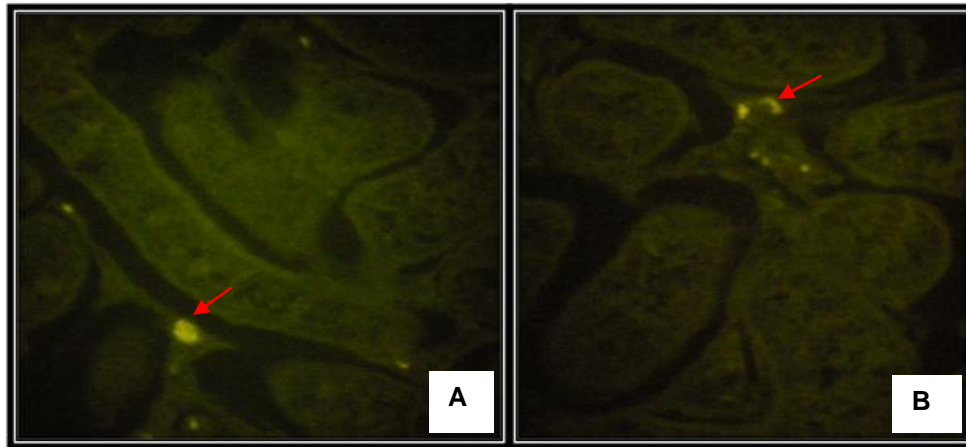
**A.** Corte histológico del epitelio de la uretra pélvica, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X). **B.** Corte histológico del tejido conectivo de la uretra pélvica, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X). Las flechas rojas señalan las marcas positivas para los macrófagos.

**Figura 27. Marcación de macrófagos positivos en la vesícula seminal y el epidídimo, animal adulto ovino**



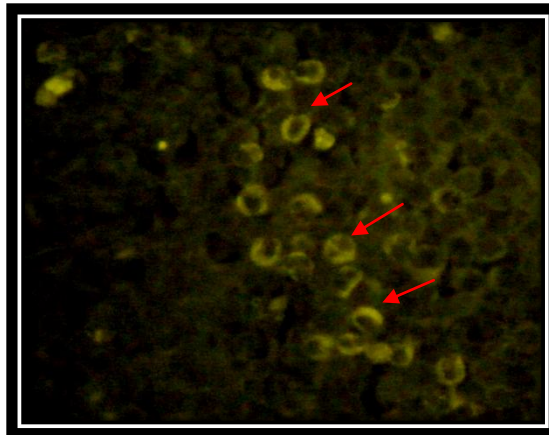
**A.** Corte histológico de la vesícula seminal, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X). **B.** Corte histológico de la cabeza del epidídimo, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X). Las flechas rojas muestran las marcas positivas para los macrófagos.

**Figura 28. Marcación de macrófagos positivos en el testículo de animales prepúberales**



**A.** Corte histológico del testículo, animal prepuberal ovino (Inmunofluorescencia, 400X). **B.** Corte histológico del testículo, animal prepuberal ovino (Inmunofluorescencia, 400X). Las flechas rojas muestran las marcas positivas para los macrófagos.

**Figura 29. Marcación de macrófagos positivos en el linfonodo, animal adulto ovino**



Corte histológico de linfonodo, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X). Las flechas rojas muestran las marcas positivas para los macrófagos.

## 11.6. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS LINFOCITOS CD4+ Y CD8+ PRESENTES EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS

En el cuadro 9 y en las figuras 30 y 31 se resumen los promedios obtenidos con su DS de linfocitos CD4+ y CD 8+ en los tres grupos de edad de los machos ovinos evaluados.

En las ámpulas, uretras peneana y pélvica, testículo y en los tres sectores del epidídimo no se encontraron diferencias significativas para CD4+ y CD8+ ( $p>0.05$ ) la mayor parte de las marcas se localizó en el tejido conectivo de los órganos. En las glándulas bulbouretrales hubo diferencia entre los grupos OP y OA contra el OPP debido a que este no mostró marcas positivas para ninguna de las células y en la próstata diseminada de los animales prepuberales hubo menor marca para ambas células comparado con los grupos OP y OA ( $p<0.05$ ).

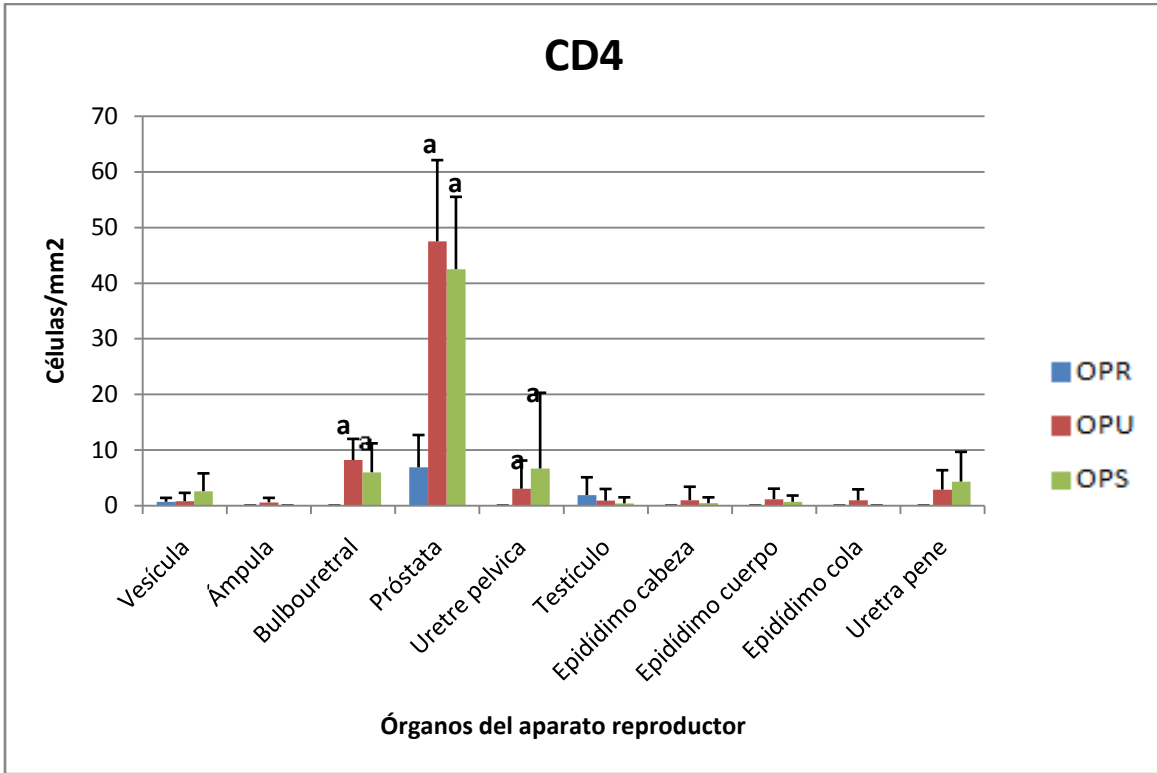
**CUADRO 9. NÚMERO PROMEDIO DE LINFOCITOS CD4+ y CD8+ / mm<sup>2</sup> EN LOS DIFERENTES ÓRGANOS DEL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS DE DIFERENTE EDAD**

Órgano	Grupo	Linfocitos CD4+/mm <sup>2</sup>	Linfocitos CD8+/mm <sup>2</sup>
Vesícula	OPP	0.7 ± 0.7	0.0 ± 0.0
	OP	0.8 ± 1.5	0.3 ± 1.3
	OA	2.6 ± 3.2	0.6 ± 0.9
Ámpula	OPP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	0.6 ± 0.8	0.3 ± 0.3
	OA	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.5
Próstata Diseminada	OPP	6.9 ± 5.8	4.1 ± 4.4
	OP	47.5 ± 14.6 <sup>a</sup>	32.8 ± 19.8 <sup>a</sup>
	OA	42.5 ± 13.0 <sup>a</sup>	29.9 ± 15.1 <sup>a</sup>
Bulbouretral	OPP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	8.2 ± 3.8 <sup>a</sup>	6.8 ± 7.0 <sup>a</sup>
	OA	6.0 ± 5.2 <sup>a</sup>	5.5 ± 2.1 <sup>a</sup>
Uretra pélvica	OPP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	3.1 ± 5.1 <sup>a</sup>	7.9 ± 9.8 <sup>a</sup>
	OA	6.7 ± 13.6 <sup>a</sup>	2.6 ± 6.3 <sup>a</sup>
Uretra peneana	OP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Testículo	OPP	1.9 ± 3.2	0.0 ± 0.0
	OP	1.0 ± 2.1	1.0 ± 2.4
	OA	0.4 ± 1.1	1.0 ± 2.3
Epidídimo Cabeza	OPP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	1.0 ± 2.4	1.0 ± 2.3
	OA	0.4 ± 1.0	0.3 ± 0.6
Epidídimo Cuerpo	OPP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	1.2 ± 1.8	1.4 ± 2.2
	OA	0.7 ± 1.1	0.1 ± 0.3
Epidídimo Cola	OPP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	0.9 ± 1.9	0.9 ± 2.1
	OA	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.4

OPP Ovinos Prepuberales (menos de 6 meses), OP Ovinos Pueberales (entre 6 y 12 meses), OA Ovinos Adultos (más de 12 meses), (± DS)

<sup>a</sup> significancia comparado con el grupo OPP, p<0.05

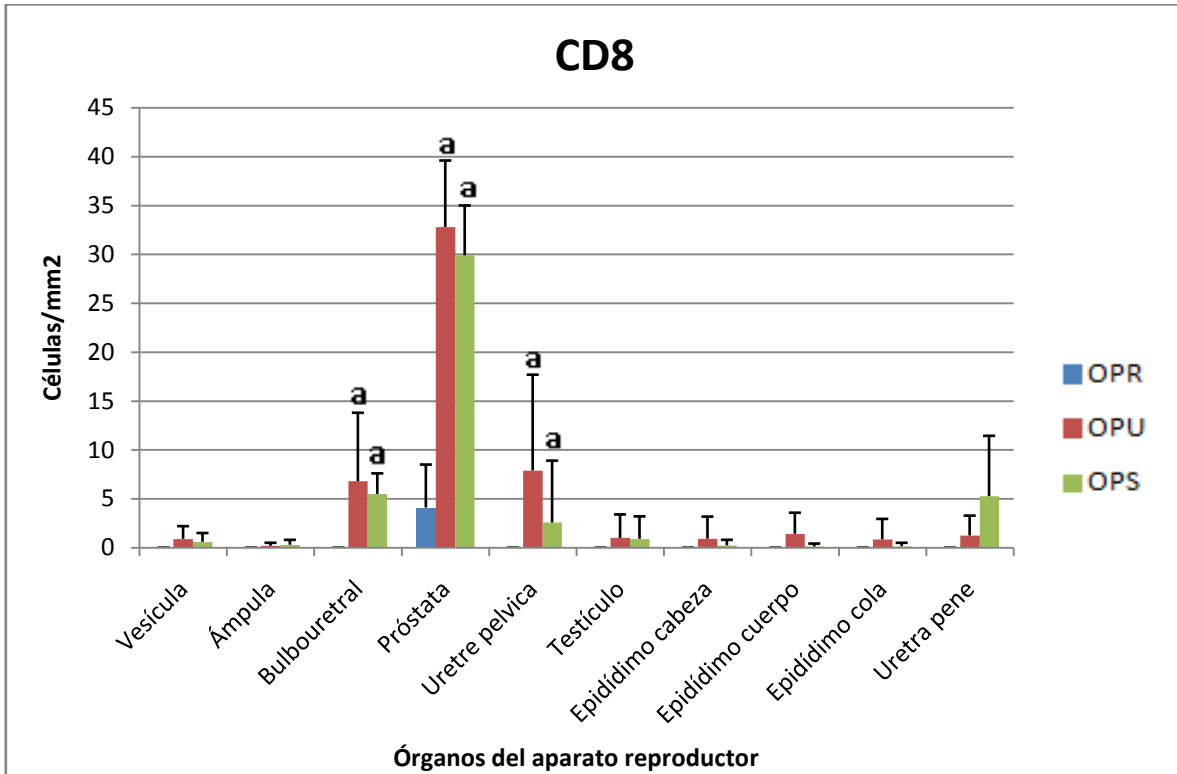
**Figura 30. Gráfica del número promedio de linfocitos CD4+ por mm2 en los diferentes órganos del aparato reproductor de los tres grupos de ovinos evaluados**



OPP Ovinos Prepuberales (menos de 6 meses), OP Ovinos Pueberales (entre 6 y 12 meses), OA Ovinos Adultos (más de 12 meses), (± DS)

<sup>a</sup> significancia comparado con el grupo OPP, p<0.05

**Figura 31. Gráfica del número promedio de linfocitos CD8+ por mm2 en los diferentes órganos del aparato reproductor de los tres grupos de ovinos evaluados**

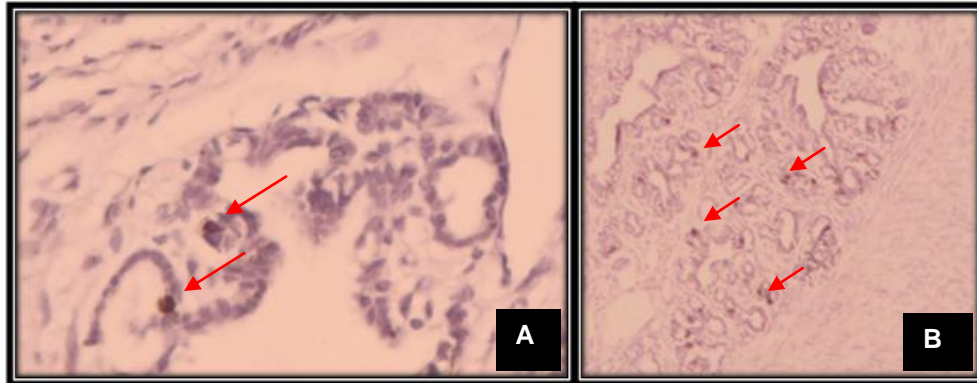


OPP Ovinos Prepuberales (menos de 6 meses), OP Ovinos Pueberales (entre 6 y 12 meses), OA Ovinos Adultos (más de 12 meses), ( $\pm$  DS)

<sup>a</sup> significancia comparado con el grupo OPP,  $p < 0.05$

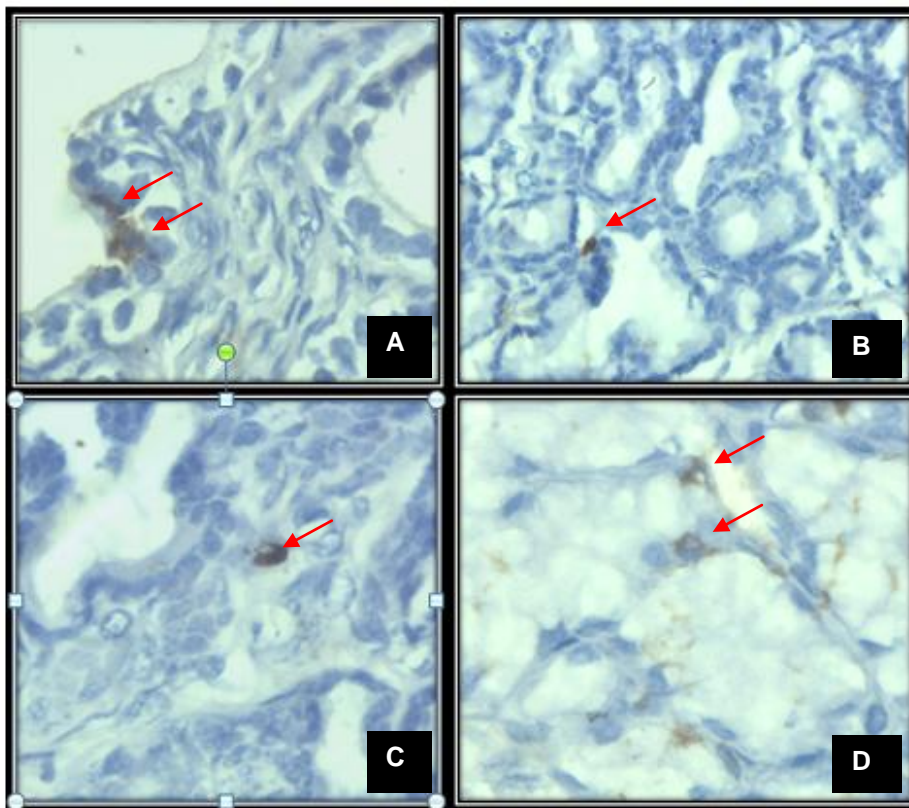


**Figura 32. Marcación de linfocitos CD4+ en la próstata diseminada**



**A.** Corte histológico de próstata diseminada, animal prepuberal ovino (Inmunohistoquímica, 400X).  
**B.** Corte histológico de próstata diseminada, animal prepuberal ovino (Inmunohistoquímica, 400X). Las flechas rojas muestran las marcas positivas para los linfocitos CD4+

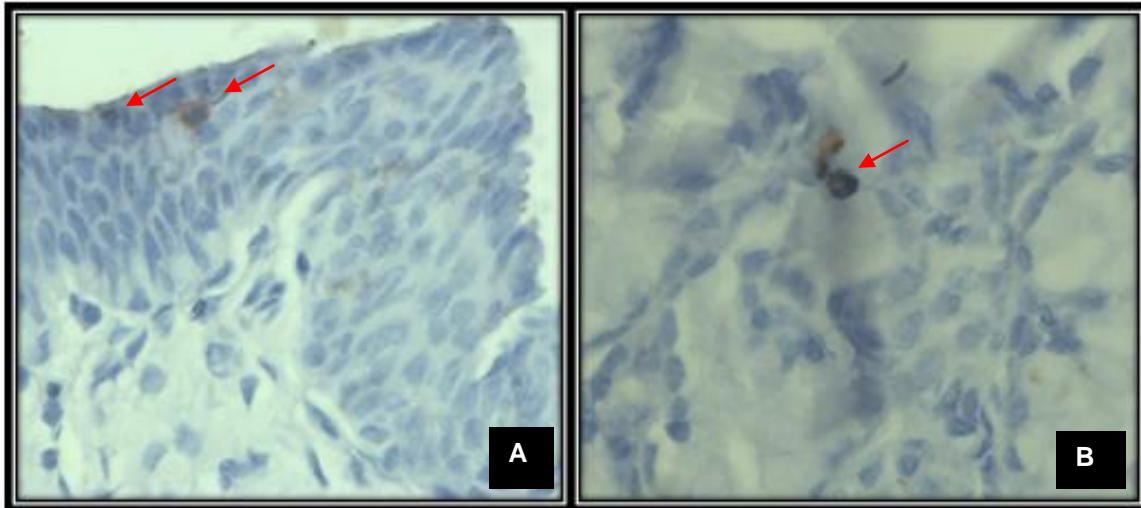
**Figura 33. Marcación de linfocitos CD4+ en las glándulas anexas**



**A.** Corte histológico del ámpula del conducto deferente, animal adulto ovino (Inmunohistoquímica, 400X). **B.** Corte histológico de la próstata diseminada, animal adulto ovino (Inmunohistoquímica, 400X). **C.** Corte histológico de los conductos de la glándula bulbouretral, animal adulto ovino

(Inmunohistoquímica, 400X). **D.** Corte histológico del epitelio de la glándula bulbouretral, animal adulto ovino (Inmunohistoquímica, 400X). Las flechas rojas muestran las marcas positivas para los linfocitos CD4+.

**Figura 34. Marcación de linfocitos CD8+**



**A.** Corte histológico del epitelio de la uretra pélvica, animal adulto ovino (Inmunohistoquímica, 400X). **B.** Corte histológico de la próstata diseminada, animal adulto ovino (Inmunohistoquímica, 400X). Las flechas rojas muestran las marcas positivas para los linfocitos CD8+.

### 11.7. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS CONTENEDORAS DE IgG+, IgA+ E IgM+ PRESENTES EN EL APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS OVINOS

En el cuadro 10 y en las figuras 35, 36 y 37 se resumen en forma general los promedios obtenidos con su DS en todos los grupos de las células contenedoras de IgA+, IgG+ e IgM+.

Los conteos fueron bajos en general en todos los órganos para estas células, no hubo diferencias significativas entre grupos para ninguna de las tres marcas, solo para IgA+ en el testículo del grupo OPP donde hubo marca para las inmunoglobulinas IgA+ e IgG+. Las tres regiones del epidídimo resultaron negativas a los tres tipos de células contenedores de Igs. La uretra y las glándulas mostraron de los grupos OP y OA mostraron células contenedoras de IgA+. Las

marcas para la uretra se localizaron mayoritariamente en el epitelio, mientras que en el resto de los órganos su localización fue en el tejido conectivo.

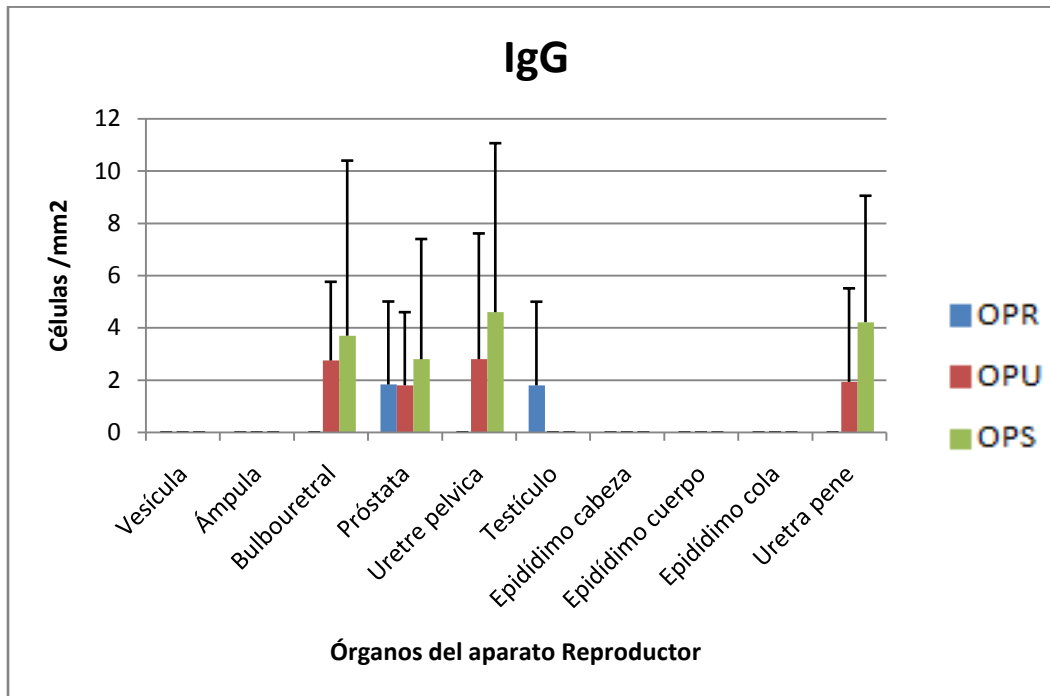
**CUADRO 10. NÚMERO PROMEDIO CÉLULAS CONTENEDORAS DE IgA+, IgG+ e IgM+ POSITIVAS EN LOS DIFERENTES ÓRGANOS DE LOS APARATOS REPRODUCTORES POR mm<sup>2</sup>**

Órgano	Grupo	Células contenedoras de IgA+/mm <sup>2</sup>	Células contenedoras de IgG+/mm <sup>2</sup>	Células contenedoras de IgM+/mm <sup>2</sup>
Vesícula	OPP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	2.8 ± 4.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OA	0.9 ± 2.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Ámpula	OPP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	1.8 ± 2.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OA	1.9 ± 4.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Próstata Diseminada	OPP	3.7 ± 3.2	1.8 ± 3.2	0.0 ± 0.0
	OP	2.8 ± 4.6	1.8 ± 2.8	0.0 ± 0.0
	OA	3.7 ± 6.7	2.8 ± 4.6	0.0 ± 0.0
Bulbouretral	OPP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	5.7 ± 7.0	2.8 ± 3.0	3.7 ± 4.5
	OA	4.6 ± 4.2	3.7 ± 6.7	2.8 ± 4.6
Uretra pélvica	OPP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	4.6 ± 7.4	2.8 ± 4.8	8.3 ± 7.6
	OA	6.4 ± 11.2	3.6 ± 6.5	4.5 ± 5.5
Uretra peneana	OP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	7.7 ± 8.7	1.9 ± 3.6	2.4 ± 2.7
	OA	7.7 ± 9.3	4.2 ± 4.8	4.3 ± 3.6
Testículo	OPP	3.7 ± 3.2	1.8 ± 3.2 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0
	OP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Epidídimo Cabeza	OPP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Epidídimo Cuerpo	OPP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Epidídimo Cola	OPP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OP	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	OA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

OPP Ovinos Prepuberales (menos de 6 meses), OP Ovinos Pueberales (entre 6 y 12 meses), OA Ovinos Adultos (más de 12 meses), (± DS)

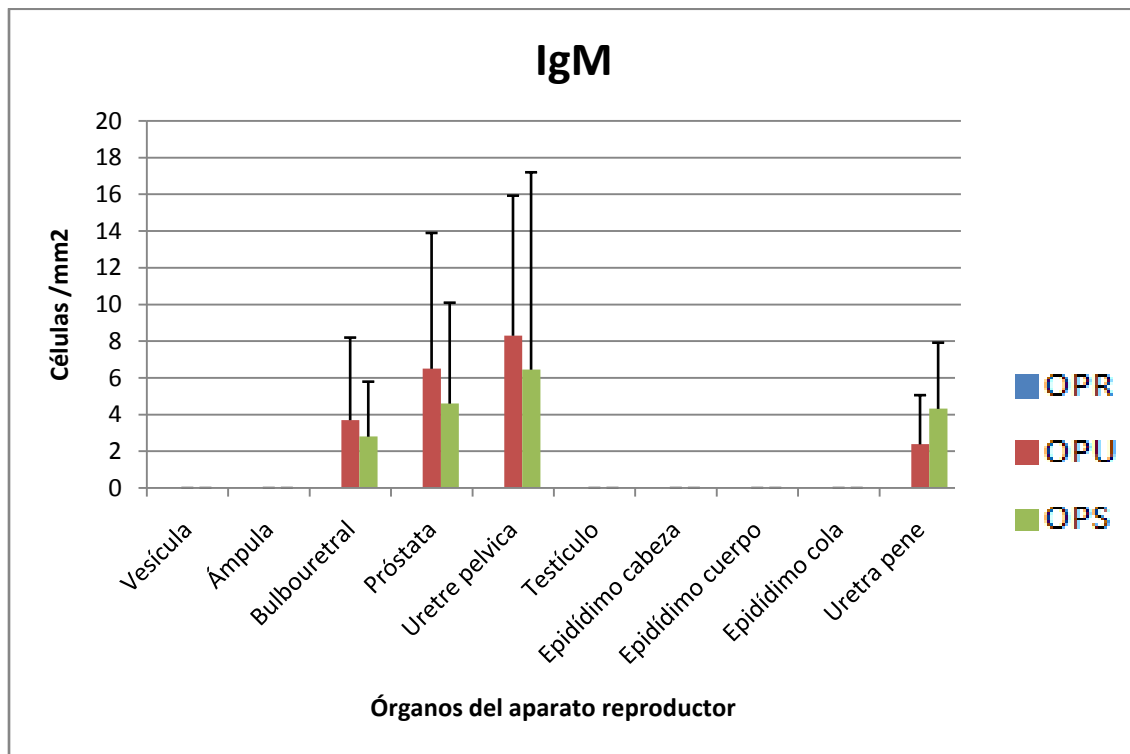
<sup>a</sup> significancia comparado con el grupo OP y OA, p<0.05

**Figura 35. Gráfica del número promedio de células contenedoras de IgG+ por mm2 en los diferentes órganos del aparato reproductor**



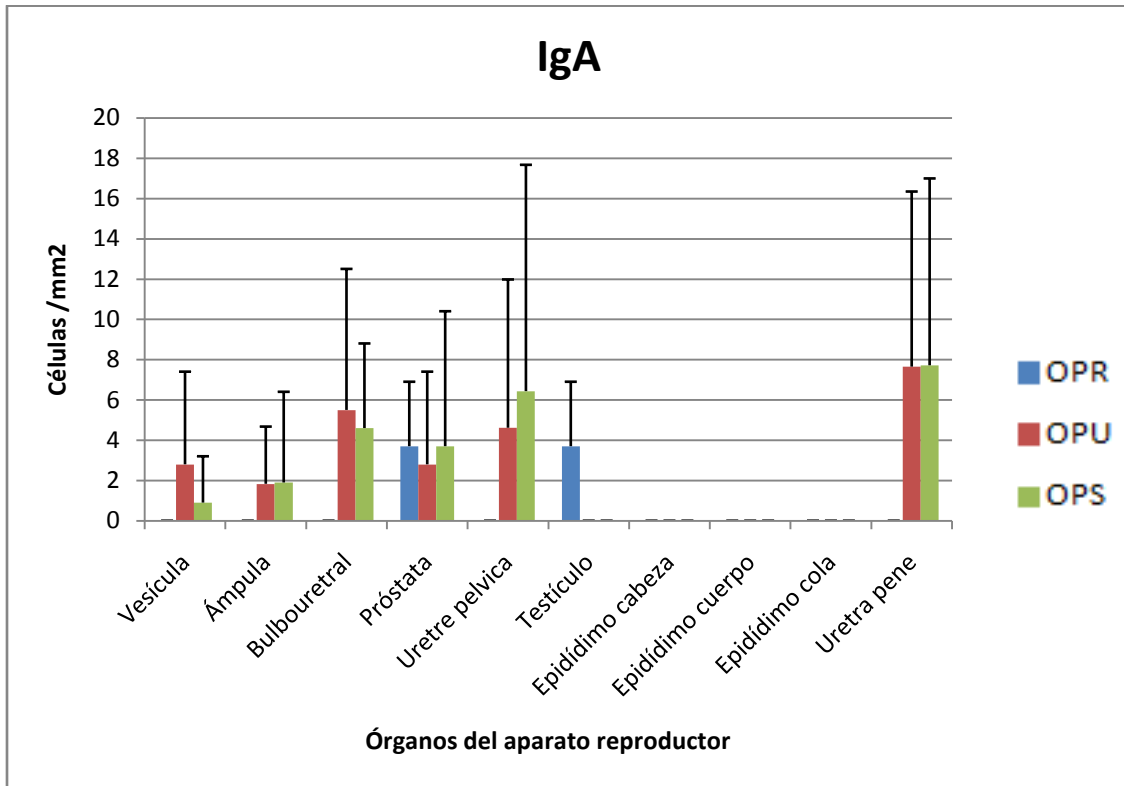
OPP Ovinos Prepuberales (menos de 6 meses), OP Ovinos Pueberales (entre 6 y 12 meses), OA Ovinos Adultos (más de 12 meses)

**Figura 36. Gráfica del número promedio de células contenedoras de IgM+ por mm2 en los diferentes órganos del aparato reproductor**



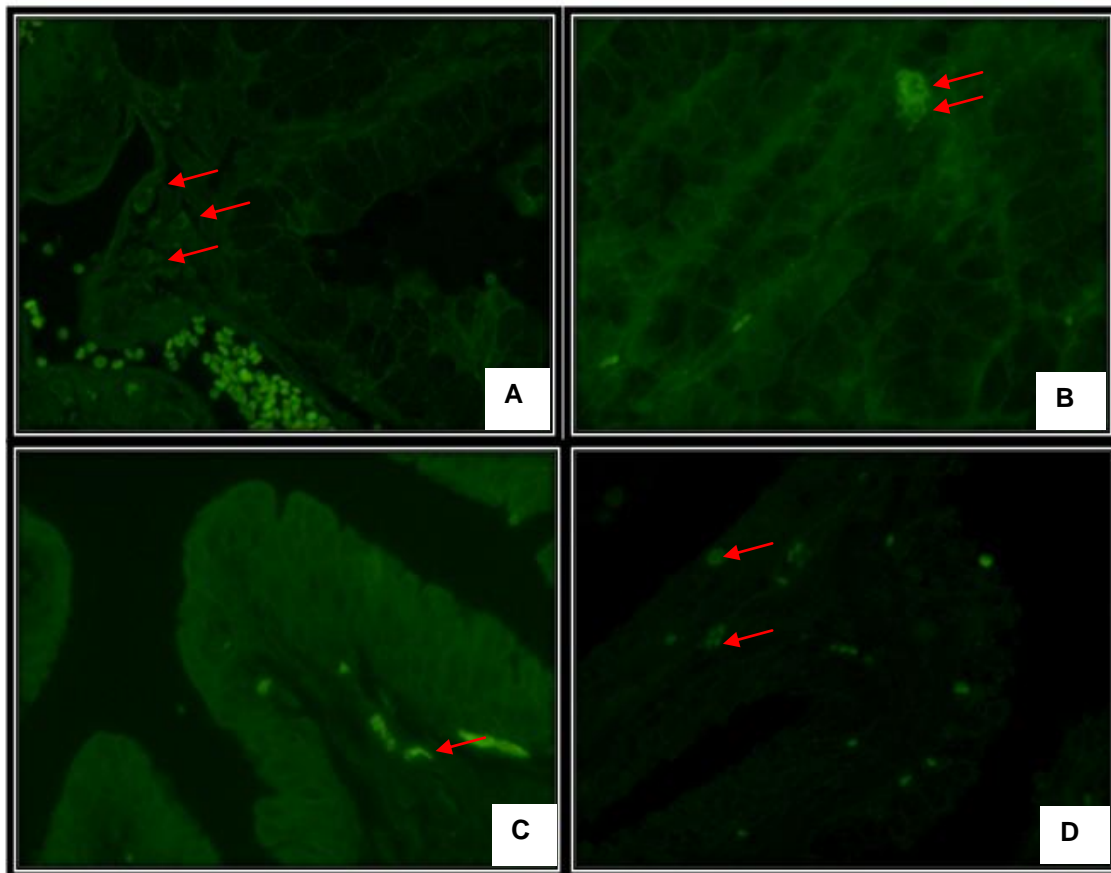
OPP Ovinos Prepuberales (menos de 6 meses), OP Ovinos Pueberales (entre 6 y 12 meses), OA Ovinos Adultos (más de 12 meses)

**Figura 37. Gráfica del número promedio de células contenedoras de IgM+ por mm2 en los diferentes órganos del aparato reproductor**



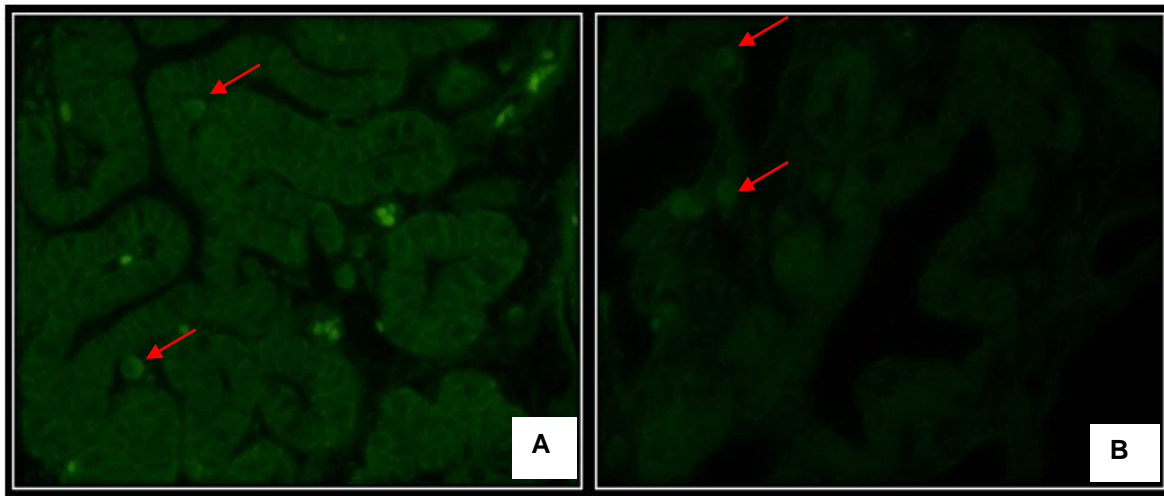
OPP Ovinos Prepuberales (menos de 6 meses), OP Ovinos Pueberales (entre 6 y 12 meses), OA Ovinos Adultos (más de 12 meses)

**Figura 38. Marcación de células contenedoras de IgG+ en diferentes órganos**



**A.** Corte histológico de la próstata disemina, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X). **B.** Corte histológico de la glándula bulbouretral, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X). **C.** Corte histológico de la uretra peneana, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X). **D.** Corte histológico de la vesícula seminal, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X). Las flechas rojas señalan las marcas positivas para las células contenedoras de IgG+.

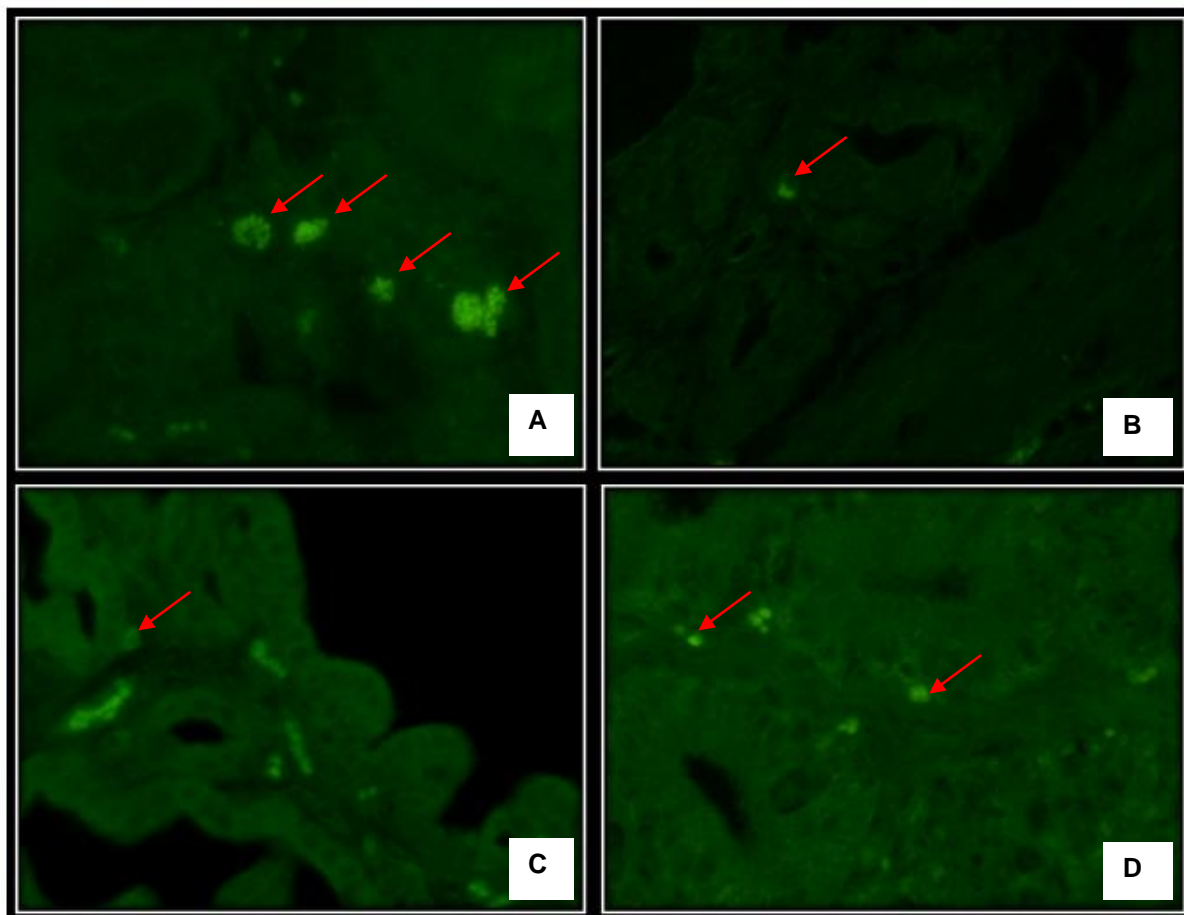
**Figura 39. Marcación de células contenedoras de IgM+ en diferentes órganos**



**A.** Corte histológico de la próstata disemina, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X). **B.** Corte histológico de la próstata diseminada, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X). Las flechas rojas señalan las marcas positivas para las células contenedoras de IgM+.

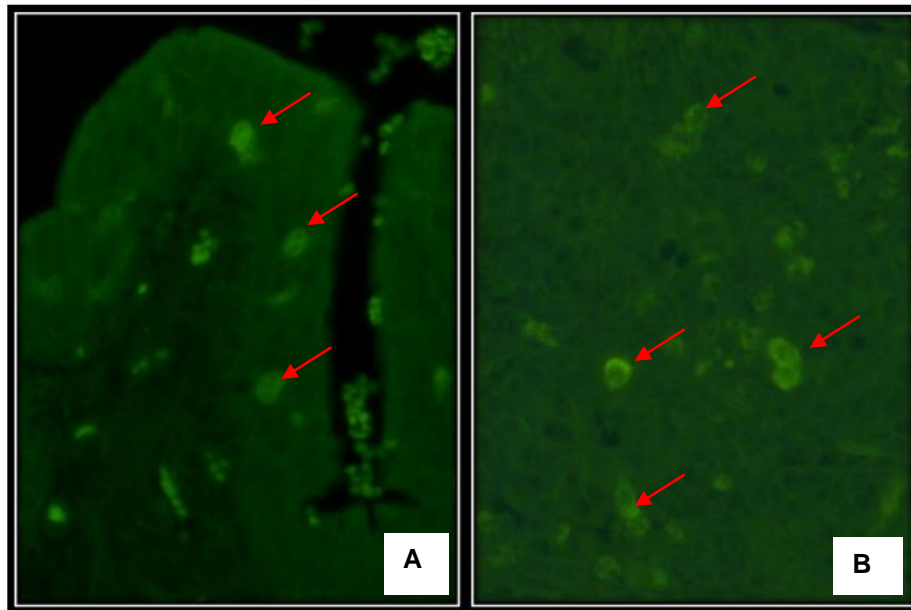


**Figura 40. Marcación de células contenedoras de IgA+ en diferentes órganos**



**A.** Corte histológico de la glándula bulbouretral, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X).  
**B.** Corte histológico de la próstata diseminada, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X).  
**C.** Corte histológico de la próstata diseminada, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X).  
**D.** Corte histológico de la vesícula seminal, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X). Las flechas rojas señalan las marcas positivas para las células contenedoras de IgA+.

**Figura 41. Marcación de células contenedoras de IgA+ en uretra pélvica**



**A.** Corte histológico de la uretra pélvica, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X). **B.** Corte histológico de la uretra pélvica, animal adulto ovino (Inmunofluorescencia, 400X). Las flechas rojas señalan las marcas positivas para las células contenedoras de IgA+.

## 12. DISCUSIÓN

Los resultados morfométricos obtenidos para las medidas de las glándulas anexas (bulbouretral, ámpula y vesícula seminal) de los grupos OP y OA fueron similares a los reportados por la Consejería de agricultura y Pesca, Sevilla, España 1991 y por Getty *et al*, 1982. No hay datos en la literatura acerca de las medidas y peso de la uretra pélvica y tampoco sobre los pesos de las glándulas anexas de ovinos. Las muestras del grupo OPP fueron pocas para hacer un análisis comparativo.

Los valores comparativos en estos casos de valores morfométricos, deben manejarse con precaución considerando que pueden ser influidos por la raza y la condición corporal de cada individuo, como ocurre en todas la especies.

El hallazgo de células inflamatorias en los frotis de esmegma y el papel de leucocitospermia en la patogénesis de la infertilidad masculina sigue siendo controversial a pesar de su alta incidencia relativa, 10% a 20%, entre los hombres infértiles. Algunos trabajos han correlacionado la leucocitospermia con espermatozoides de pobre calidad y defectos en la función, mientras que otros trabajos no han encontrado tal correlación. Trabajos recientes mencionan que el efecto negativo de la leucocitospermia radica en la sobre producción de especies reactivas de oxígeno por parte de los neutrófilos, lo cual produce un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes y genera fragmentación y daño al DNA de los espermatozoides (Aziz, *et al.*, 2004).

Un trabajo realizado en cabras, reportó leucocitospermia con alta incidencia de anomalías espermáticas secundarias como consecuencia de someter a los animales a reagrupamiento social que provocó estrés con aumento de cortisol y testosterona (Ortiz de Montellano, 2004), en este estudio realizado se encontró que el 85% de los animales tuvo presencia de estas células en los frotis, los autores argumentan que es probable que el transporte y la permanencia en los corrales del matadero, con mezcla de animales de diferentes origen, haya generado una situación de estrés que generó la leucocitospermia, considerando que no se observaron patologías en los órganos evaluados y los animales eran seronegativos a los principales patologías reproductivas del carnero.

No se encontró literatura que describa específicamente a los órganos del aparato reproductor del carnero, la mayoría de la bibliografía describe de forma general a los órganos masculinos, marcando algunas diferencias entre las especies domésticas, en general para los grupos OP y OA muestreados se encontraron las diferencias descritas por dicha literatura. Para el grupo OPP es poca la literatura que describe la histología de los órganos del aparato reproductor en esta etapa del desarrollo; en un trabajo en machos cabríos de 4-5 meses, se reportan hasta ocho regiones diferentes en el epidídimo, basándose en la distribución del tipo de células, posición del núcleo de las células principales,

diámetro tubular y la altura del epitelio, también en el mismo trabajo se encontraron linfocitos en el tejido conectivo de algunas regiones (IV, V y VII); el epitelio que encontrado en el epidídimo para todas las regiones fue pseudoestratificado con cilios (Bilaspuri, 1992), en el grupo OPP muestreados se observó en la región de la cabeza del epidídimo un epitelio pseudoestratificado, para el cuerpo y cola se observó un epitelio columnar simple con cilios, en este estudio se describieron las tres regiones clásicas y sólo se tomó una muestra por cada región.

Un trabajo en toros y otro en ovinos prepuberales, describe la misma morfología que se observó en este estudio para los túbulos seminíferos de los testículos, luz pequeña, una delgada lámina basal, gonocitos en el centro y alrededor de ellos asentadas en la lámina basal, las células sustentaculares (Aponte *et al.*, 2005; Steger, 1996); aunque es escasa la literatura sobre la descripción de las glándulas anexas prepuberales.

Respecto a la presencia y distribución de los tipos celulares relacionados con la inflamación y la respuesta inmune en el aparato reproductor es escasa la información previa, especialmente en glándulas anexas.

Se encontraron diferencias en el número de macrófagos presentes en la uretra pelviana, bulbouretral y vesícula seminal de los grupos OP y OA comparado con los bajos conteos o su ausencia en las mismas glándulas del grupo OPP, los conteos fueron altos especialmente en uretra pelviana.

Acosta *et al.*, en 2007, obtiene en animales controles para macrófagos en el ámpula  $33.3 \pm 19.5$ , vesícula  $41.6 \pm 13.2$ , próstata diseminada  $42.6 \pm 36.1$  y bulbouretral  $2.8 \pm 3.2$  por  $\text{mm}^2$ , comparados con este estudio fueron altos para ámpula, vesícula y próstata.

En humanos se reporta que los macrófagos son abundantes en el epitelio de la uretra pelviana y peneana mientras, son pocos los que se localizan en la lámina propia y se propone que estos participan fuertemente en la inducción y ejecución (efector) de la respuesta inmune local. También se han demostrado macrófagos en el epitelio como en la lámina propia de las vesículas seminales,

mientras que en bulbouretrales solo se han observado en pequeño número, principalmente en la lámina propia (Pudney *et al.*, 2010; Migliari *et al.*, 1992). En este trabajo la mayoría de los macrófagos se localizaron en la lámina propia de la uretra y en menor número en el intersticio de vesículas y bulbouretrales. Los conteos también fueron altos ( $p < 0.05$ ) para los testículos del grupo OPP, comparado con los otros dos grupos, se reporta que los macrófagos son abundantes en el intersticio testicular de muchas especies de mamíferos (Diemer *et al.*, 2003) incluyendo al humano (Hedger, 2002), y se ha sugerido que el macrófago es necesario para la estimulación y proliferación de células intersticiales inmaduras (Nes *et al.*, 2000), también han sido observados monocitos en los límites de los túbulos seminíferos en ratones (Khan *et al.*, 1992). En el resto de los órganos no se presentaron diferencias significativas entre grupos, aunque si se encontraron marcas positivas para todos los órganos analizados. En el estudio realizado por Acosta, 2006, no se encontraron diferencias notorias en la distribución de macrófagos en las glándulas anexas de animales clínicamente sanos y libres de *B. ovis*. La mayor cantidad de macrófagos en uretra pelviana sugiere, como se ha señalado en humanos, igual actividad de reconocimiento y procesamiento antigénico, que mecanismos efectores de remoción antigénica.

Acosta *et al.*, 2007, no encuentra diferencias notorias en la distribución de CD4+, CD8+ y linfocitos  $\delta\gamma$  WC1+ en próstata diseminada, glándula bulbouretral, vesícula seminal y ampulla del deferente de carneros controles (serológicamente libres de *B. ovis* y clínicamente sanos) comparado con animales infectados con *A. seminis*, en los testículos y epidídimos de los animales controles resultaron escasas las marcas. En los contos de Acosta *et al.*, 2007, en animales controles tanto de CD8+ como de CD4+ son altos para ampulla  $16.7 \pm 4.5$ ,  $33.3 \pm 15.7$  y vesícula  $11.1 \pm 22.3$ ,  $38.9 \pm 31.1$  en comparación con este estudio y en la bulbouretral  $9.7 \pm 11.5$ ,  $11.1 \pm 18.7$  y próstata son parecidos  $52.7 \pm 28.2$ ,  $41.5 \pm 34.7$  a este trabajo. En epidídimos y testículos los conteos son bajos para ambos estudios.

En el epidídimo de ratas se señalan variaciones en el número de linfocitos CD4+ y CD8+, dependiendo de la edad, del segmento del epidídimo considerado y de la presencia o no de espermatozoides en el interior del túbulo epididimal. Los linfocitos CD8 predominan en la cabeza y disminuyen hacia regiones más distales del epidídimo como cuerpo y cola; aumentando con la edad y con la presencia de espermatozoides en la cola (Serre y Robaire, 1999). En humanos se han encontrado abundantes linfocitos CD4+ en la lámina propia de la uretra (Pudney y Anderson 2010). En este estudio se encontraron marcas positivas tanto de CD4+ como para CD8+ en todos los órganos de los grupos OP y OA. Solo en próstata diseminada, glándulas bulbouretrales y uretra pélvica, hubo diferencias significativas entre grupos, presentando una mayor cantidad de marcas para CD4+ y CD8+, las diferencias estadísticas no se aprecian en los gráficos debido a que la prueba de Kruskal Wallis trabaja con las medianas.

No se encuentran linfocitos B y células plásmáticas en los diferentes sectores del epidídimo y testículo de ratas normales (Flickinger *et al.*, 1997; Pöllänen y Maddocks, 1988) ni tampoco se encuentran en el epidídimo y testículo de humanos (Anderson y Pudney, 1999) ni en el de carneros (Pöllänen y Maddocks, 1988), tal como se determinó en este estudio.

La relación entre la presencia de las células plasmáticas en las glándulas anexas del aparato reproductor y la edad, está escasamente estudiada. Campero y col, 1989, no encuentran diferencias en la presencia de células IgA+ entre toros sanos de diferentes edades: jóvenes (1.5 a 3 años), adultos (4 a 7 años) y viejos mayores de 7 años. Para las células IgM+ los animales mayores de 7 años presentaron menores conteos que los jóvenes, y estos a su vez más bajos que los adultos (4 a 7 años). En el caso de IgG+ no se encontraron diferencias entre jóvenes y adultos, pero si con los viejos, que presentaron una media más alta. Estos hechos plantean la posibilidad de la presencia diferencial de células contenedoras de inmunoglobulinas en animales de distintas edades.

En trabajos realizados en toros se plantea como sobresaliente la producción de IgA+ e IgG+ por las vesículas seminales (Bier *et al.*, 1977). Sin embargo, en

otros estudios no se encuentran células contenedoras de inmunoglobulinas o se encuentran en muy escaso número en las vesículas seminales en toros normales, por lo cual resulta poco probable que este sea el origen de las inmunoglobulinas (Campero *et al.*, 1989, 1990).

Foster *et al.*, 1988<sup>a</sup>, utilizan 5 carneros de 1 año y 12 mayores de 4 años y se encuentran células contenedoras de IgA+ e IgG+, preferentemente en la glándula bulbouretral, próstata y en la uretra pélvica y sólo ocasionalmente las observan en epidídimo, vesículas seminales y ámpula. Estos autores encuentran células contenedoras IgG+ en altos porcentajes.

En el caso de humanos se encuentran células IgA+ e IgM+ principalmente en la próstata, glándula bulbouretral y uretra pélvica y peneana, donde también encuentran escasas IgG+. Sin embargo, poco es lo que se sabe sobre la inmunología de las vesículas seminales, donde se encuentran células plasmáticas, pero sí ocasionales expresiones de plgR (Receptor polimérico de inmunoglobulinas) Anderson y Pudney, 2010.

Acosta *et al.*, 2007, encuentra diferencias notorias en el número de células contenedoras de IgA+ e IgM+, presentes en la próstata diseminada y bulbouretral, comparado con la nula presencia de las mismas en el ámpula y vesícula seminal de animales sanos, lo cual podría facilitar el establecimiento bacteriano. Los resultados de este trabajo son coincidentes con esos hallazgos excepto en la presencia de células contenedoras de IgA+ en estas últimas glándulas. En testículos y epidídimos los conteos son casi nulos. En este estudio se encontraron marcas mayoritariamente para IgA+ e IgM+, el conteo de IgG fue bajo o nulo. En el testículo de animales prepuberales se encontró marca para las tres. Hubo diferencias significativas solo en la IgA presentando mayor cantidad de marca en el testículo de animales prepuberales.

En procesos inflamatorios causados por *A. seminis* en el aparato reproductor de carneros Acosta, 2007 observó que las vesículas seminales resultaron ser el lugar de permanencia de la bacteria, además de presentar los cambios inflamatorios más notables, demostrando un número importante de

células plasmáticas IgA+, IgM+ e IgG+ comparado con el grupo control, esto mismo fue observado en otras inoculaciones experimentales (Al-Katib y Dennis, 2005). Los resultados de Acosta, 2007, también demostraron que la presencia de células plasmáticas IgG+ en el aparato reproductor como en glándulas anexas es mínima o nula en condiciones normales y su presencia parece estar especialmente vinculada al desarrollo de focos inflamatorios activos; y las células plasmáticas IgM+ e IgA+ se incrementan en la exposición experimental a la bacteria.



### 13. CONCLUSIONES

1. Este trabajo aporta datos para la morfometría de las glándulas anexas.
2. Los resultados obligan a revalorar la consideración de la leucocitospermia en el diagnóstico de los cuadros infecciosos en los carneros.
3. En trabajos futuros será necesario definir los rangos de leucocitos en semen que puedan considerarse normales para esta y otras especies.
4. Este estudio aporta conocimientos sobre la estructura de los órganos del aparato reproductor de animales puberales y prepuberales.
5. Se pudieron encontrar diferencias significativas en la distribución y número de macrófagos. La vesícula seminal, glándula bulbouretral y uretra pélvica de animales puberales presentaron abundantes macrófagos positivos al igual que el testículo de animales prepuberales.
6. Para linfocitos CD4+ y CD8+, las diferencias se encontraron en la próstata y en las glándulas bulbouretrales con mayor número de marca de animales adultos comparado con animales prepuberales.
7. A pesar de que se encontraron marcas para las tres inmunoglobulinas, los conteos no fueron significativos entre grupos.

## 14. LITERATURA CITADA

1. Acosta Dibarrat JP. Patología y respuesta inmune en el aparato reproductor del carnero en la infección experimental con *Actinobacillus semminis* (tesis de doctorado). México (DF) México: UNAM, 2007.
2. Acosta DJ, Buendía A, Tenorio GV, Suárez GF y Tórtora PJ. Distribución de linfocitos CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$ , células cd45ro, macrófagos (CD14) y células dendríticas (CD1b) en las glándulas anexas al aparato reproductor de carneros inoculados con *Actinobacillus seminis*. 5º Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina, 2007: 1-4.
3. Acosta DJP, Buendía JA, Martínez J, Peralta OJG, Acosta SR y Tórtora PJL. Células de respuesta inmune en la uretra pélvica de borregos. XXXII Cong. Nal. De Histología, 4 de octubre, Tulancingo Hgo, 2009: 28-30.
4. Acosta DJP, Díaz LC, Buendía JA, Tenorio GV, Suárez GF y Tórtora PJL. Células IgG, IgM, e IgA positivas en las glándulas anexas en el aparato de carneros con *Actinobacillus seminis*. (cartel) Congreso mundial del cordero y la lana, 24 y 25 de julio, Querétaro México, 2007.
5. Anderson DJ y Pudney J. Human Male Genital Tract Immunity and Experimental Models. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M E, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editors. Mucosal immunology, 2<sup>nd</sup> ed. San Diego, USA: Academic Press, 1999:1411-1422.
6. Anderson DJ. The importance of mucosal immunology to problems in human reproduction. *J. Reprod. Immunol.* 1996; 31:3-19.
7. Aponte PM, Dirk GR y Bastidas P. Testicular development in Brahman bulls. *Theriogenology.* 2005; 64:1440–1455.
8. Aughey E y Fredric LF. Comparative Veterinary Histology Clinical Correlates. Masson Publishing, Barcelona, España, 2011; 174-177.

9. Aziz N, Agarwa A, Lewis I, Sharma R y Thomas A. Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertility and Sterility*. 2004; Vol. 82 No. 3, 621-627.
10. Bacha WJ y Bacha LM. Atlas a color de Histología Veterinaria. Segunda edición, Intermédica, Colombia, 2001; 205-219.
11. Banks JW, Martínez HA, Salido RF y Lemus GA. Histología Veterinaria Aplicada. Segunda edición, Manual Moderno, México, 1996; 615-634.
12. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore F, Franzusoff P. y Duke PC. The role for CD85 ligand in preventing graft rejection, *Nature*, 1995. 377, 630-636.
13. Bene MC, Studer A y Faure G. Immunoglobulin-producing cells in human prostate, 1988; *Prostate*. 12:113-117.
14. Bier PJ, Hall CE, Duncan JR y Winter AJ. Measurement of immunoglobulins in reproductive tract fluids of bulls. *Vet. Microbiol*. 1977; 2:1-11.
15. Bilaspuri GS. Histomorphology of the epididymis in prepubertal goats. *Small Ruminant Research*. 1993; 10:227-235.
16. Bladergroen BA, Strik, MC, Bovenschen N, Van Berkum O, Scheffer GL, Meijer CJ, Hack CE y Kummer JA. The granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, is mainly expressed by dendritic cells and at immune-privileged sites. *J. Immunol*. 2001, 166, 3218-3225.
17. Buys DLJ, Lara TCO, Ortiz HO. Interpretación básica de inmunohistoquímica. Características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. *Patología*. 2007; 45(3):126-40.
18. Campero CM, Ladds PW, Hoffmann D, De'ath G. Immunoglobulin containing cells in normal and inflamed accessory sex glands of bull. *Aust. Vet. J*. 1989; 66:137-140.
19. Campero CM, Ladds PW, Hoffmann D, Duffield B, Watson D, Fordyce G. Immunopathology of experimental *Brucella abortus* strain 19 infection of the genitalia of bulls. *Vet. Immunol Immunopathol*. 1990; 24:235-246.
20. Christ AD y Blumberg RS. The intestinal epithelial cell: immunological aspects, Springer Semin. *Immunopathol*. 1997; 18:449-461.

21. Connell CJ y Christensen AK. The ultrastructure of the canine testicular interstitial tissue. *Bio. Reprod.* 1975; 12:368-382.
22. Cuff CF. Mucosal Immunity.  
URL:<http://www.hsc.wvu.edu/micro/dental2001/lec10.pdf>
23. Dellmann DH y Carithers RJ. Citología e histología. Intermedica serie nacional de medicina veterinaria, Buenos Aires, Republica de Argentina, 1999, 347-349.
24. Diemer T, Hales DB y Weidner W. Immune-endocrine interactions and Leydig cell function: The role of cytokines. *Andralogía*, 2003. 35, 55-63.
25. Doble A, Walker MM, Hariss JR, Taylor-Robinson D y Witherow RO. Intraprotatic antibody deposition in cronic abacterial prostatitis. *Br. J. Urol.* 1990. 65:598-605.
26. Dyce KM. Anatomía Veterinaria. Manual Moederno, México. 2007, 187-235.
27. Entrican G y Wheelhouse NM. Immunity in the female sheep reproductive tract. *Vet. Res.* 2006. 387:295-309.
28. Eurell J y Frappier B. Dellmann's Textbook of Veterinary Histology, Sixth edition, Blackwell Publishing, U. S. A., 2006, 247-252.
29. Flickinger CJ, Bush LA, Howards SS, Herr JC. Distribution of Leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. *Anat. Rec.* 1997. 284:380-390.
30. Foster RA. Reproductive pathology and immunology of the ram. Ph.D. Thesis, James Cook University of North Queensland, Townsville, Australia. 1987.
31. Frandson RD, Lee WW y Dee FA. Anatomy and physiology of farm animals. Sixth edition, Blackwell Publishing, Iowa, U. S. A., 2006, 375-376.
32. Garrido FGI. Metodologías generales de microtécnica aplicadas a embriología. Curso Durango, 27-28 de noviembre de 2008.
33. Gázquez OA y Blanco RA. Tratado de Histología Veterinaria. MASSON, España, 2004, 375-378.
34. Getty R, Ellenport RC y Ghoshal, DH. Sisson y orossman Anatomía de los animales domésticos. Quinta edición, Salvat editores, México, 1982, 1045-1046.

35. Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición, Mc Graw-Hillinteramericana, México, 2002, 13-14.
36. Head JR, Neaves WB y Billingham RE. Immune privilege in the testis. I. Basic parameters of allograft survival. *Transplantation*. 1998. 36:423-431.
37. Hedger Mp. Macrophages and the immune responsiveness to the testis. *J. Reprod. Immunol.* 2002. 57:19-34.
38. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000, 408, 740-745.
39. Hermo L y Lalli M. Monocytes and mast cells in the limiting membrane of human seminiferous tubules. *Biol. Reprod.* 1978. 14:92-100.
40. Horst EK y Liebich HG. Anatomía de los animales domésticos. Texto y atlas en color, Tomo II, Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España, 2005; 129-130.
41. Khan SA, Khan SJ y Dorrington JK. Interleukin-1 stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in immature rat Leydig cells in vitro. *Endocrinology*. 1992. 131: 1853-1857.
42. Liebler-Tenorio EM y Pabst R. MALT Structure and function in farm animals. *Vet. Res.* 2006. 37:257-280.
43. May DS. Anatomía del ovino, Manual de disección. Editorial hemisferio sur, Buenos Aires, Argentina, 1974, 207-208.
44. McNeilly TN, McClure SJ y Huntley JF. Mucosal immunity in sheep and implications for mucosal vaccine development. *Small Ruminant Research*. 2008. 76: 83–91.
45. Mestecky J, Lamm MF, Strober W, Bienenstock J y McGhee RJ. Mucosal immunology. Third edition, Volumen II, El sevier, U.S.A., 2005, 1651-1653.
46. Migliari J, Riva A, Lantini MS, Melis M y Usai E. Diffuse lymphoid tissue associated with the human bourethral gland. An immunohistologic characterization. *J. Androl.* 1992. 13:337-341.

47. Moldoveanu Z, Huang WQ, Kulhavy R, Plate MS, Mestecky J. Human Male Genital Tract Secretions: Both Mucosal and Systemic Immune Compartments Contribute to the Humoral Immunity. *J. Immunol.* 2005. 175:4127-4136.
48. Murphy K, Travers P y Walport M. Jeneway's immunobiology. Garland Science, U. S. A., 2008. 459-462, 488-489.
49. Ness WD, Lukyanenko YO, Jia ZH, Quideau S, Howald WN, Pratum TK, West RR, y Hutson JC. Identification of the lipophilic factor produced by macrophages that stimulates steroidogenesis. *Endocrinology.* 2000. 141:953-958.
50. Núñez TED, Efrén DA, Velázquez QF, Trigo TF y Suárez GF. Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* en sementales ovinos jóvenes. *Vet. Méx.* 1997. 28:241-245.
51. Ortiz De Montellano NAM. Evaluación de las interacciones sociales en el macho cabrío y su efecto sobre la secreción hormonal y la calidad espermática. Reporte de Tesis Doctorado, Universidad de Yucatán, 2004.
52. Pelves JP, Martin JS, Button RD, Roitt MI. Roitt's Essential Immunology. Eleventh edition, Blackwell Publishing, U. S. A., 2007; 163-166.
53. Pollanen P y Niemi M. Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells, and HLA antigens in the human testis. *Int. J. Androl.* 1991. 10, 37-47.
54. Pöllänen P, Maddocks S. Macrophages, Lymphocytes and MHC II antigen in the ram and the rat testis. *J. Reprod. Fert.* 1988; 82:437-445.
55. Pollanen P, Von E, Soder O. Testicular immunoregulator factors. *J. Reprod. Immunol.* 1990: 18:51-76.
56. Pudney J, Anderson D, Innate and acquired immunity in the human penile urethra. *J. Reprod. Immunol.* (2011), doi:10.1016/j.jri.2011.01.006.
57. Pudney J. Fine structural changes in Sertoli and Leydig cells during the reproductive cycle of the ground squirrel *Citellus lateralis*. *J. Reprod. Ferr.* 1986. 77:37-49.

58. Ritchie AWS, Hargreave TB, James K y Chisholm GD. Intraepithelial lymphocytes in the normal epididymis. A. mechanism for tolerance to sperm auto antigens. *Brit. J. Urol.* 1984; 56:79-83.
59. Roit IM, Delves JP. Inmunología. Fundamentos. 10a ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2003: 163-181.
60. Russell MW y Mestecky J. Humoral immune responses to microbial infections in the genital tract. *Microbes and Infection.* 2002. 4:667-677.
61. Russo CL, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Pudney J, Anderson D, Gipson IK. Mucin gene expression in human male urogenital tract epithelia. 2008, *Hum. Reprod.* 21, 2783-2793.
62. Samuelson AD. Textbook of veterinary histology. Saunders Elsevier, China, 2007; 433-439.
63. Saravanamuthu V, Foster RA, Ladds PW, Gorrell MD. T and B Lymphocyte subsets in spermatic granulomas in five rams. *Vet. Pathol.* 1991. 28 ;482-491.
64. Sasaki S, Nagata K y Kobayashi Y. Biochemical and Biophysical. *Research Communications.* 2009. 382:35-40.
65. Serre V, Robaire B. Distribution of immune cells in the Epididymis of the Aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. *Biol Reprod.* 1999. 61:705-714.
66. Shaller O. Nomenclatura, Anatomía Veterinaria Ilustrada. Acribia España, 1992; 202, 204-205.
67. Shintaro Sato y Hiroshi Kiyono. The mucosal immune system of the respiratory tract. *Current Opinion in Virology,* 2012, 2:225-232.
68. Steger K, Wrobel KH. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger,* Volume 178, Issue 3, June 1996, Pages 201-213.
69. Tizard RI. Introducción a la inmunología veterinaria. Octava edición, Elsevier, España, 2009; 92, 131-136, 171-174, 242-248, 251 y 252.
70. Trum J, Mol B, Pannekoek Y, Spanjaard L, Wertheim P, Bleker O y Veen F. Value of detecting leukocytospermia in the diagnosis of genital tract infection in subfertile men. *Fertility and Sterility.* 1998. Vol. 70, No. 2 315-319.

71. Yule TD, Montoya GD, Russell LD, Williams TM y Tung KSK. Autoantigens germ cells exist outside thr blood-testis barrier. *J. Immunol.* 1988. 141:1161-116.



## ANEXO

### RESULTADOS DE LAS IDDS EN LOS 62 ANIMALES MUESTREADOS

ANIMAL	EDAD	BRUCELAS LISAS	IDD B. OVIS	IDD A. SEMINIS	IDD H. SOMNUS	APARATO REPRODUCTOR COMPLETO
♂1	menos de 1 año	-	-	-	-	No
♂2	menos de 1 año	-	-	-	-	No
♂3	1 año	-	-	-	-	No
♂4	menos de 1 año	-	-	-	-	No
♂5	1 año	-	-	-	-	No
♂6	1 año	-	-	-	-	No
♂7	4 años	-	-	-	+	No
♂8	3 meses	-	-	-	-	Si
♂9	1 año	-	-	-	-	No
♂10	menos de 1 año	-	-	-	-	No
♂11	1 año	-	-	-	-	No
♂12	1 año	-	-	-	-	No
♂13	menos de 1 año	-	-	-	-	No
♂14	3 años	-	-	-	-	No
♂15	menos de 1 año	-	-	-	-	No
♂16	2 años	-	-	-	-	No
♂17	1 año	-	-	-	-	No
♂18	1 año	-	+	-	-	No
♂19	menos de 1 año	-	-	-	-	No
♂20	menos de 1 año	-	-	-	-	No
♂21	2 años	-	-	-	-	No
♂22	1 año	-	-	-	-	No
♂23	1 año	-	-	-	-	No
♂24	menos de 1 año	-	-	-	-	No
♂25	2 años	-	-	-	-	No
♂26	menos de 1 año	-	-	-	-	No
♂27	9 meses	-	-	-	-	No
♂28	9 meses	-	-	-	-	No
♂29	9 meses	-	-	-	-	Si
♂30	9 meses	-	-	-	-	Si
♂31	9 meses	-	-	-	-	Si
♂32	9 meses	-	-	-	-	No
♂33	9 meses	-	-	-	-	Si

♂34	9 meses	-	-	+	-	No
♂35	9 meses	-	-	-	-	No
♂36	9 meses	-	-	-	-	Si
♂37	9 meses	-	-	-	-	Si
♂38	9 meses	-	-	-	-	No
♂39	9 meses	-	-	-	-	No
♂40	9 meses	-	-	-	-	No
♂41	9 meses	-	-	-	+	No
♂42	9 meses	-	-	-	-	No
♂43	9 meses	-	-	-	-	No
♂44	9 meses	-	-	-	-	No
♂45	9 meses	-	-	-	-	No
♂46	9 meses	-	-	-	-	No
♂47	9 meses	-	-	-	-	No
♂48	9 meses	-	-	-	-	No
♂49	9 meses	-	-	-	-	No
♂50	9 meses	-	-	-	-	No
♂51	4 años	-	-	-	-	No
♂52	3 años	-	-	-	-	Si
♂53	4 años	-	-	-	-	Si
♂54	4 años	-	-	-	-	No
♂55	3 años	-	-	-	-	Si
♂56	4 años	-	-	-	+	No
♂57	4 años	-	-	+	-	No
♂58	3 años	-	-	-	-	Si
♂59	4 años	-	-	-	-	Si
♂60	4 años	-	-	-	-	Si
♂61	3 meses	-	-	-	-	Si
♂62	3 meses	-	-	-	-	Si

CONTEO PROMEDIO DE CELULAS BLANCAS POR CAMPO EN LAS  
MUESTRAS DE ESMEGMA

ANIMAL	EDAD	CANTIDAD DE CÉLULAS
♂1	menos de 1 año	No
♂2	menos de 1 año	+++

♂3	1 año	-
♂4	menos de 1 año	No
♂5	1 año	No
♂6	1 año	No
♂7	4 años	No
♂8	3 meses	No
♂9	1 año	+++
♂10	menos de 1 año	+
♂11	1 año	+++
♂12	1 año	+++
♂13	menos de 1 año	+
♂14	3 años	+
♂15	menos de 1 año	++
♂16	2 años	+++
♂17	1 año	+++
♂18	1 año	++
♂19	menos de 1 año	+++
♂20	menos de 1 año	+++
♂21	2 años	-
♂22	1 año	+
♂23	1 año	+
♂24	menos de 1 año	+++
♂25	2 años	+++
♂26	menos de 1 año	-
♂27	9 meses	++
♂28	9 meses	++
♂29	9 meses	++
♂30	9 meses	+
♂31	9 meses	+++
♂32	9 meses	-
♂33	9 meses	+++
♂34	9 meses	+
♂35	9 meses	No
♂36	9 meses	+++
♂37	9 meses	+
♂38	9 meses	No
♂39	9 meses	No
♂40	9 meses	No
♂41	9 meses	+
♂42	9 meses	No

♂43	9 meses	No
♂44	9 meses	No
♂45	9 meses	No
♂46	9 meses	No
♂47	9 meses	No
♂48	9 meses	No
♂49	9 meses	No
♂50	9 meses	No
♂51	4 años	+
♂52	3 años	++
♂53	4 años	++
♂54	4 años	++
♂55	3 años	-
♂56	4 años	No
♂57	4 años	++
♂58	3 años	-
♂59	4 años	++
♂60	4 años	++
♂61	3 meses	No
♂62	3 meses	No

*No. no se obtuvo la muestra, - no se observaron células inflamatorias, + de 1 a 10 células, ++ de 11 a 50 células, +++ mas de 51 células por campo.*