

UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**«Actividad espermatogénica en machos adultos jóvenes y de edad avanzada
del “ratón cola de pincel” *Octodon degus* (Molina 1786) (Rodentia,
Octodontidae)»**

Seminario de Grado

**Presentado en conformidad a los requisitos para obtener
el Grado Académico de**

“Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico”

Autor

Luis Felipe Contreras Godoy

Profesor Guía

Donald Brown González

RESUMEN

El *Octodon degus* es un roedor que se encuentra en la zona norte y central de Chile, es utilizado en laboratorio como un animal experimental, pues desarrolla espontáneamente condiciones fisiopatológicas análogas a las sufridas por el ser humano. Este animal es un buen modelo biológico para el estudio de la espermatogénesis, ya que posee características similares a la reproducción masculina en el ser humano.

En este estudio se analizó la actividad espermatogénica en base a la morfología testicular en tres grupos de *Octodon degus* de distintos rangos de edad. Se utilizaron muestras fijadas en Bouin acuoso e incluidas en parafina, de testículos de animales jóvenes (4-5 meses), adultos-jóvenes (6 meses) y de edad avanzada (2-6 años), que fueron procesadas con técnica histológica de rutina (tinción tricrómica de Arteta) e histoquímicas (PAS-Hematoxilina). Los resultados obtenidos luego del análisis de la morfometría tubular y de la línea germinal son significativamente distintos entre animales jóvenes, adultos jóvenes y de edad avanzada, y están relacionados directamente con la actividad espermatogénica. La población celular presente en túbulos en el estado VI disminuye significativamente en los animales de edad avanzada, lo cual se observa también en la proporción entre espermátidas redondas y espermátocitos en paquiteno, indicando un menor rendimiento de la meiosis. Existen “peaks” en la frecuencia de aparición de cortes transversales de túbulos seminíferos con figuras mitóticas de espermatogonias, los cuales se asocian a un determinado estado de ciclo (II, IV, V, VIII, X y XIII) dentro de las trece asociaciones celulares descritas para este roedor; esto permitiría estimar los estados de ciclo en donde se produce la proliferación de espermatogonias.

Los resultados indican que las alteraciones en la morfología y celularidad de los túbulos seminíferos se asocian al proceso natural del envejecimiento, y los “peaks” en la frecuencia de túbulos con figuras mitóticas de espermatogonias permiten estimar los estados del ciclo del epitelio seminífero donde ocurre la proliferación espermatogonial.

Palabras clave: *testículo, espermatogénesis, actividad espermatogénica, túbulos seminíferos, línea germinal, espermatogonias, figuras mitóticas, frecuencia, envejecimiento, morfología.*

ABSTRACT

The *Octodon degus* is a rodent found in northern and central Chile, and it is used in the laboratory as an experimental animal, because it spontaneously develops pathophysiological conditions, in many cases analogous to those suffered by humans. This animal is a good biological model for the study of male reproduction, specifically the process of spermatogenesis, since it has reproductive characteristics similar to the human being.

In this study, was analyzed spermatogenic activity based on testicular morphology in three groups of *Octodon degus* of different age ranges. Samples were fixed in aqueous Bouin and paraffin-embedded from testicles of young (4-5 months), young adults (6 months) and older animals (2-6 years), and further processed by routine histological (Arteta trichrome stain) and histochemical techniques (PAS-Hematoxylin). The results obtained after analysis of tubular morphometry and germ line are significantly different among young, young adults and older animals, and are directly related to spermatogenic activity. The cell population present in tubules in the stage VI decreases significantly in the elderly animals, which is also observed in the proportion between round spermatids and pachytene spermatocytes, indicating a lower efficiency of meiosis. There are "peaks" in the frequency of occurrence of cross sections of seminiferous tubules with mitotic figures of spermatogonia, which are associated with a particular stage (II, IV, V, VIII, X and XIII) from the thirteen cell associations described for this rodent that define them. This allows an estimation of the stages of the cycle where spermatogonial proliferation occurs.

From these results, it is concluded that the alterations in the morphology and cellularity of the seminiferous tubules are associated with the natural aging process. On the other hand, "peaks" in the frequency of occurrence of tubules with spermatogonia in mitosis, are interpreted as an estimate of the stages of the cycle of seminiferous epithelium where spermatogonial proliferation occurs.

Key words: *testis, spermatogenesis, spermatogenic activity, seminiferous tubules, germinal line, spermatogonia, mitotic figures, frequency, aging, morphology.*

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Gónada masculina	1
1.2.- Espermatogénesis	3
1.3.- Fases de la espermatogénesis	3
1.3.1.- Fase de proliferación espermatogonial	3
1.3.2.- Fase de maduración meiótica de espermatoцитos	5
1.3.3.- Fase de citodiferenciación o espermiogénesis	5
1.4.- Cinética de la espermatogénesis	6
1.4.1.- Ciclo del epitelio seminífero	6
1.4.2.- Onda del epitelio germinal	7
1.4.3.- Duración del ciclo del epitelio seminífero	8
1.5.- Regulación de la espermatogénesis	8
1.6.- Uniones celulares del epitelio seminífero	9
1.7.- Celularidad del epitelio seminífero	10
1.7.1.- Célula de Sertoli	10
1.7.2.- Células germinales	10
1.8.- Factores que alteran la actividad espermatogénica	13
1.9.- <i>Octodon degus</i>	14
1.9.1.- Generalidades	14
1.9.2.- Reproducción	15
1.9.3.- El <i>Octodon degus</i> como modelo de estudio	16
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	18
2.1.- Objetivo general:	18

2.2.- Objetivos específicos:.....	18
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1.- Materiales	19
3.2.- Métodos	19
3.2.1.- Selección de muestra.....	19
3.2.2.- Selección de variables.....	20
3.2.3.- Procesamiento histológico	20
3.2.4.- Determinación del índice espermatogénico. Análisis de la línea germinal	21
3.2.5.- Descripción morfológica y morfométrica.....	22
3.2.6.- Caracterización de la fase proliferativa espermatogonial	23
3.2.7.- Ciclo del epitelio seminífero del <i>Octodon degus</i>	24
3.2.8.- Análisis estadístico.....	24
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	25
4.1.- Línea germinal presente en túbulos seminíferos	25
4.2.- Descripción morfológica y morfométrica	29
4.2.1.- Diámetro tubular	29
4.2.2.- Altura del epitelio seminífero	29
4.2.3.- Diámetro del lumen tubular	30
4.2.4.- Mediciones nucleares.....	30
4.2.5.- Recuento celular.....	32
4.3.- Caracterización de la fase proliferativa espermatogonial.....	35
4.4.- Ciclo del epitelio seminífero del <i>octodon degus</i>	39
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN	42
5.1.- Descripción morfológica y morfométrica	42
5.1.1.- Línea germinal	42

5.1.2.- Mediciones tubulares	42
5.1.3.- Mediciones nucleares	43
5.2.- Recuento celular	44
5.3.- Caracterización de la fase de proliferación espermatogonial	45
5.4.- Ciclo del epitelio seminífero del <i>octodon degus</i>	47
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	58
Anexo 1: Protocolo procesador de tejidos	58
Anexo 2: Protocolo de desparafinación e hidratación	59
Anexo 3: Método Tricrómico de Arteta.....	60
Anexo 4: Método Histoquímico PAS-Hematoxilina	61

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 4.1 Mediciones tubulares promedio en secciones circulares de túbulos seminíferos en el estado VI del ciclo del epitelio seminífero del <i>Octodon degus</i>	30
TABLA 4.2 Tamaños nucleares de los diferentes tipos celulares de la línea germinal presente en el estado VI del ciclo del epitelio seminífero del <i>Octodon degus</i>	31
TABLA 4.3 Número de células en las poblaciones celulares presentes en túbulos seminíferos de <i>Octodon degus</i> en el estado VI del ciclo del epitelio seminífero	33
TABLA 4.4 Proporción células germinales / células de Sertoli en el estado VI del ciclo del epitelio seminífero en tres grupos de <i>Octodon degus</i> de diferentes rangos de edad.....	33
TABLA 4.5 Proporción entre espermátidas redondas y espermatoцитos primarios en paquiteno (ER / P) en el estado VI del ciclo del epitelio seminífero en tres grupos de <i>Octodon degus</i> de diferentes rangos de edad.	34
TABLA 4.6 Frecuencia de aparición de estados de ciclo con figuras mitóticas en tres grupos de <i>Octodon degus</i> de diferentes rangos de edad	36

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Esquema de la espermatogénesis en mamíferos.....	2
FIGURA 1.2 Esquema de los compartimientos formados por las uniones entre células de Sertoli.	9
FIGURA 1.3 Fotomicrografía de un corte histológico transversal de un túbulo seminífero de <i>Octodon degus</i> en el estado VI del ciclo teñido con tinción tricrómica de Arteta.....	9
FIGURA 1.4 Esquema de los trece estados que componen un ciclo el epitelio seminífero del <i>Octodon degus</i>	16
FIGURA 4.1 Porcentajes de túbulos seminíferos con la línea germinal completa, incompleta y depletada en tres grupos de <i>Octodon degus</i> de distintos rangos de edad.....	25
FIGURA 4.2 Fotomicrografías de cortes histológicos de testículos de <i>Octodon degus</i> teñidos con tinción tricrómica de Arteta, que muestran subcategorías de línea germinal completa.	26
FIGURA 4.3 Fotomicrografías de cortes histológicos de testículos de <i>Octodon degus</i> teñidos con tinción tricrómica de Arteta, que muestran subcategorías de línea germinal incompleta en animales inmaduros.....	26
FIGURA 4.4 Fotomicrografías de cortes histológicos de testículos de <i>Octodon degus</i> teñidos con tinción tricrómica de Arteta, que muestran subcategorías de línea germinal depletada en animales adultos.....	27
FIGURA 4.5 Análisis de la línea germinal en tres grupos de <i>Octodon degus</i> de diferentes rangos de edad.....	28
FIGURA 4.6 Número de células germinales en el estado VI del ciclo del epitelio seminífero en tres grupos de <i>Octodon degus</i> de distintos rangos de edad.	32
FIGURA 4.7 Porcentaje de pérdida de espermátidas redondas en tres grupos de <i>Octodon degus</i> de distintos rangos de edad.	35

- FIGURA 4.8** Frecuencia de aparición de estados del ciclo del epitelio seminífero con figuras mitóticas en tres grupos de *Octodon degus* de diferentes rangos de edad.37
- FIGURA 4.9** Fotomicrografías de cortes histológicos de testículos de *Octodon degus* teñidos con tinción tricrómica de Arteta, que muestran figuras mitóticas de espermatogonias en túbulos seminíferos en los estados II y IV.38
- FIGURA 4.10** Fotomicrografías de cortes histológicos de testículos de *Octodon degus* teñidos con tinción tricrómica de Arteta, que muestran figuras mitóticas de espermatogonias en túbulos seminíferos en los estados V y VIII.38
- FIGURA 4.11** Fotomicrografías de cortes histológicos de testículos de *Octodon degus* teñidos con tinción tricrómica de Arteta, que muestran figuras mitóticas de espermatogonias en túbulos seminíferos en los estados X y XIII.39
- FIGURA 4.12** Mapa del ciclo del epitelio seminífero del *Octodon degus*.41

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas

FSH: Hormona folículo estimulante

LH: Hormona luteinizante

ABP: Proteína ligante de andrógeno

PAS: Ácido peryódico de Schiff

LGI: Línea germinal incompleta

LGC: Línea germinal completa

LGD: Línea germinal depletada

A: Espermatogonia tipo A

In: Espermatogonia Intermedia

B: Espermatogonia tipo B

PL: Espermatocito en preleptoteno

P: Espermatocito en paquiteno

ER: Espermátida redonda

ANOVA: Análisis de la varianza

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1.- GÓNADA MASCULINA

Los testículos se encuentran rodeados por una envoltura fibrosa llamada túnica albugínea, en su cara interna está la túnica vasculosa que contiene numerosos vasos. Desde la superficie posterior de la túnica albugínea se forma el mediastino testicular, por donde penetran vasos sanguíneos, salen los conductos eferentes e irradian tabiques de tejido conectivo que dividen el parénquima testicular en compartimientos piramidales llamados lobulillos testiculares, que contienen a los túbulos seminíferos. **Figura 1.1** [1].

Los túbulos seminíferos son estructuras cilíndricas, rodeadas por un compartimiento intersticial formado por tejido conectivo laxo muy vascularizado en el que se encuentran vasos sanguíneos y linfáticos, además de fibroblastos, mastocitos, macrófagos y células de Leydig que representan el componente endocrino (**Figura 1.1**). Cada túbulo seminífero está rodeado por una túnica o lámina propia, también llamada tejido peritubular, es un tejido conjuntivo que carece de fibroblastos [2]. En el humano está compuesta por tres a cinco capas de células mioides (células peritubulares contráctiles) y fibrillas colágenas ubicadas por fuera de la lámina basal del epitelio seminífero. En los roedores la túnica propia consiste en una sola capa de células mioides pavimentosas que adoptan una disposición epitelioide [3]. Los túbulos están revestidos por el epitelio seminífero, el cual es un epitelio estratificado de células espermatogénicas (células germinales) y células de Sertoli (células somáticas) (**Figura 1.1**). Las células espermatogénicas se multiplican por mitosis, experimentan meiosis reduciendo su número cromosómico y se diferencian en espermatozoides maduros, se organizan en capas de células germinales entre células de Sertoli contiguas. Las células espermatogénicas más inmaduras, llamadas espermatogonias, están apoyadas sobre la lámina basal. En la porción intermedia del epitelio seminífero se encuentran los espermocitos y las espermátidas redondas, mientras que las células más maduras, las espermátidas diferenciadas, están adheridas a la porción apical de la célula de Sertoli en contacto con la luz del túbulo. Las células de Sertoli le imparten una organización estructural a los túbulos porque se extienden a través de todo el espesor del epitelio seminífero, constituyendo el

epitelio Sertoliano que ocupa cerca del 30% del volumen del epitelio y sustenta las células germinales (espermatogonias, espermatocitos y espermátidas) [3].

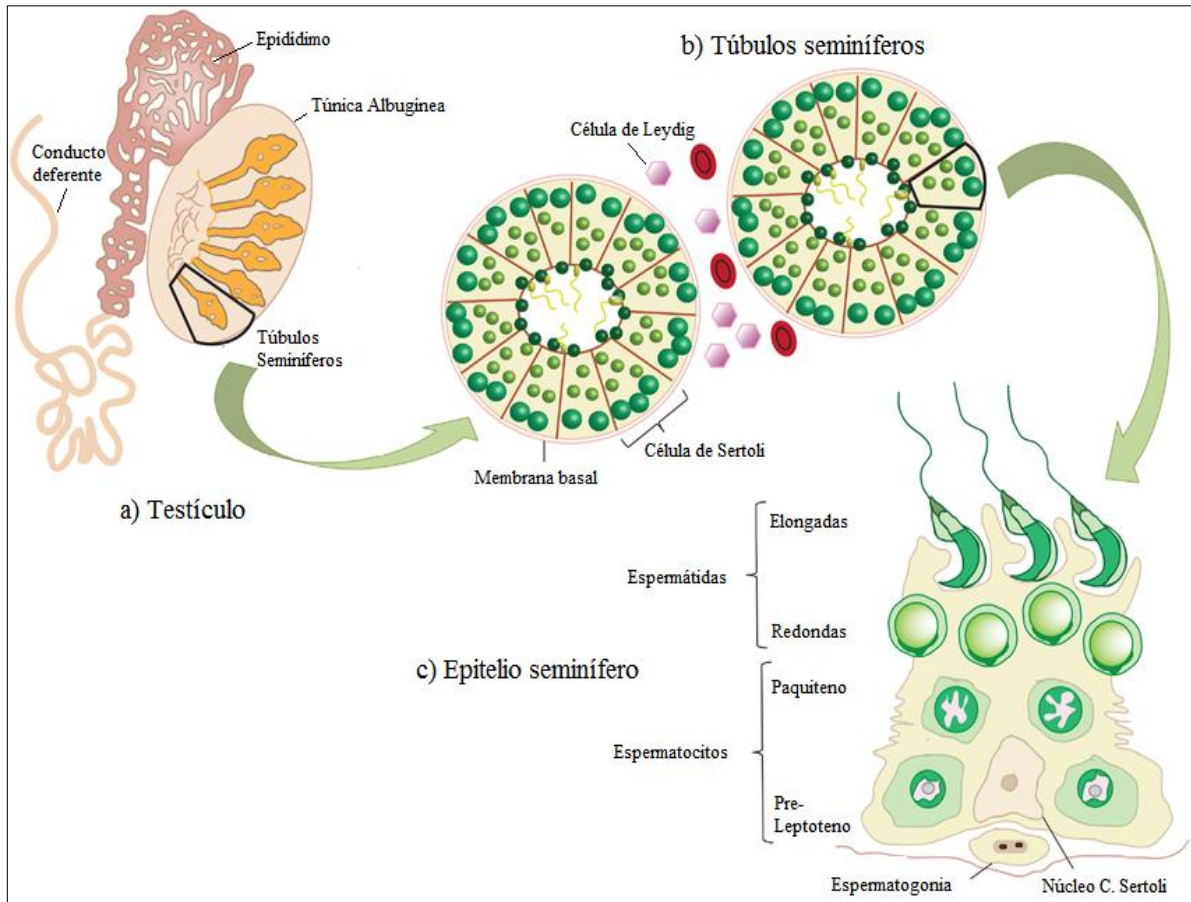


FIGURA 1.1 Esquema de la espermatogénesis en mamíferos.
 (a) corte sagital de un testículo; (b) corte transversal de túbulos seminíferos; (c) celularidad presente en el epitelio seminífero. Modificado de Redgrove y McLaughlin (2014) [4].

1.2.- ESPERMATOGÉNESIS

La secuencia de eventos citológicos que resultan en la formación de espermatozoides maduros a partir de células precursoras se conoce como la espermatogénesis [5]. Este proceso tiene lugar en las glándulas sexuales masculinas, los testículos, donde ocurre la producción de los gametos masculinos o espermatozoides. Es un proceso continuo donde células diploides indiferenciadas llamadas espermatogonias dan origen a células haploides altamente diferenciadas (espermatozoides). El objetivo de la espermatogénesis es producir gametos masculinos genéticamente únicos que puedan fertilizar un óvulo y generar descendencia [6].

La espermatogénesis es un proceso continuo desde la vida embrionaria hasta la adultez, se completa en los túbulos seminíferos de los testículos, con producción continua de espermatozoides, desde la pubertad hasta que el individuo muere en la vejez. De acuerdo con esto, la espermatogénesis en el hombre como en los demás mamíferos, se puede dividir en tres fases (prenatal, postnatal y adulta), en todas ellas hay proliferación y degeneración de células germinales. Este proceso involucra tres períodos o fases: a) de proliferación o mitosis de las espermatogonias, b) de maduración meiótica de los espermatocitos, y c) de citodiferenciación de las espermátidas o espermiogénesis. [7].

1.3.- FASES DE LA ESPERMATOGÉNESIS

1.3.1.- Fase de proliferación espermatogonial

Esta fase compromete la mitosis de espermatogonias, las cuales son células indiferenciadas que se ubican próximas a la membrana basal del tubo seminífero (compartimiento basal) y se comportan como una población celular en expansión. Existen dos modelos que explican la renovación espermatogonial.

El primer modelo fue propuesto por Clermont y Bustos-Obregón [8] y se denomina "modelo de células madre de reserva" o "teoría A_0/A_1-A_4 " donde se identificaron cinco tipos diferentes de espermatogonias, A_0 y A_1 , A_2 , A_3 y A_4 . Esta teoría define a A_0 como una reserva de

células madre que no se dividen a menos que el epitelio sea dañado por agentes tales como la irradiación, o para formar espermatogonias A_1 , cuando la espermatogénesis necesita más células. Las células A_1 - A_4 son células en renovación espermatogonial que se dividen por mitosis. Las espermatogonias A_1 se dividen hasta convertirse en A_4 , las espermatogonias A_4 normalmente dan lugar a espermatogonias A_1 , que ingresarían al ciclo de renovación espermatogonial, así como también dan lugar a espermatogonias In, que darían lugar a espermatogonias tipo B que seguirían el proceso cronológico de la espermatogénesis.

El segundo modelo propuesto originalmente por Huckins (1971) [9] y Oakberg (1971) [10] se denomina modelo de la espermatogonia A troncal o célula madre A_s , quienes luego del estudio de túbulos seminíferos completos (montados “*in toto*”)¹ de rata, identificaron tres compartimientos de espermatogonias: 1.- Compartimiento de células madres (espermatogonias solitarias A_{single} o A_s), 2.- Compartimiento de proliferación (espermatogonias pareadas A_{paired} o A_{pr} y alineadas $A_{aligned}$ o A_{al}) y 3.- Compartimiento de diferenciación, que corresponde a las células que se diferencian (A_1 - A_4 , In, B). Las células A_s se dividen para renovarse o bien para convertirse en células A_{pr} . Las células A_{pr} se dividen para formar células A_{al} que alcanzan tamaños clonales de 4, 8, o 16 células. El compartimiento de proliferación, al acercarse a su tamaño final, cesa la división mitótica, y las células A_{al} se diferencian de forma sincrónica en espermatogonias A_1 , que entonces se dividen y maduran sincrónicamente en los tipos de espermatogonias más diferenciados (A_2 , A_3 , A_4 , In, B). Las espermatogonias tipo B posteriormente experimentan la última división mitótica y se diferencian para formar los espermatoцитos en preleptoteno. Este modelo ha sido apoyado generalmente por estudios en ratones [10, 11].

La mayor diferencia histórica en estas teorías es que en la teoría de la espermatogonia A célula madre, las células A_s , A_{pr} y A_{al} son una población diferente de células separada de la población de células A_1 - A_4 . En la teoría A_0/A_1 , las células A_s y A_{pr} se consideran células madre de reserva, mientras que las células A_{al} son consideradas células A_1 - A_4 , y no serían diferentes [12].

¹ La técnica de montaje “*in toto*” de túbulos seminíferos consiste en el aislamiento de segmentos de estos túbulos del tejido testicular, que luego se tiñen con hematoxilina y se cubren con un portaobjetos para ser analizados bajo un microscopio óptico [13].

1.3.2.- Fase de maduración meiótica de espermatocitos

En esta fase ocurre el paso de espermatocitos primarios a espermátidas, mediada por el proceso de división meiótica, que consiste en dos divisiones sucesivas (meiosis I reduccional y meiosis II “equivalente”) para producir cuatro espermátidas haploides a partir de un espermatocito primario diploide [6]. El proceso se inicia cuando las espermatogonias tipo B experimentan la última división espermatogonial, pierden contacto con la membrana basal y forman espermatocitos primarios en preleptoteno o en reposo aparente, que sufren la última fase de síntesis del ciclo celular, replicando el ADN [7].

1.3.3.- Fase de citodiferenciación o espermiogénesis

Este es el proceso de diferenciación de espermátidas en espermatozoides con cromatina totalmente compactada. Esta diferenciación se relaciona con la evolución del material nuclear (forma nuclear y organización de la cromatina), de los centriolos y del aparato flagelar, y con el desarrollo del acrosoma. Se reconocen las siguientes fases de este proceso [2]:

- Fase de Golgi: Los gránulos proacrosómicos (PAS +) son visibles en la zona de Golgi, estos se unen hasta formar un gránulo mayor, rodeado de una gran vesícula que se adhiere a la membrana nuclear en el polo anterior del núcleo del espermatozoide, mientras que los centriolos migran al polo posterior y a partir del distal se origina el flagelo.

- Fase de Capuchón: La vesícula acrosómica se aplasta y expande en la superficie nuclear. El flagelo se ha alargado y adquiere la estructura típica con dos túbulos centrales y nueve pares periféricos.

- Fase Acrosómica: Se observan transformaciones del acrosoma, núcleo y flagelo. El núcleo se hace excéntrico, se alarga, deforma y la cromatina se condensa. El acrosoma se adapta a la forma del núcleo. El citoplasma con sus organelos residuales se desplaza caudalmente a lo largo del flagelo, en el citoplasma se hace visible un cuerpo cromatoide que se aproxima al centriolo distal y forma un anillo en torno al flagelo.

- Fase de Maduración: En esta fase se completa la transformación a espermatozoide. La cromatina se condensa hasta tener un aspecto paracrystalino, el acrosoma adquiere su forma habitual y se condensa. Nueve fibras gruesas periféricas rodean la estructura axial del flagelo casi hasta su extremo caudal. Se diferencia el cuello entre la cabeza y el flagelo del espermatozoide. El flagelo es recorrido por 9 fibras proteicas y en el segmento principal se rodea de una vaina fibrosa, ambas estructuras proteicas no existen en el segmento terminal. En la adquisición de su arquitectura hidrodinámica, el exceso de citoplasma es eliminado en el lumen del túbulo seminífero (cuerpo residual de Regaud) o es fagocitado por las células de Sertoli [2].

1.4.- CINÉTICA DE LA ESPERMATOGÉNESIS

En mamíferos la espermatogénesis es cíclica, en cualquier área del túbulo seminífero una nueva generación de células germinales comienza a diferenciarse antes de que la generación pasada haya terminado su desarrollo. Estas generaciones celulares evolucionan sincrónicamente y se agrupan en asociaciones celulares, que constituyen las fases (estados) del ciclo del epitelio seminífero y que equivalen a subdivisiones que varían según la especie [14, 15, 16] y tienen una composición de generaciones de células germinales constante. De esta forma una asociación celular es una agrupación definida de tipos de células germinales en determinadas fases de desarrollo en los túbulos seccionados transversalmente [7]. La sincronía en el desarrollo de las células germinales de cada generación celular se debe a la persistencia de uniones intercelulares luego de que en estas células la citocinesis ocurre de forma incompleta [17]. Entonces, la serie completa y ordenada de los cambios morfológicos que sufren las células de estas asociaciones (etapas), producto de la secuencia lógica de progresión del desarrollo sincrónico, se denomina ciclo del epitelio seminífero [7].

1.4.1.- Ciclo del epitelio seminífero

El ciclo del epitelio seminífero es una serie completa y ordenada de cambios en las asociaciones celulares (estados) que se produce en un determinado segmento de epitelio seminífero en el tiempo [7]. También se define como la serie de cambios en un área determinada del epitelio

seminífero entre dos apariciones del mismo estado, asociación o etapa del ciclo [14, 15]. Los cambios en las primeras etapas de la diferenciación de las espermatidas durante la espermiogénesis, son comúnmente utilizados para clasificar los estados del ciclo. Leblond y Clermont [15] utilizaron el sistema de identificación de la evolución del acrosoma de las espermatidas teñido por el método del ácido peryódico-Schiff (PAS) como marcador del estado de ciclo para identificar 14 estados en rata y 6 en el hombre.

Debido a que la espermatogénesis es un proceso continuo de cambios, la subdivisión es artificial, y el número de etapas depende de los criterios utilizados. Para cada especie el ciclo tiene un patrón, duración y número de estados característico.

Cada estado ocupa un determinado segmento tubular, una porción de un túbulo seminífero en su eje longitudinal está ocupado por una sola asociación celular [7]. En roedores, es posible identificar solamente un estado por sección transversal de un túbulo seminífero. Dentro de cualquier sección transversal, hay cuatro o cinco generaciones de células germinales que se desarrollan sincrónicamente [6].

En el ratón, un ciclo de la espermatogénesis se compone de 12 asociaciones celulares o estadios, que transcurren en 8,6 días. La espermatogénesis está cualitativamente completa cuando son depositados en el lumen tubular los espermatozoides generados a partir de una espermatogonia con una duración de 34,4 días, correspondiendo a cuatro ciclos [10].

1.4.2.- Onda del epitelio germinal

La onda del epitelio germinal representa la evolución topográfica de la espermatogénesis a lo largo del túbulo seminífero [2]. Las asociaciones de células se desarrollan y se mantienen en una región de un túbulo (segmento), los segmentos están clasificados dentro del túbulo seminífero, de acuerdo al estado de ciclo que está presente en dicho segmento, de esta forma la sucesión de todos los segmentos representa la onda del epitelio. Una onda del epitelio seminífero es una serie completa de segmentos, que se producen a lo largo de los túbulos seminíferos. En ratas la onda media ocupa 2,6 cm de la longitud del túbulo seminífero [7].

1.4.3.- Duración del ciclo del epitelio seminífero

El ciclo del epitelio seminífero representa una evolución cronológica y sincrónica de las diferentes generaciones de células germinales. El método utilizado para determinar la duración del ciclo es marcar la fase S del ciclo celular con timidina tritiada², y observar radioautografías³ en distintos períodos después de realizar la marcación [7]. La duración del ciclo no es constante de una especie a otra, o incluso entre animales de diferentes cepas de la misma especie, para *Octodon degus* la duración de un ciclo del epitelio seminífero es de 9,79 +/- 0,18 días según el método de radioautografía, y la duración del proceso completo de espermatogénesis equivale aproximadamente a 4,5 ciclos [18].

1.5.- REGULACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS

La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) es sintetizada en el hipotálamo y se libera en forma pulsátil hacia el sistema portal hipotalámico-hipofisiario, en la adenohipófisis produce la secreción y biosíntesis de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) [18]. Estas hormonas actúan directamente en el testículo, la LH estimula la síntesis de testosterona en las células de Leydig, mientras que la FSH regula la espermatogénesis a través de las células de Sertoli [19].

La testosterona actúa vía receptores de andrógenos en las células de Sertoli, de Leydig y peritubulares, la FSH induce a las células de Sertoli a que sinteticen y liberen una proteína ligante de andrógeno (ABP), la cual se une a la testosterona y de esta forma mantienen en los túbulos seminíferos altas concentraciones de ella, la testosterona es necesaria para iniciar y mantener la espermatogénesis [1].

² La timidina combinada con tritio (isótopo radioactivo) es utilizada para rastrear la síntesis de ADN in vivo o in vitro, la timidina 3h se incorpora en el ADN recientemente sintetizado y permite determinar la cinética de la división celular [20].

³ La Radioautografía permite la localización de sustancias radioactivas en tejidos. Este método se basa en el efecto de las radiaciones sobre una emulsión fotográfica que contiene cristales microscópicos de bromuro de plata que detectan la radioactividad y se revelan en forma de granos de plata [20].

1.6.- UNIONES CELULARES DEL EPITELIO SEMINÍFERO

En el epitelio seminífero existen tres tipos de uniones celulares morfológica y funcionalmente distintos: 1) uniones de oclusión, 2) uniones de adherencia que consisten en cuatro tipos dos formados por filamentos de actina: uniones célula-célula y contactos focales entre célula y matriz, y los otros dos formados por placas a las cuales se unen filamentos intermedios del citoesqueleto: los desmosomas que unen células entre sí y hemidesmosomas que unen las células a la matriz y, 3) uniones de comunicación [23].

Los túbulos seminíferos tienen un epitelio germinal altamente compartimentalizado. Las uniones células de Sertoli – célula de Sertoli organizan un epitelio sertoliano que establece dos compartimientos: un compartimiento basal y uno adluminal (**Figura 1.2**). Las espermatogonias y los espermatocitos primarios iniciales están restringidos en el compartimiento basal, entre el epitelio y la lámina basal. Los espermatocitos más maduros y las espermátidas están restringidos en el compartimiento adluminal. Las células de Sertoli están unidas entre sí por un complejo de unión muy hermético (uniones de oclusión) que además de dividir el epitelio seminífero en dos compartimientos, conforma la barrera hematotesticular que aísla inmunológicamente las células espermatogénicas haploides (espermatocitos, espermátidas y espermatozoides) [7, 23].

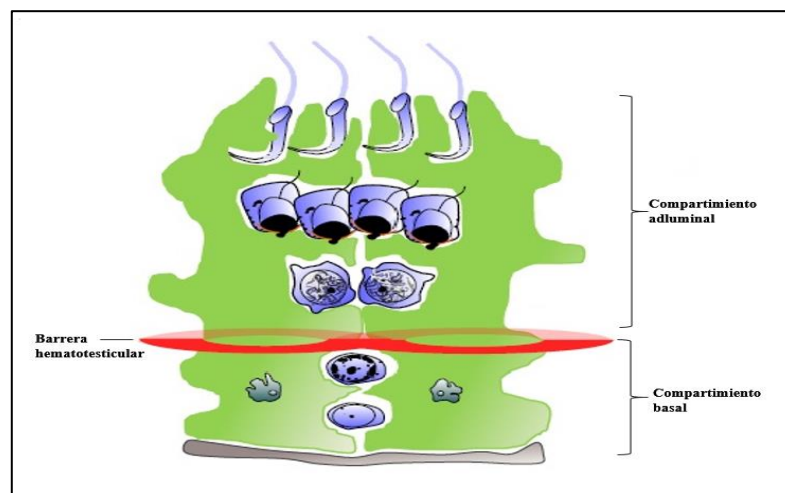


FIGURA 1.2 Esquema de los compartimientos formados por las uniones entre células de Sertoli.

Modificado de O'Donnell, Stanton y de Kretser (2017) [24].

1.7.- CELULARIDAD DEL EPITELIO SEMINÍFERO

1.7.1.- Célula de Sertoli

Las células de Sertoli son células somáticas que están presentes a lo largo de todo el ciclo espermatogénico, también llamadas células de sostén. Cumplen la función de proteger y nutrir a las células germinales, además de secretar la proteína fijadora de andrógeno y establecer la barrera hematotesticular. Las células de Sertoli desempeñan un rol fundamental en la organización estructural del epitelio seminífero y en la regulación de la espermatogénesis [5].

Las células de Sertoli son cilíndricas, alargadas, se encuentran apoyadas sobre la lámina basal de los túbulos seminíferos y su extremo apical se proyecta hacia la luz del túbulo, poseen prolongaciones apicales y laterales que rodean a las células espermatogénicas contiguas y ocupan los espacios entre ellas, se extienden desde la membrana basal hasta la luz tubular, pero sus límites laterales pasan desapercibidos [1]. Tienen núcleos ovalados o triangulares de ubicación basal con escotaduras ocasionales y nucléolos prominentes. Las numerosas invaginaciones laterales o apicales de sus membranas celulares envuelven a las células espermatogénicas en diferenciación [21].

En preparados para microscopia óptica con hematoxilina-PAS no se distingue su citoplasma, pero su núcleo se detecta con facilidad; en cortes transversales suelen aparecer de contorno triangular, con cromatina laxa distribuida desigualmente y el nucléolo contrasta por su intensa coloración roja [21].

Estas células en comparación con las germinales, son altamente resistentes a sustancias tóxicas, radiación, y diversos factores que alteran la espermatogénesis [5]. Dada esta característica son utilizadas como un factor de corrección para estandarizar resultados de recuentos de las diferentes células germinales [22].

1.7.2.- Células germinales

Los tipos celulares de la línea germinal que fueron estudiados se identificaron de acuerdo a su morfología y por su ubicación espacial en el epitelio seminífero (**Figura 1.3**).

En humanos se han identificado tres tipos de espermatogonias: espermatogonia tipo A oscura, tipo A pálida, y espermatogonia tipo B [6]. En roedores se identifican morfológicamente tres tipos de espermatogonias: espermatogonia tipo A, Intermedia (In), y tipo B; según lo descrito por Huckins [9] existen tres compartimientos de espermatogonias: células madres (espermatogonias A_s), células proliferantes (espermatogonias A_{pr} y A_{al}) y las células que se diferencian (A_1 - A_4 , In, B) [9]. De acuerdo a estos estudios, existen siete tipos de espermatogonias tipo A: las clasificadas según su disposición topográfica en el epitelio (aisladas, pareadas, y alineadas), y las espermatogonias diferenciadas que se dividen sincrónicamente (A_1 , A_2 , A_3 , A_4) [8]. Sin embargo las células A_s , A_{pr} , A_{al} son indistinguibles morfológicamente por microscopía de luz, mientras que las espermatogonias diferenciadas (A_1 - A_4) no pueden ser distinguidas las unas de las otras [12].

Las **espermatogonias tipo A** se caracterizan por tener un núcleo ovoide orientado en paralelo a la membrana basal del túbulo, de cromatina fina y homogénea, con un nucléolo central. Estas células se dividen por mitosis, para dar origen a las **espermatogonias Intermedias**, las cuales poseen un núcleo oval con cromatina heterogénea, con cromocentros gruesos, con presencia de placas finas de cromatina cerca de la membrana nuclear [5]. Luego se dividen nuevamente por mitosis generando **espermatogonias tipo B**, las que presentan un núcleo esférico de menor tamaño que las espermatogonia tipo A y tipo In. Estas células tienen menor contacto con la membrana basal y contienen acumulaciones de cromatina nuclear mucho más condensadas [5]. Las espermatogonias tipo B experimentan la última división espermatogonial, y forman **espermatoцитos primarios en preleptoteno** o en reposo aparente. Los espermatoцитos en preleptoteno son muy similares a las espermatogonias tipo B, aunque son ligeramente más pequeños, y presentan una menor cantidad de cromatina adosada a la membrana nuclear [7]. En la transición de espermatoцитo preleptoteno a leptoteno los núcleos pierden gradualmente la cromatina adosada a la carioteca y forman hilos de cromatina fina (cromosomas condensados) que se visualizan al microscopio óptico. Estas células de transición tienen una forma redondeada y se ubican en el compartimiento intermedio del epitelio seminífero [5; 7].

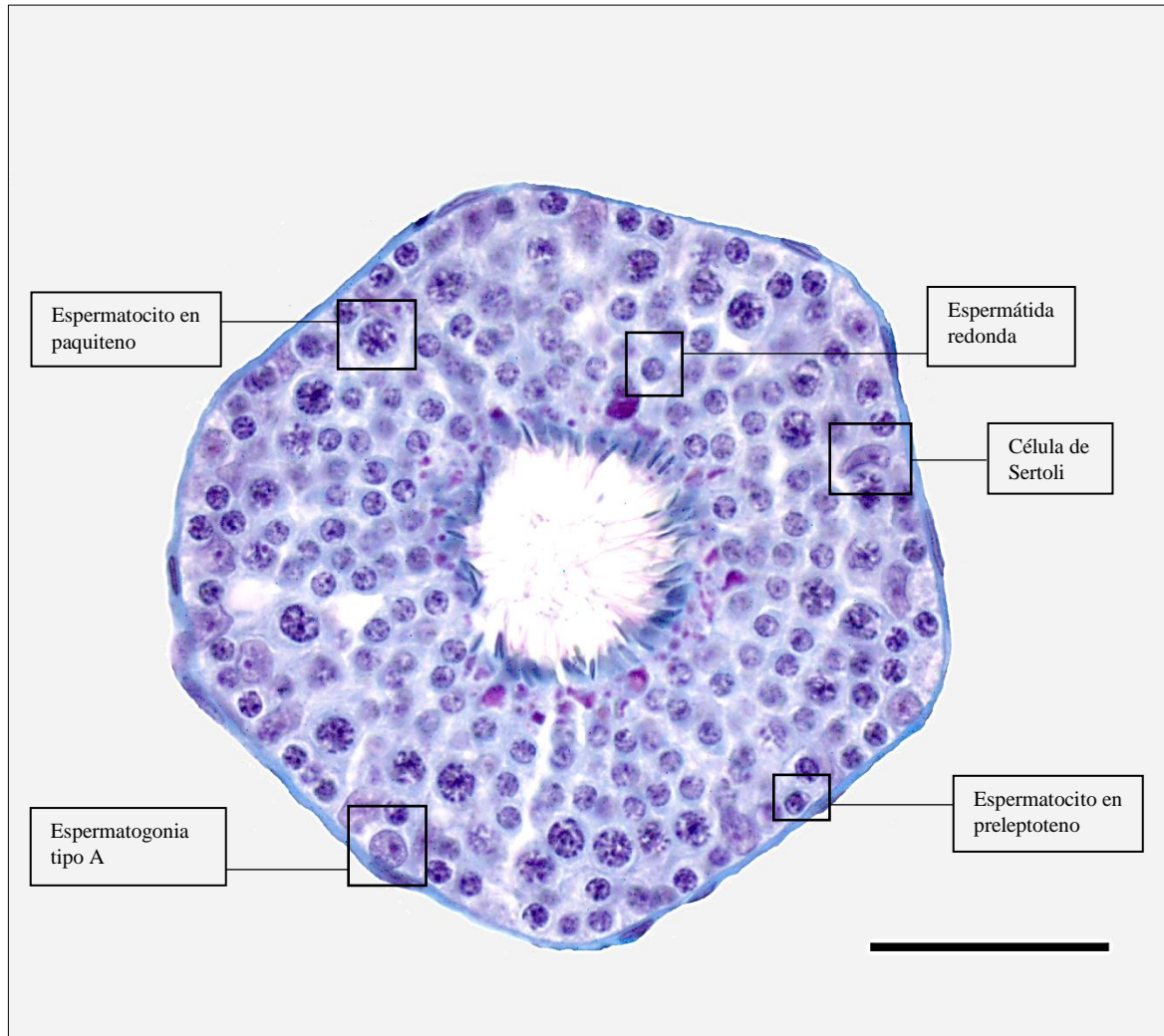


FIGURA 1.3 Fotomicrografía de un corte histológico transversal de un túbulo seminífero de *Octodon degus* en el estado VI del ciclo teñido con tinción tricrómica de Arteta. Se indican los tipos celulares identificados y cuantificados. Barra de escala = 50 μm .

Los **espermatoцитos primarios en profase meiótica** se encuentran en el compartimiento adluminal del epitelio seminífero, estas son las células más grandes presentes en este epitelio, y tiene un núcleo de gran tamaño con un aspecto vesicular, cuyos cromosomas se encuentran en distintas etapas de condensación [1]. Estas células se dividen por meiosis, la Profase I es muy extensa, comprende cinco etapas (leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis),

donde se observa una transición morfológica gradual de una etapa a otra, caracterizado por el aumento del tamaño celular y nuclear, además de cambios nucleares a nivel de la morfología de los cromosomas y de su proceso de emparejamiento que son la base de la subdivisión de la profase meiótica [7].

Las **espermátidas redondas** son células haploides pequeñas provenientes de la segunda división meiótica experimentada por los espermatocitos secundarios. Se caracterizan por su forma esférica y sus núcleos pálidos y redondos, además de presentar escaso citoplasma [21]. Mediante el proceso de la espermiogénesis las espermátidas redondas se diferencian en espermátidas elongadas por medio de cambios morfológicos: condensación de la cromatina, elongación nuclear, eliminación del citoplasma y la formación del flagelo.

1.8.- FACTORES QUE ALTERAN LA ACTIVIDAD ESPERMATOGÉNICA

La actividad espermatogénica puede verse alterada directamente por múltiples factores, ya sea la exposición a agentes nocivos, determinados factores ambientales, estrés, patologías asociadas, temperatura, dieta, edad, etc., factores que inciden directamente en la regulación y función de las células espermatogénicas durante el proceso de espermatogénesis [25, 26, 27, 28]. La función biológica de nuestro organismo se ve afectada por el paso del tiempo, el envejecimiento es el resultado de procesos biológicos normales necesarios para la vida, pero que tiene efectos negativos a largo plazo en el funcionamiento orgánico [29]. A nivel celular el envejecimiento implica cambios en la regulación del eje reproductivo y la acumulación de daños en las macromoléculas producidos por radicales libres, causando de esta manera la alteración o pérdida de la función celular, lo cual lleva a la alteración en la función de diferentes órganos [30].

La función testicular en el hombre se ve alterada por el envejecimiento, relacionándose directamente con niveles bajos de testosterona en el plasma sanguíneo [31]. Tanto en el hombre como en animales de laboratorio de edad avanzada, se observa una disminución en la capacidad de secretar testosterona por parte de las células de Leydig [32]. En hombres seniles se observa disminución del volumen testicular [33]. En los túbulos seminíferos uno de los principales cambios que se observa es la pérdida de células germinales en el epitelio seminífero [34]. Este fenómeno

también está relacionado con una disminución en la proliferación de células germinales, como se observa en el envejecimiento de testículos de ratas [35], *Octodon degus* [36] y humano [37]. También en el epitelio seminífero del hámster, debido al envejecimiento, se observa una disminución significativa en el número de espermatogonias, acompañado de diferentes grados de degeneración histológica [38]. Estas investigaciones sustentan la idea de que el envejecimiento afecta directamente la actividad espermatogénica.

1.9.- *OCTODON DEGUS*

1.9.1.- Generalidades

El *Octodon degus* es un mamífero herbívoro perteneciente al orden de los roedores y a la familia de los Octodontidae, es un roedor de hábitos diurnos que se encuentra en el norte y centro de Chile [39; 40]. En estado silvestre su actividad se restringe a microhábitats bajo arbustos, por una alta presencia de depredadores en espacios abiertos. De este modo se desplaza entre arbustos cercanos, siempre cerca de refugios [40].

El *Octodon degus* tiene el tamaño promedio de una rata, su cola equivale aproximadamente al 40% de la longitud total del animal en estado adulto, el cuerpo y la cola miden 15 cm y 12 cm respectivamente. Mientras que el peso de un animal adulto varía desde los 170 hasta los 300 gramos, generalmente las hembras son más grandes que los machos. La temperatura corporal media es de 36,8°C [41].

Este roedor es criptórquido facultativo, los testículos se encuentran confinados a la cavidad abdominal, descendiendo a la región anogenital sólo durante el periodo reproductivo [42]. Los testículos tienen una forma oval y están rodeados por un cuerpo graso que varía de acuerdo al peso corporal y la dieta del animal [41].

En estado silvestre viven en grupos, forman clanes que se componen generalmente de un macho y tres hembras, estos clanes se agrupan en colonias de decenas de individuos. Tienen un buen comportamiento social, por lo que en cautiverio requieren estar en contacto con otros degus.

El periodo de vida del *Octodon degus* en estado silvestre es de 2 a 4 años, en cambio en cautiverio su longevidad aumenta a 6 – 8 años en promedio [41].

1.9.2.- Reproducción

El *Octodon degus* en estado silvestre tiene un ciclo reproductivo que se caracteriza por un periodo de reposo sexual de enero a junio y un periodo de actividad sexual de junio-julio a diciembre.

En los machos los testículos están localizados en la zona anogenital durante el periodo de reproducción, y su temperatura es 0,9°C más baja que la temperatura corporal. La espermatogénesis masculina se completa a la edad de dos meses (primera observación de espermatozoides en el epidídimo), sin embargo, no son capaces de aparearse antes de la edad de 5 a 8 meses [41]. En cautiverio alcanzan la madurez sexual antes, y no existe un periodo de reproducción específico, se extiende a lo largo del año. Los *O. degus* jóvenes son sexualmente maduros cuando alcanzan un peso corporal de 150 g [43], las hembras alcanzan la madurez sexual a los 3 meses y los machos alrededor de los 4 meses [39].

Al igual que los humanos, la línea germinal del *O. degus* se desarrolla en la etapa de proliferación espermatogonial inicial mientras el roedor aún es un feto [44]. El proceso de espermatogénesis del *O. degus* adulto ocurre en un ciclo del epitelio seminífero que tiene una duración de 9,79 +/- 0,18 días y está compuesto por trece estados de acuerdo con las diferentes generaciones de células que componen las asociaciones del ciclo del epitelio seminífero (**Figura 1.4**) [18].

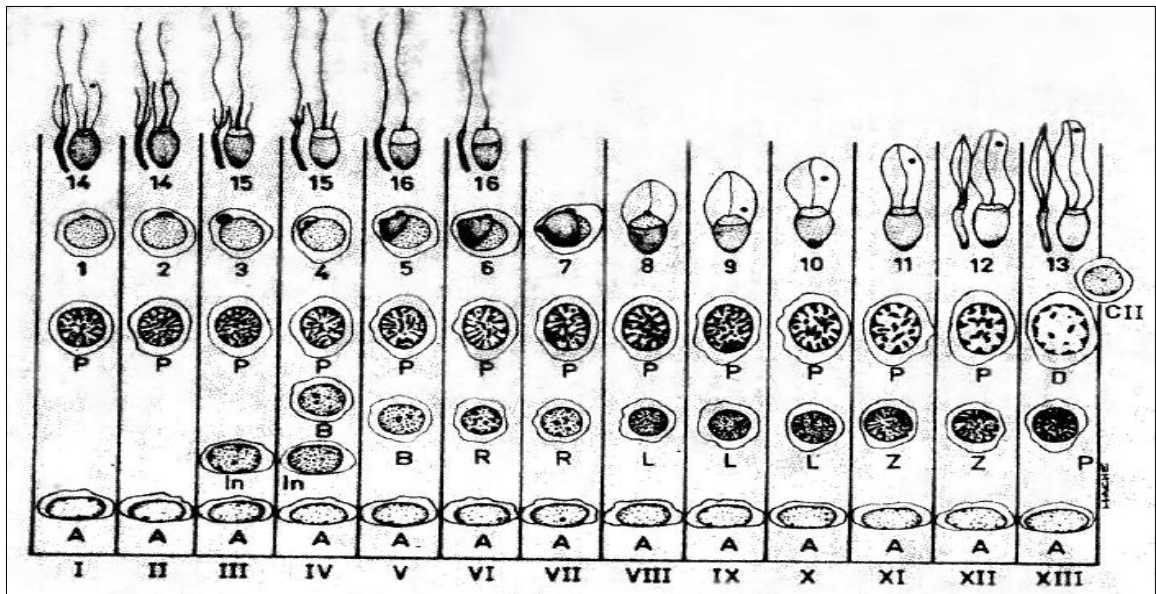


FIGURA 1.2 Esquema de los trece estados que componen un ciclo del epitelio seminífero del *Octodon degus*.
Potocnjak y Bustos-Obregón (1977) [18].

1.9.3.- El *Octodon degus* como modelo de estudio

El *Octodon degus* es un animal ampliamente usado en laboratorio como modelo experimental. Debido a ser un animal sociable, a su diversidad genética, a su fácil adaptación a los entornos de laboratorio, y a su mayor longevidad en cautiverio este roedor ha sido utilizado para el estudio de ciclos circadianos de mamíferos diurnos [39]. Además se ha documentado que el *Octodon degus* desarrolla espontáneamente condiciones fisiopatológicas, en muchos casos análogas a las sufridas por el ser humano, que definen a este animal como un excelente modelo para la investigación en diversas áreas de la medicina, como lo son el estudio de la diabetes y enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento, como cataratas y la enfermedad de Alzheimer [45; 46].

Esta especie también resulta un buen modelo biológico para el estudio de la reproducción masculina, específicamente el proceso de la espermatogénesis, ya que al igual que los humanos la línea germinal de esta especie se desarrolla en la etapa de proliferación

espermatogonial inicial mientras el roedor aún es un feto [44]. El envejecimiento representa uno de los factores que influye en la actividad espermatogénica, reflejándose en la disminución en el número de células germinales [34; 37], y disminución en el índice de proliferación de espermatogonias [35; 36; 28].

Este estudio está centrado en el periodo de proliferación espermatogonial, con el objetivo de la caracterización de esta fase a lo largo de los diferentes estados del ciclo del epitelio seminífero del *Octodon degus* (estados en que hay división espermatogonial), además del análisis de la incidencia de esta actividad proliferativa en las siguientes generaciones de células germinales representativas de las fases de maduración meiótica y espermiogénesis.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1.- OBJETIVO GENERAL:

1. Caracterizar la actividad espermatogénica y la fase de proliferación espermatogonial en *Octodon degus*.

2.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Describir morfológicamente el epitelio seminífero del *Octodon degus*.
2. Determinar los estados del ciclo del epitelio seminífero del *Octodon degus* en que ocurre proliferación de las células germinales.
3. Describir la actividad espermatogénica en machos adultos jóvenes y de edad avanzada del *Octodon degus* de acuerdo con variaciones en el diámetro tubular y su relación con presencia o ausencia de las correspondientes generaciones de células germinales.
4. Realizar recuentos celulares de la línea germinal del epitelio seminífero del *Octodon degus*, al menos en el estado más representativo previo a la espermiación (estado VI).
5. Comparar la actividad espermatogénica en machos jóvenes y de edad avanzada de *Octodon degus*.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- MATERIALES

Los recursos, instrumental y reactivos utilizados en la realización de este estudio fueron provistos por el Laboratorio de Biología de la Reproducción y del Desarrollo, del Instituto de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso.

Se contó con la infraestructura y el apoyo técnico presente en este laboratorio, lugar en el cual se desarrollaron la totalidad de las técnicas histológicas e histoquímicas, junto con el análisis microscópico.

3.2.- MÉTODOS

3.2.1.- Selección de muestra

La muestra corresponde a 9 Testículos de *Octodon degus* fijados en Bouin acuoso e incluidos en parafina, que fueron divididos en tres grupos de distintos rangos de edad. El primer grupo corresponde a tres testículos de animales jóvenes (4 meses), el segundo a tres testículos de animales adultos-jóvenes (6 meses), y el tercer grupo a tres testículos de animales de edad avanzada (2-6 años).

La selección de estas muestras se basa en un muestreo no probabilístico (por conveniencia), debido a que se seleccionaron animales de edades predeterminadas, considerando animales jóvenes, adultos jóvenes y animales de edad avanzada. Los machos de 4 meses se encontraban en inactividad reproductiva, los de 6 meses se encontraban comenzando el periodo reproductivo, mientras que los machos de 2 – 6 años de edad estaban en periodo reproductivo al momento de su sacrificio.

3.2.2.- Selección de variables

Las variables en estudio corresponden a diámetros tubulares, actividad espermatogénica, número de células germinales, como variables dependientes y la edad como variable independiente.

3.2.3.- Procesamiento histológico

En este estudio se trabajó con testículos ya incluidos en parafina, por lo tanto en ningún momento hubo manipulación de animales vivos. Las muestras de testículo fueron donadas por el Dr. Adrián Palacios de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso, que trabaja con el roedor chileno *Octodon degus* en el marco del Proyecto Fondecyt: “Neurobiology of vision in the retina of the diurnal rodent *Octodon degus*” del año 2011.

Los testículos utilizados fueron fijados en una solución de Bouin acuoso y procesados de acuerdo al correspondiente protocolo [ver anexo 1]. Se realizaron cortes seriados de 5 μm de espesor para cada testículo, los cuales se montaron en portaobjetos usando albúmina de Mayer como medio de adhesión, los que fueron almacenados en la estufa a 40°C durante toda una noche. Los preparados histológicos fueron desparafinados e hidratados [ver anexo 2], y luego teñidos mediante técnica histológica utilizando tinción Tricrómica de Arteta [ver anexo 3] y la técnica histoquímica del ácido peryódico-Schiff (PAS) y Hematoxilina [ver anexo 4].

- a) Tricrómico de Arteta: Esta técnica histoquímica se utilizó para evaluar la morfología tisular y celular de los túbulos seminíferos, además de la proliferación espermatogonial mediante la visualización de figuras mitóticas.
- b) PAS-Hematoxilina: Esta técnica histoquímica se utilizó para identificar los diferentes estados del ciclo del epitelio seminífero del *Octodon degus*, en base a los cambios de la morfología de las espermátidas y el sistema acrosómico [14], que ocurren durante el proceso de la espermiohistogénesis. Los primeros cambios durante la diferenciación del acrosoma de las

espermátidas, comúnmente se han utilizado como criterio para clasificar los estados del ciclo del epitelio seminífero [7].

3.2.4.- Determinación del índice espermatogénico. Análisis de la línea germinal

Para cada testículo se determinó el índice espermatogénico de acuerdo con la escala de Sitzmann *et al.* (2014) [47] modificada de Grocock y Clarke (1974) [48]. Con el uso de un microscopio óptico (Leica 2500, Alemania) con objetivo 400X, 100 secciones circulares de túbulos seminíferos se clasificaron cualitativamente en una categoría de acuerdo a la presencia o ausencia de las diferentes generaciones de células germinales, correspondiente a las asociaciones celulares típicas que caracterizan cada uno de los 13 estados del ciclo del epitelio seminífero normal en *Octodon degus*. Cada sección se asignó a una subcategoría dentro de las categorías principales, como sigue:

- a) LGI: Línea germinal incompleta, mayormente presente en animales inmaduros.
 - LGI3: Presencia de espermatogonias, espermatocitos y una generación de espermátidas tempranas, pero las espermátidas elongadas están ausentes.
 - LGI2: Solo espermatogonias y espermatocitos están presentes.
 - LGI1: Solo espermatogonias presentes.

- b) LGC: Línea germinal completa, mayormente presente en adultos.
 - LGCNOR: Línea germinal completa normal. Todas las generaciones de células germinales están bien representadas en cada asociación celular (estados del ciclo del epitelio seminífero).
 - LGCANOR: Línea germinal completa anormal. Depleción parcial de células germinales en una de las generaciones celulares que pueden ser espermatogonias B, espermatocitos o espermátidas.

c) LGD: Línea germinal depletada; una o más generaciones celulares están ausentes.

- LGD3: Una generación de espermatogonias B, de espermatocitos o de espermatidas está ausente.
- LGD2: Solo espermatocitos y espermatogonias presentes, espermatidas ausentes.
- LGD1: Espermatidas y espermatocitos ausentes.
- LGD0: Cordones fibrosos, células germinales y células somáticas de Sertoli ausentes.

3.2.5.- Descripción morfológica y morfométrica

Para cada testículo se contabilizó un mínimo de 100 túbulos seminíferos en sección circular en la etapa VI (correspondiente al estado previo a la espermiación). En estas secciones se midió el diámetro tubular, la altura del epitelio seminífero, diámetro del lumen tubular y se tipificaron según su morfología las distintas generaciones de células germinales que constituyen esta asociación.

Luego se contabilizó el número de células presentes en dicho estado: Células de Sertoli, espermatogonias tipo A, espermatocitos en preleptoteno, espermatocitos en paquitenos y espermatidas redondas. Los recuentos celulares se realizaron de forma manual con el empleo de un microscopio óptico (Leica 2500, Alemania) con aumento 400X en enfoque fijo en un plano.

Para las mediciones tubulares y celulares se utilizó un microscopio equipado con una cámara digital adosada usando el objetivo 400X. Las imágenes video capturadas se analizaron con el programa Image J, versión 1.60 del National Institute of Health (NIH). El diámetro de los túbulos seminíferos se determinó midiendo el eje representativo del diámetro entre las membranas basales de las secciones más circulares de túbulos seminíferos, y usando el mismo eje se midió la altura epitelial entre la base y el ápice del epitelio seminífero.

Una vez hechas las mediciones y cuantificaciones de los tipos celulares del túbulo seminífero, se calcularon los siguientes promedios para cada grupo de animales:

- a) Diámetro tubular
- b) Altura epitelial

- c) Diámetro del lumen tubular
- d) Diámetro nuclear de tipos celulares
- e) N° células de Sertoli
- f) N° espermatogonias tipo A (A)
- g) N° espermatocitos en paquiteno (P)
- h) N° espermatocitos preleptoteno (PL)
- i) N° espermátidas redondas (ER)

Los valores del recuento de células fueron corregidos por el método de Abercrombie [49], el cual es un método estándar de conteo celular que le permite al investigador obtener un recuento verdadero de células [7], considerando el diámetro mayor de los núcleos observados, y por el factor de corrección de células de Sertoli [22], puesto que estas células en comparación con las células germinales son altamente resistentes a diversas noxas y su número se mantiene constante, por lo cual se utiliza como factor de corrección para estandarizar resultados de los recuentos de células germinales.

3.2.6.- Caracterización de la fase proliferativa espermatogonial

Se caracterizó la fase proliferativa de la espermatogénesis a lo largo del ciclo del epitelio seminífero, mediante el análisis microscópico de túbulos seminíferos en sección circular, con el objetivo de determinar los estados del ciclo del epitelio seminífero donde ocurre la proliferación espermatogonial, a través de la identificación de figuras mitóticas presentes en el epitelio germinal del túbulo, correspondientes a espermatogonias en proliferación.

La identificación de secciones circulares de túbulos seminíferos con presencia de figuras mitóticas de espermatogonias permitió realizar una estimación de los determinados estados del ciclo del epitelio seminífero donde ocurre la proliferación de espermatogonias.

3.2.7.- Ciclo del epitelio seminífero del *Octodon degus*

El epitelio germinal de los túbulos seminíferos del *Octodon degus* consta de 13 estados de ciclo, de acuerdo al estudio de la espermiogénesis (evolución del sistema acrosómico) efectuado por Potocnjak y Bustos-Obregón [18].

La técnica histoquímica PAS-Hematoxilina permitió el estudio de los estados de ciclo del epitelio seminífero, con base en los cambios de la morfología de las espermátidas y el sistema acrosómico [15], que ocurren durante el proceso de la espermiogénesis.

Los preparados histológicos teñidos con PAS-Hematoxilina se observaron con un microscopio equipado con una cámara digital usando el objetivo 1000X, se fotografiaron las diferentes células que componen cada una de las 13 asociaciones celulares del ciclo del epitelio seminífero del *Octodon degus* y se elaboró el mapa del ciclo correspondiente.

3.2.8.- Análisis estadístico

Los resultados de las mediciones tubulares y recuentos celulares se expresaron como el valor promedio \pm error estándar (E.E.). Para el análisis comparativo entre los datos obtenidos de los tres grupos de animales, se empleó análisis de varianza (ANOVA) y la prueba t de Student para comparar desviaciones muestrales. Se consideró una probabilidad menor a 0,05 ($p \leq 0,05$) como criterio de significancia estadística, es decir un nivel de significancia de un 5%. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con el programa Microsoft Excel 2013.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1.- LÍNEA GERMINAL PRESENTE EN TÚBULOS SEMINÍFEROS

El estudio de la línea germinal presente en los túbulos seminíferos de los testículos analizados, demostró que el grupo de animales adultos-jóvenes posee el mayor porcentaje de túbulos con la línea germinal completa, mientras que los animales jóvenes y los de edad avanzada presentaron un mayor porcentaje de túbulos seminíferos con la línea germinal incompleta en el caso de animales jóvenes, y la línea germinal depletada en animales viejos.

Se evidenció que existe una disminución estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) en el porcentaje de túbulos seminíferos con LGC en los animales jóvenes y los de edad avanzada, en comparación con los animales adultos-jóvenes. Esto último es concordante con un porcentaje significativamente mayor ($p \leq 0,05$) de túbulos seminíferos con LGI en el grupo de animales jóvenes y túbulos con LGD en los animales de edad avanzada. Los resultados anteriores se encuentran especificados en la **figura 4.1**.

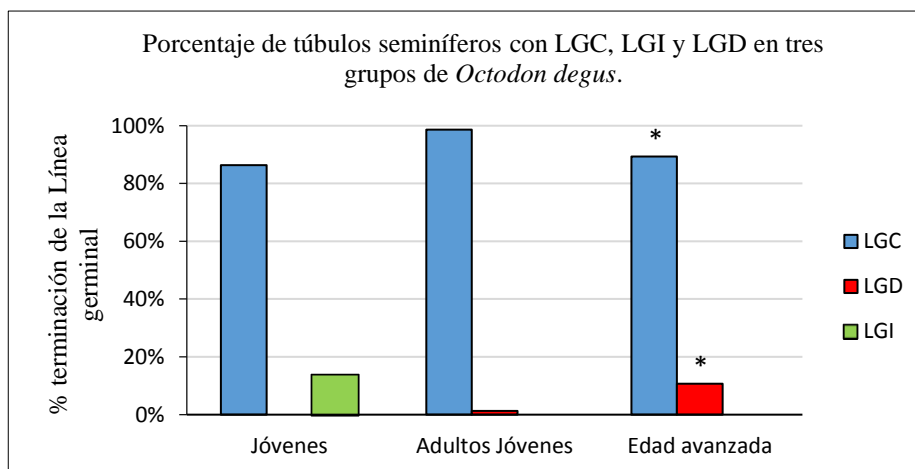


FIGURA 4.1 Porcentajes de túbulos seminíferos con la línea germinal completa, incompleta y depletada en tres grupos de *Octodon degus* de distintos rangos de edad. Se observa una disminución significativa en el porcentaje de túbulos con la línea germinal completa y un aumento significativo en el porcentaje de túbulos con la línea germinal depletada en los animales de edad avanzada en comparación con los animales adultos jóvenes (* $p < 0,05$). LGC= Línea germinal completa; LGD= Línea germinal depletada; LGI= Línea germinal incompleta.

Las subcategorías de la línea germinal completa, incompleta en el caso de los animales inmaduros y depletada en animales maduros, se ilustran en las **figuras 4.2, 4.3 y 4.4**.

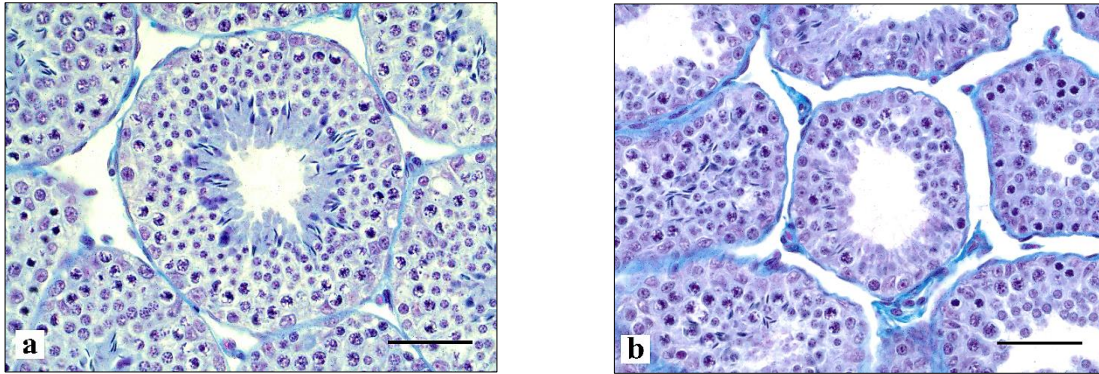


FIGURA 4.2 Fotomicrografías de cortes histológicos de testículos de *Octodon degus* teñidos con tinción tricrómica de Arteta, que muestran subcategorías de línea germinal completa. a) LGCNOR: Línea germinal completa normal, todas las generaciones de células germinales están bien representadas en cada asociación celular; b) LGCANOR: Línea germinal completa anormal, muestra una depleción parcial en una generación de células germinales, en este caso espermatoцитos en paquiteno, espermátidas redondas y alargadas. Barra de escala = 50 μm .

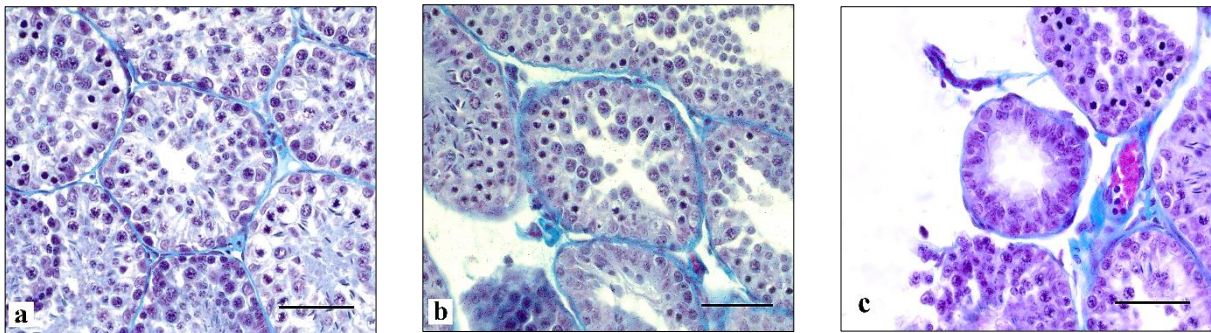


FIGURA 4.3 Fotomicrografías de cortes histológicos de testículos de *Octodon degus* teñidos con tinción tricrómica de Arteta, que muestran subcategorías de línea germinal incompleta en animales inmaduros.

a) LGI3: se caracteriza por la ausencia de diferentes generaciones de células germinales: espermátidas alargadas ausentes; b) LGI2: espermátidas redondas y alargadas ausentes; c) LGI1: solo se observan espermatoгонias presentes. Barra de escala = 50 μm .

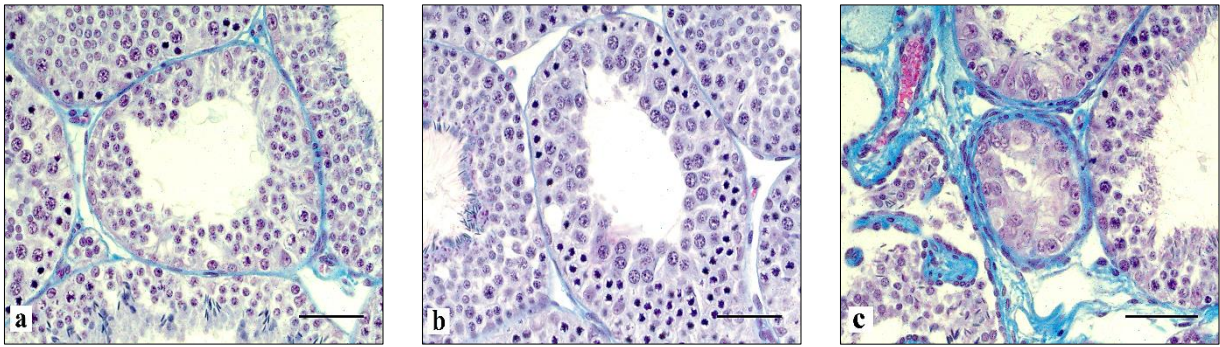


FIGURA 4.4 Fotomicrografías de cortes histológicos de testículos de *Octodon degus* teñidos con tinción tricrómica de Arteta, que muestran subcategorías de línea germinal depletada en animales adultos.

a) *LGD3*: pérdida de una o más generaciones de células germinales (espermatogonias B, espermatocitos o espermatidas ausentes); b) *LGD2*: espermatidas redondas y alargadas ausentes; c) *LGD1*: espermatidas y espermatocitos ausentes, solo espermatogonias y células de Sertoli presentes. Barra de escala = 50 μ m.

El análisis cuantitativo de las categorías y sub-categorías de la línea germinal completa demostró que existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tres grupos de animales. El grupo de animales adultos-jóvenes posee el mayor porcentaje de túbulos con LGCNOR, mientras que los animales de edad avanzada tienen el mayor porcentaje de túbulos con LGCANOR (**figura 4.5.a**).

En el grupo de animales jóvenes se evidenció que el mayor porcentaje de túbulos con la línea germinal incompleta corresponden a la sub-categoría LGI3 (**figura 4.5.b**).

El análisis de las sub-categorías de la línea germinal depletada en animales adultos indicó que el grupo de animales de edad avanzada muestra el mayor porcentaje de túbulos con LGD3, LGD2 y LGD1 en comparación con los animales adultos jóvenes. Las diferencias fueron significativas ($p \leq 0,05$) solo en la primera sub-categoría (LGD3) de línea germinal depletada (**figura 4.5.c**).

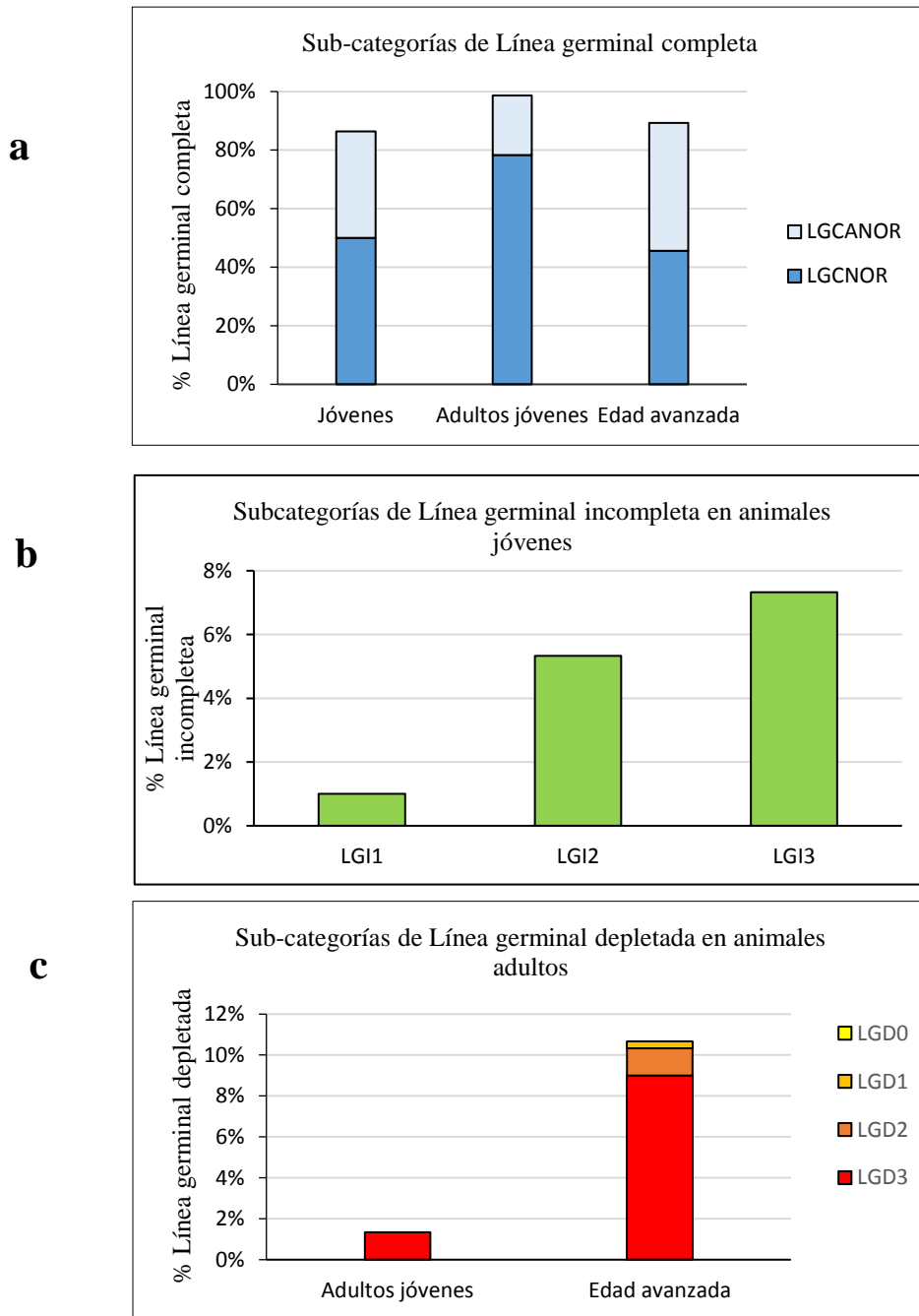


FIGURA 4.5 Análisis de la línea germinal en tres grupos de *Octodon degus* de diferentes rangos de edad. Porcentajes de túbulos con subcategorías de la línea germinal completa (**a**), incompleta en animales jóvenes (**b**) y depletada en animales adultos (**c**).

4.2.- DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA

4.2.1.- Diámetro tubular

Los resultados obtenidos de las mediciones del diámetro tubular se encuentran en la **tabla 4.1**. Se observó que el grupo de animales adultos-jóvenes poseen el mayor diámetro tubular promedio, mientras que el grupo de animales de edad avanzada muestran el menor diámetro tubular promedio, a su vez los animales jóvenes mostraron un diámetro tubular intermedio respecto de los otros grupos.

El análisis estadístico indicó que hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en los promedios del diámetro tubular de los tres grupos de animales.

Se observó un diámetro menor estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) en los túbulos seminíferos de los grupos de animales jóvenes y de edad avanzada en comparación con los adultos-jóvenes.

4.2.2.- Altura del epitelio seminífero

Los resultados obtenidos de las mediciones de la altura epitelial se encuentran en la **tabla 4.1**. Se observó que el grupo de animales adultos jóvenes muestra el mayor promedio de altura epitelial, mientras que el menor promedio de altura epitelial corresponde al grupo de animales de edad avanzada. Por su parte los animales jóvenes presentan una altura epitelial promedio que se aproxima a los adultos jóvenes.

Las diferencias son estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre tres los grupos de animales. Se observó una altura epitelial menor estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) en los animales de edad avanzada en comparación con los otros grupos de animales.

4.2.3.- Diámetro del lumen tubular

Los resultados obtenidos de las mediciones del diámetro del lumen tubular se encuentran en la **tabla 4.1**. Hay diferencias en el diámetro del lumen tubular que son significativas ($p \leq 0,05$) entre los tres grupos de animales. Se observó que el grupo de animales de edad avanzada poseen el mayor promedio de diámetro de lumen tubular, siendo este aumento estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) en comparación a los otros dos grupos.

TABLA 4.1 Mediciones tubulares promedio en secciones circulares de túbulos seminíferos en el estado VI del ciclo del epitelio seminífero del *Octodon degus* ($\mu\text{m} \pm \text{E.E.}$).

Grupo	Diámetro tubular ($\mu\text{m} \pm \text{E.E.}$)	Altura epitelial ($\mu\text{m} \pm \text{E.E.}$)	Diámetro del lumen tubular ($\mu\text{m} \pm \text{E.E.}$)
Jóvenes	138,1 $\pm 15,4$	52,1 $\pm 4,4$	33,8 $\pm 6,7$
Adultos-jóvenes	143,3 $\pm 0,7$	55 $\pm 0,5$	33,2 $\pm 1,4$
Edad avanzada	134,7 * $\pm 10,8$	43,8 * $\pm 5,6$	47,1 * $\pm 3,9$

* = Disminución estadísticamente significativa en comparación a los otros grupos de animales ($p \leq 0,05$). Se observa un aumento significativo del diámetro del lumen tubular en los animales de edad avanzada.

4.2.4.- Mediciones nucleares

Los resultados obtenidos para las mediciones de los tamaños nucleares de las células germinales presentes en el epitelio seminífero de secciones circulares de túbulos en el estado VI del ciclo se detallan en la **tabla 4.2**.

Las espermatogonias A se identificaron en base a la morfología característica ya descrita para este roedor [18] y a su disposición basal en el epitelio seminífero. Poseen un núcleo

ovoide/oval con su eje mayor orientado en paralelo a la membrana basal, tienen una cromatina fina homogénea y un nucléolo fácil de visualizar. Los resultados de las mediciones indicaron que el núcleo de estas células es mayor que el de los espermatoцитos en preleptoteno y de las espermátidas redondas.

Los espermatoцитos preleptoténicos son células de núcleo esférico de diámetro pequeño con una cromatina perinuclear condensada. Por su parte los espermatoцитos primarios en paquiteno ocupan una ubicación intermedia dentro del epitelio seminífero, se caracterizan por ser células redondas a ovaladas de gran tamaño cuyo núcleo vesiculoso posee cromosomas gruesos irregularmente distribuidos, siendo fácilmente identificables. Los resultados demuestran que estas células tienen un diámetro nuclear mayor que el de las espermatogonias A. Las espermátidas redondas son células pequeñas de tamaño similar a los espermatoцитos en preleptoteno, tienen escaso citoplasma y su núcleo es redondo con escasa cromatina condensada.

Los tamaños nucleares de las espermatogonias tipo A (diámetro mayor), espermatoцитos en preleptoteno, espermatoцитos primarios en paquiteno y espermátidas redondas no difieren significativamente ($p \geq 0,05$) entre los tres grupos estudiados (**tabla 4.2**). Por lo tanto el factor de corrección para el recuento celular (fórmula de Abercrombie) fue el mismo para todos los animales.

TABLA 4.2 *Tamaños nucleares de los diferentes tipos celulares de la línea germinal presente en el estado VI del ciclo del epitelio seminífero del Octodon degus ($\mu\text{m} \pm \text{E.E.}$).*

Grupo	A (largo y ancho)		PL	P	ER
	$(\mu\text{m} \pm \text{E.E.})$		$(\mu\text{m} \pm \text{E.E.})$	$(\mu\text{m} \pm \text{E.E.})$	$(\mu\text{m} \pm \text{E.E.})$
Jóvenes	$7,9 \pm 0,0$	$6,7 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,0$	$8,3 \pm 0,0$	$5,2 \pm 0,0$
Adultos-jóvenes	$7,8 \pm 0,0$	$6,9 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,0$	$8,4 \pm 0,0$	$5,2 \pm 0,0$
Edad avanzada	$7,9 \pm 0,0$	$6,4 \pm 0,0$	$5,5 \pm 0,0$	$8,3 \pm 0,0$	$5,2 \pm 0,0$

A= espermatogonia tipo A; PL= espermatoцитo preleptoteno; P= espermatoцитos en paquiteno; ER= espermátidas redondas.

4.2.5.- Recuento celular

Los resultados obtenidos de los recuentos de células germinales y células de Sertoli en secciones circulares de túbulos seminíferos en el estado VI del ciclo se observan en la **tabla 4.3**. En todos los casos el recuento celular es significativamente menor en el grupo de animales de edad avanzada ($p \leq 0,05$) (**figura 4.6**).

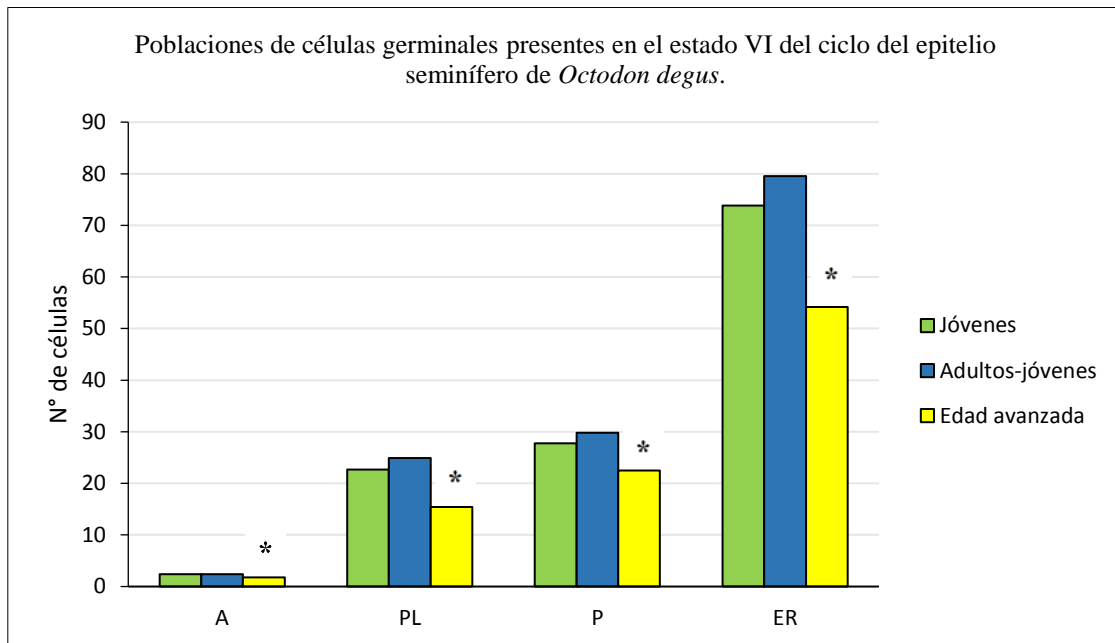


FIGURA 4.6 Número de células germinales en el estado VI del ciclo del epitelio seminífero en tres grupos de *Octodon degus* de distintos rangos de edad.

Se observa una disminución significativa en el número de células germinales en los animales de edad avanzada en comparación con los animales jóvenes y adultos-jóvenes ($*p \leq 0,05$).

El número de espermatogonias tipo A no varía significativamente entre los grupos de animales jóvenes y adultos-jóvenes (2,3 células por sección circular de túbulo), pero disminuyen a 1,7 células en los animales de edad avanzada, así como también los espermatocitos en preleptoteno, los espermatocitos primarios en paquiteno y las espermátidas redondas se presentan en menor número. En el grupo de animales de 2-6 años también hay un menor número de células Sertoli el cual es estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$). Por lo tanto, los recuentos de células germinales y células de Sertoli son significativamente ($p \leq 0,05$) mayores en el grupo de animales adultos-jóvenes

(**tabla 4.3**). Del mismo modo se observó que los recuentos de las células germinales corregidos por el factor de corrección de células de Sertoli son menores en los animales de edad avanzada (**tabla 4.4**).

TABLA 4.3 Número de células en las poblaciones celulares presentes en túbulos seminíferos de *Octodon degus* en el estado VI del ciclo del epitelio seminífero ($X \pm E.E.$)

Grupo	A	PL	P	ER	Sertoli
Jóvenes	2,3 ^a ± 0,2	22,6 ^a ± 2,2	27,7 ^a ± 5,7	73,8 ^a ± 21,5	11,6 ^a ± 1,7
Adultos-jóvenes	2,3 ^a ± 0,1	24,8 ^b ± 0,8	29,8 ^b ± 0,5	79,5 ^b ± 1	12,8 ^b ± 0,3
Edad avanzada	1,7 ^b ± 0,1	15,4 ^c ± 1,8	22,4 ^c ± 3,5	54,1 ^c ± 13,1	10,1 ^c ± 0,3

A= espermatogonias tipo A; PL= espermatocitos en preleptoteno; P= espermatocitos en paquiteno; ER= espermátidas redondas. (a, b, c)= diferentes letras denotan diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$).

TABLA 4.4 Proporción células germinales / células de Sertoli en el estado VI del ciclo del epitelio seminífero en tres grupos de *Octodon degus* de diferentes rangos de edad

Grupo	A	PL	P	ER
Jóvenes	0,2	1,9	2,3	6,3
Adultos-jóvenes	0,1	1,9	2,3	6,1
Edad avanzada	0,1	1,5	2,2	5,3

A= espermatogonias tipo A; PL= espermatocitos en preleptoteno; P= espermatocitos en paquiteno; ER= espermátidas redondas.

Se calculó la proporción celular entre espermatidas redondas y espermátocitos primarios en paquiteno, con el objetivo de establecer el rendimiento de la meiosis en los tres grupos de animales. Se observó una leve disminución en el grupo de animales de edad avanzada en comparación a los otros grupos de animales (**tabla 4.5**).

TABLA 4.5 *Proporción entre espermatidas redondas y espermátocitos primarios en paquiteno (ER / P) en el estado VI del ciclo del epitelio seminífero en tres grupos de Octodon degus de diferentes rangos de edad.*

Grupo	P	ER	ER/P
Jóvenes	27,7	73,8	2,6
Adultos-jóvenes	29,8	79,5	2,6
Edad avanzada	22,4	54,1	2,4

P= espermátocitos primarios en paquiteno; ER= espermatidas redondas.

El promedio de espermátocitos en paquiteno es mayor en los adultos jóvenes respecto de los animales jóvenes y de edad avanzada (**tabla 4.3 y 4.5**). Los espermátocitos primarios experimentan 2 divisiones meióticas consecutivas para producir 4 espermatidas redondas, en base a esta característica en el grupo de animales adultos jóvenes se deberían formar 119,2 espermatidas redondas a partir de 29,8 espermátocitos en paquiteno, pero sólo se contabilizaron 79,5 realmente (**tabla 4.5**). Estos datos indicaron que el porcentaje de espermatidas redondas producidas es menor en un 33,3% en los animales adultos-jóvenes, y en un 39,7% en los animales de edad avanzada (**figura 4.7**).

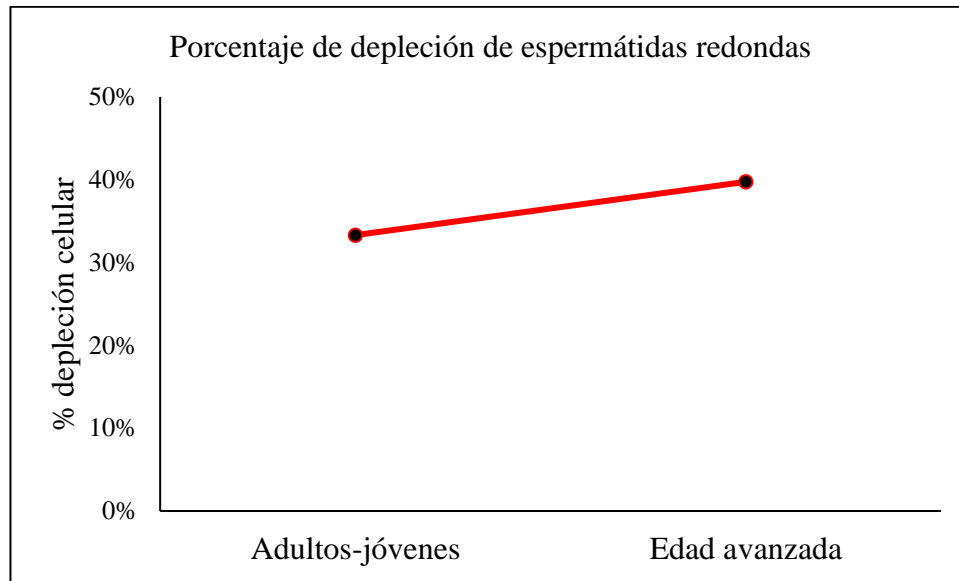


FIGURA 4.7 Porcentaje de pérdida de espermatidas redondas en tres grupos de *Octodon degus* de distintos rangos de edad.

4.3.- CARACTERIZACIÓN DE LA FASE PROLIFERATIVA ESPERMATOGONIAL

Se identificaron secciones circulares de túbulos seminíferos con presencia de figuras mitóticas de espermatogonias próximas a la membrana basal del epitelio germinal, con objeto de determinar los estados del ciclo del epitelio seminífero donde proliferan estas células.

En la **tabla 4.6** se observa la frecuencia con que aparecen en el corte histológico de testículo de *Octodon degus* estados de ciclo con presencia de figuras mitóticas de espermatogonias. En los tres grupos de animales que fueron analizados se observó que en promedio la frecuencia de aparición de túbulos seminíferos con figuras mitóticas de espermatogonias varía entre un 19% para el estado XIII y 0% para el estado VI del ciclo. Se observó que generalmente la mayor frecuencia de aparición de túbulos con figuras mitóticas de espermatogonias corresponde a estados iniciales y tardíos del ciclo del epitelio seminífero, en este caso el estado II y XIII (**tabla 4.6**).

TABLA 4.6 Frecuencia de aparición de estados de ciclo con figuras mitóticas en tres grupos de *Octodon degus* de diferentes rangos de edad.

Estado de ciclo	Jóvenes	Adultos-jóvenes	Edad avanzada	X
I	9%	7,66%	9,66%	8,77%
II	14,66%	19,33%	17%	17%
III	0,66%	1%	1%	1%
IV	8%	12%	7,33%	9,11% ^{In}
V	4,33%	5,33%	4,33%	4,66% ^B
VI	0%	0%	0%	0%
VII	2,33%	2,33%	1,66%	2,11%
VIII	11%	9%	11,33%	10,44%
IX	6,66%	4%	6%	6%
X	11,33%	12,66%	9,33%	11,11%
XI	3,66%	5%	3%	4%
XII	6%	7%	8,33%	7,11%
XIII	22,33%	14,66%	21%	19%

X= Promedio de frecuencia de aparición de estados con mitosis de espermatogonias.

In, B= Mitosis de espermatogonias Intermedias y B.

Los resultados indicaron que en los tres grupos de animales se observaron “peaks” en la frecuencia de aparición de estados de ciclo con presencia de figuras mitóticas de espermatogonias (**figura 4.8**). Se observó que posterior a la espermiación (en el estado VI) hay un mayor porcentaje de secciones circulares de túbulos con figuras mitóticas, dichas secciones correspondían a los estados VIII, X, XIII, luego se observó un mayor porcentaje de túbulos con figuras mitóticas en el estado II. Además se identificaron figuras mitóticas que corresponderían a espermatogonias intermedias In y tipo B en los estados IV y V respectivamente, y la frecuencia de aparición de estos estados también fue considerable (**tabla 4.6**).

Se evidenció que la mayor frecuencia de aparición de figuras mitóticas de espermatogonias corresponde a los estados II, IV, V, VIII, X, y XIII (tabla 4.6; figura 4.8). Figuras mitóticas identificadas se ilustran en las figuras 4.9, 4.10, 4.11.

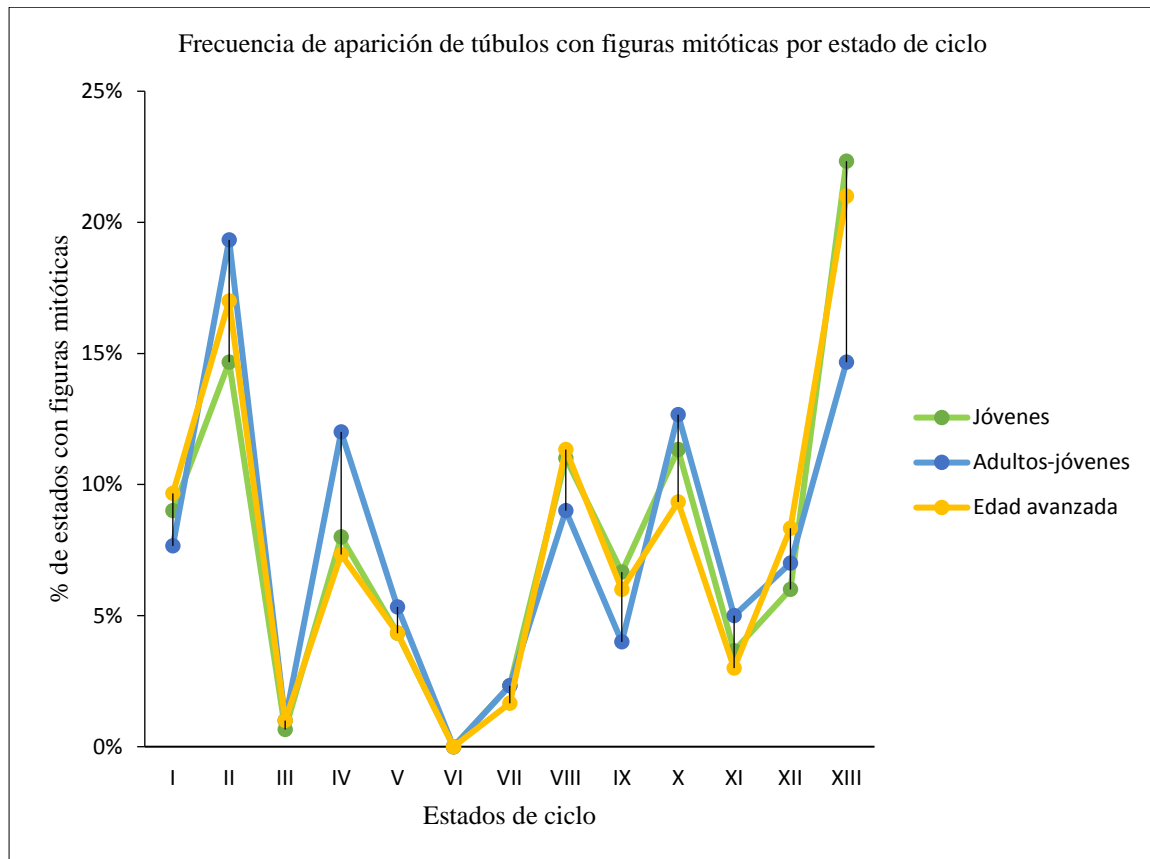


FIGURA 4.8 Frecuencia de aparición de estados del ciclo del epitelio seminífero con figuras mitóticas en tres grupos de *Octodon degus* de diferentes rangos de edad.

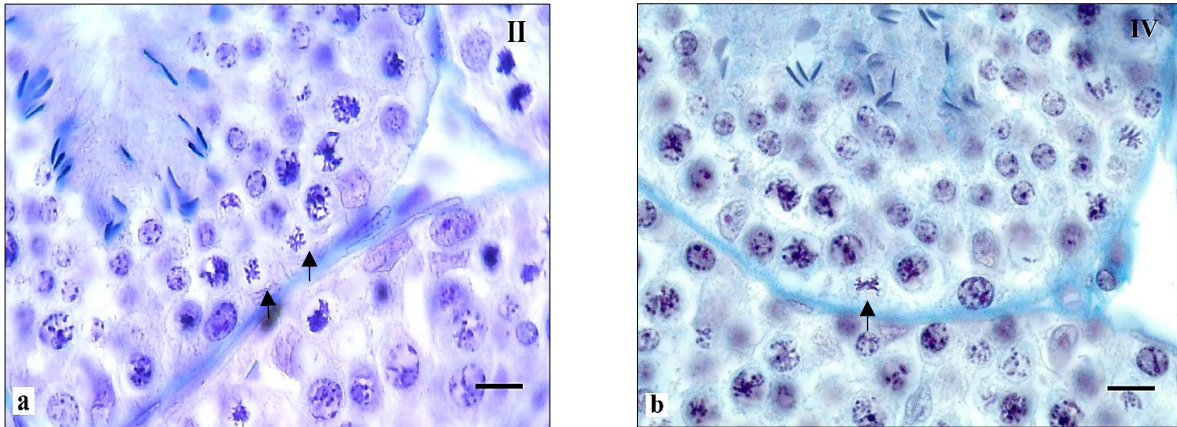


FIGURA 4.9 Fotomicrografías de cortes histológicos de testículos de *Octodon degus* teñidos con tinción tricrómica de Arteta, que muestran figuras mitóticas de espermatogonias en túbulos seminíferos en los estados II y IV.

(a) Las flechas indican figuras mitóticas (profases) de espermatogonias tipo A en el compartimiento basal del epitelio seminífero en estado II del ciclo; (b) La flecha indica una figura mitótica (metafase) de una espermatogonia tipo A en el compartimiento basal del epitelio seminífero en el estado IV del ciclo. Barra de escala = 10 μ m.

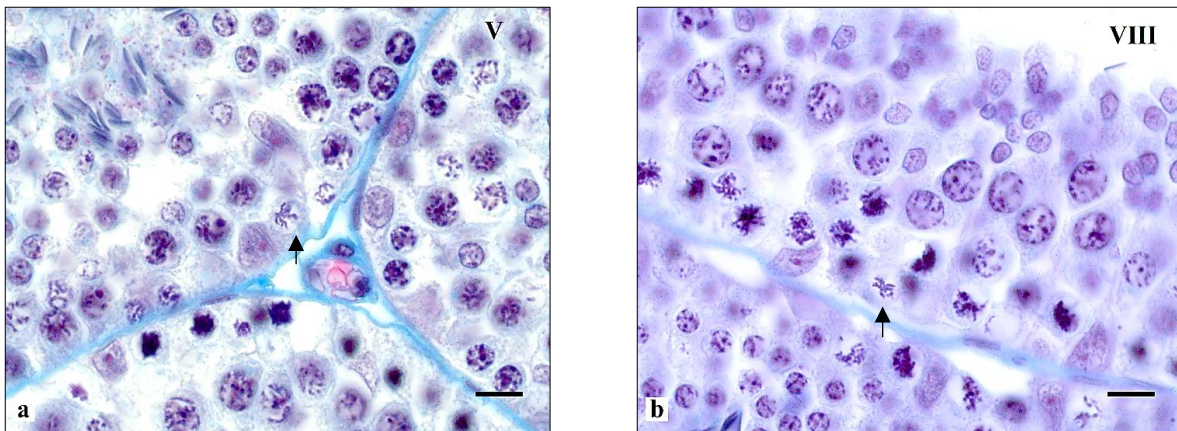


FIGURA 4.10 Fotomicrografías de cortes histológicos de testículos de *Octodon degus* teñidos con tinción tricrómica de Arteta, que muestran figuras mitóticas de espermatogonias en túbulos seminíferos en los estados V y VIII.

(a) La flecha indica una figura mitótica (metafase) de espermatogonia tipo B en el compartimiento basal del epitelio seminífero en el estado V del ciclo; (b) La flecha indica una figura mitótica (metafase) de una espermatogonia tipo A en el compartimiento basal del epitelio seminífero en el estado VIII. Barra de escala = 10 μ m.

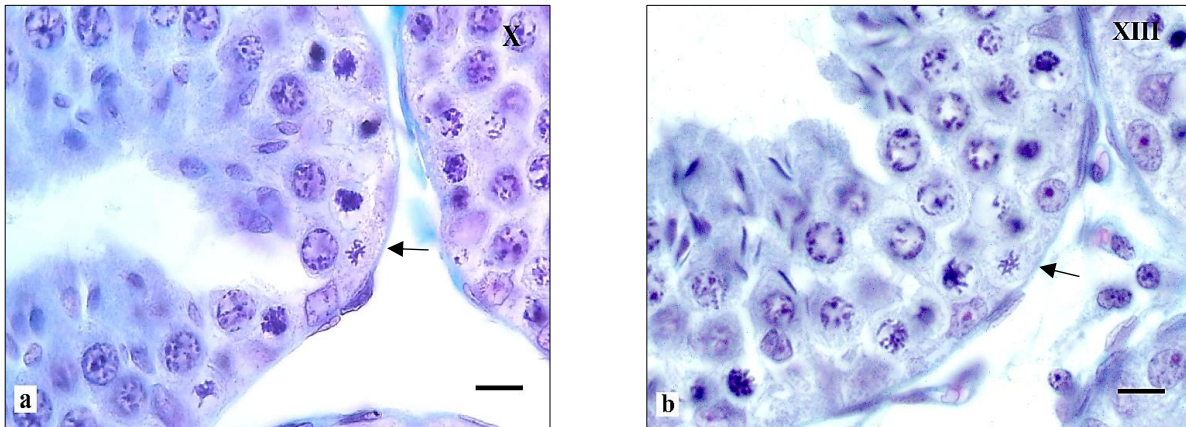


FIGURA 4.11 Fotomicrografías de cortes histológicos de testículos de *Octodon degus* teñidos con tinción tricrómica de Arteta, que muestran figuras mitóticas de espermatogonias en túbulos seminíferos en los estados X y XIII.

(a) La flecha indica una figura mitótica (metafase) de espermatogonia tipo A en el compartimiento basal del epitelio seminífero en el estado X del ciclo; (b) La flecha indica una figura mitótica (profase) de una espermatogonia tipo A en el compartimiento basal del epitelio seminífero en el estado XIII. Barra de escala = 10 μ m.

4.4.- CICLO DEL EPITELIO SEMINÍFERO DEL *OCTODON DEGUS*.

Al observar un corte transversal de un túbulo seminífero se observan diferentes tipos de células germinales, la presencia de estas asociaciones de células se definen como un determinado estado del ciclo del epitelio seminífero, lugar en el que coexisten determinados tipos de espermatogonias, con espermatocitos en etapas de la meiosis y con espermátidas en distintas fases de la espermiogénesis.

De acuerdo a Potocnjak y Bustos-Obregón [18] el ciclo del epitelio seminífero del *Octodon degus* consta de 13 estados o asociaciones de células germinales. Estas asociaciones son identificadas mediante la observación de los primeros cambios (evolución del sistema acrosómico) que sufren las espermátidas durante el proceso de espermiogénesis en cortes de testículos teñidos con el método histoquímico del ácido peryódico-Schiff (PAS), debido a que los gránulos acrosómicos son PAS +.

Se utilizó el método histoquímico del ácido peryódico-Schiff (PAS) para identificar los estados de ciclo, además de considerar la celularidad característica presente en el epitelio seminífero de las diferentes asociaciones celulares. La descripción de los estados del ciclo del epitelio se realizó en base a las observaciones hechas por Potocnjak y Bustos-Obregón [18].

Los resultados observados para las diferentes generaciones de células germinales que componen cada uno de los 13 estados del ciclo del epitelio seminífero se detallan en la **figura 4.12**.

Las espermatogonias tipo A se encuentran en el compartimiento basal del epitelio seminífero, sobre la membrana basal. Citológicamente se caracterizan por tener un núcleo oval orientado en paralelo a la membrana basal, de cromatina fina distribuida homogéneamente, con un nucléolo prominente. Se observan a lo largo de los 13 estados de ciclo.

Las espermatogonias Intermedias In se encuentran en el compartimiento basal del epitelio, tienen características intermedias entre las espermatogonias A y B, caracterizándose por su núcleo oval con cromatina heterogénea, con presencia de placas finas de cromatina cercanas a la carioteca. Se observan en los estados III y IV del ciclo.

Las espermatogonias tipo B tienen un menor contacto con la membrana basal, tienen un menor tamaño en comparación a las espermatogonias A e In, su núcleo es redondo y presenta acumulaciones de cromatina muy condensada (heterocromatina). Se observan en el estado V del ciclo.

Los espermatocitos en preleptoteno son similares a las espermatogonias tipo B aunque ligeramente más pequeñas, tienen un núcleo pequeño y redondo con cromatina fuertemente condensada. Se observan en los estados VI y VII del ciclo.

Los espermatocitos primarios se encuentran en el compartimiento adluminal del epitelio, experimentan meiosis, la Profase I es muy extensa, comprende cuatro etapas (leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis), donde se observa una transición morfológica gradual de una etapa a otra, caracterizado por el aumento del tamaño celular y nuclear, y la característica condensación de los cromosomas, dando al núcleo un aspecto vesiculoso. Espermatocitos en leptoteno se observan en los estados VIII, IX, y X, en zigoteno se observan en los estados XI y XII, espermatocitos en paquiteno se observan en todos los estados desde el estado XIII, y en diploteno

y diacinesis en el estado XIII del ciclo; donde se observan figuras de división meiótica por ser el estado donde éstas ocurren.

La espermiogénesis de las espermátidas consta de 16 etapas, de las cuales las primeras 13 se corresponden con los 13 estados del ciclo del epitelio seminífero, mientras que las etapas 14, 15 y 16 coexisten junto con las primeras etapas de la espermiogénesis [18].

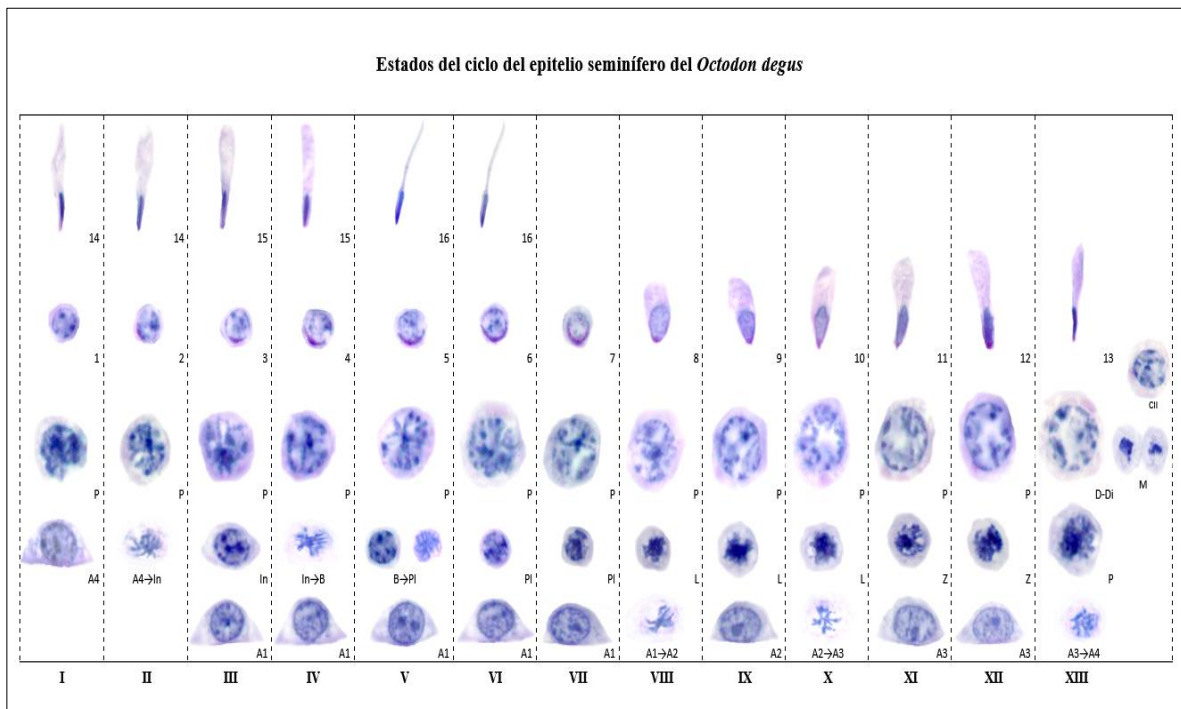


FIGURA 4.12 Mapa del ciclo del epitelio seminífero del *Octodon degus*.

Cada columna indica los tipos celulares que conforman una asociación celular (estado de ciclo). Cada asociación celular se sucede una a la otra (I-XIII), constituyendo el ciclo del epitelio seminífero. A1-A4, In, B= espermatozonas tipo A diferenciadas, Intermedias, tipo B; PL, L, Z, P, D-Di= espermatozonas primarias en preleptoteno, leptoteno, zigoteno, paquíteno y diploteno-diacinesis; M= meiosis; CII= espermatozono secundario; 1-16= etapas de la espermiogénesis; las flechas indican divisiones sincrónicas de espermatozonas.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

5.1.- DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA

5.1.1.- Línea germinal

El análisis de la línea germinal presente en el epitelio seminífero de tres grupos de *Octodon degus* de diferente edad mostró que en los animales jóvenes se observó la presencia de un porcentaje considerable de túbulos seminíferos con la línea germinal incompleta, caracterizados generalmente por la falta de células germinales más diferenciadas (espermátidas redondas y elongadas). Por su parte en el grupo de animales adultos-jóvenes se observaron en su gran mayoría túbulos con la línea germinal completa, siendo el porcentaje de túbulos normales significativamente mayor a los otros dos grupos estudiados, mientras que en los animales de edad avanzada se observó un mayor porcentaje de túbulos con algún grado de depleción celular en comparación con los animales de 6 meses.

El aumento de túbulos seminíferos con la línea germinal depletada en *Octodon degus* de edad avanzada coincide con los resultados obtenidos por Bustos-Obregón y Ramírez [36], quienes concluyeron que la disminución de poblaciones celulares en animales viejos es resultado de la pérdida fisiológica de células junto con una disminución de la actividad proliferativa de las espermatogonias. El aumento en el porcentaje de túbulos seminíferos con la línea germinal depletada en animales viejos también se ha observado en otros roedores; estudios en hámster [50] indicaron que en animales viejos se observa una disminución significativa en el porcentaje de secciones tubulares con un epitelio normal, de modo que el número de túbulos con depleción de células germinales es mucho mayor que en animales jóvenes.

5.1.2.- Mediciones tubulares

Las medidas del diámetro de los túbulos seminíferos son parámetros que permiten la evaluación testicular, puesto que se considera que existe una relación positiva entre el diámetro tubular y la actividad espermatogénica testicular [7]. En los tres grupos de animales estudiados se

observó que el promedio del diámetro tubular es significativamente superior en los animales adultos-jóvenes, seguido por los animales jóvenes, mientras que el menor promedio de diámetro tubular se observó en los túbulos seminíferos de animales de edad avanzada. Resultados similares se encontraron con respecto al promedio de la altura epitelial, así en los animales adultos-jóvenes se observó el mayor promedio de altura epitelial, seguido por el grupo de animales jóvenes, y en los animales de edad avanzada se determinó el menor promedio de altura epitelial.

La medición del lumen tubular evidenció la existencia de diferencias significativas entre los tres grupos de animales, los resultados indicaron que en los animales de edad avanzada los túbulos seminíferos presentan un lumen tubular de mayor diámetro en comparación a los animales jóvenes y adultos-jóvenes.

Las mediciones realizadas en túbulos seminíferos sugieren la presencia de un patrón que se correlaciona con la funcionalidad testicular, los resultados obtenidos en animales jóvenes y adultos-jóvenes no difieren en gran magnitud, pero se observan mayores diámetros en los animales en periodo reproductivo. Los resultados de las mediciones tubulares obtenidas en el grupo de animales de edad avanzada se justifican con las observaciones de la línea germinal presente en los túbulos seminíferos, dado que se observa que en los animales de edad avanzada hay un mayor porcentaje de túbulos con la línea germinal depletada, lo que a su vez se traduce en una disminución del diámetro tubular, de la altura del epitelio seminífero y un coincidente aumento del lumen tubular. Estas alteraciones son una consecuencia directa de la pérdida de células germinales en animales viejos, que en fenómenos fisiológicos como la espermatogénesis se produce por la apoptosis celular [51] y por la alteración de la proliferación celular [34].

5.1.3.- Mediciones nucleares

Las mediciones del diámetro nuclear indicaron que no existen diferencias mayormente significativas entre los tres grupos de animales estudiados, en el tamaño nuclear de los espermatoцитos en preleptoteno, espermatoцитos en paquiteno y espermátidas redondas.

Por su parte las espermatogonias tipo A poseen un núcleo ovalado, por lo que se midió el diámetro mayor (largo) y el menor (ancho/alto). Se evidenció que entre los tres grupos de

animales no se observaron diferencias significativas en el diámetro nuclear mayor, sin embargo, las mediciones indicaron que las espermatogonias A identificadas en los animales de 6 meses se caracterizaban por tener un núcleo más “ancho/alto”, es decir, un núcleo menos ovalado y más redondeado. Los resultados de las mediciones del diámetro nuclear mayor en las espermatogonias tipo A difieren a los resultados que obtuvieron en este roedor Potocnjak y Bustos-Obregón [18], quienes describieron a las espermatogonias A como células con un núcleo ovalado con un diámetro nuclear mayor inferior a los resultados obtenidos en este estudio. Esto se podría explicar en base a que estos investigadores caracterizaron espermatogonias A₀ (también llamadas células madre de espermatogonias) y espermatogonias tipo A, y según su descripción citológica las espermatogonias tipo A₀ poseen un núcleo aproximadamente esférico. En cambio en este estudio las mediciones nucleares se realizaron en espermatogonias tipo A en general, y no se caracterizaron morfológicamente espermatogonias A₀, o dicho de otro modo células madre de espermatogonias, puesto que la identificación y diferenciación de los distintos tipos de espermatogonias A es bastante confuso [12].

5.2.- RECUENTO CELULAR

Los resultados indicaron que el mayor promedio de células germinales y de células de Sertoli se observó en el grupo de animales adultos-jóvenes. Resultados levemente inferiores se obtuvieron en el grupo de animales jóvenes, donde el número de espermatogonias tipo A no varió significativamente en comparación con los animales adultos-jóvenes. Por su parte, en el grupo de animales de edad avanzada se observó una disminución notoriamente significativa en el recuento de células germinales (recuentos crudos y corregidos), lo cual es concordante con los resultados que obtuvieron Bustos-Obregón y Ramírez [36], quienes observaron una disminución en el recuento de células germinales en túbulos seminíferos en el estado VI del ciclo de *Octodon degus* de 5 años. La disminución en el número de células germinales en animales seniles también ha sido observada en otros roedores como el hámster [38] la rata [35], así como también este fenómeno se observa en humanos [37]. Además, según los resultados obtenidos, se observó una disminución significativa en el número de células de Sertoli en el grupo de animales de edad avanzada. La pérdida de células germinales en animales viejos también se asocia a una disminución en el número

de células de Sertoli, debido a que estas cumplen una función de soporte a las células germinales presentes en el epitelio seminífero [52]. De esta forma la disminución en el recuento de células germinales también se relacionaría a la pérdida de estas células somáticas.

Bustos-Obregón y Ramírez [36] determinaron el rendimiento de la meiosis de espermatocitos en *Octodon degus* seniles (5 años). Sus resultados indican un alto porcentaje de pérdida de espermátidas redondas en animales viejos, mientras que en este estudio el porcentaje de espermátidas perdidas es menor. Lo anterior se explicaría debido a la heterogeneidad de la muestra, puesto que el grupo de animales abarcaba sujetos entre 2 a 6 años. Aun así se determinó que en contraste con los animales jóvenes y adultos-jóvenes el grupo de edad avanzada mostró un mayor porcentaje de espermátidas perdidas, y por consiguiente un menor rendimiento de la meiosis.

La actividad espermatogénica se ve afectada por el proceso del envejecimiento. Los resultados observados en los animales de edad avanzada son significativamente diferentes a los que se aprecian en animales jóvenes. Los procesos de proliferación y apoptosis celular se ven alterados notoriamente en los animales viejos [34, 35, 36, 50, 51, 53], manifestándose en cambios morfológicos y cambios cuantitativos en la composición normal de la celularidad presente en el epitelio seminífero. En animales de edad avanzada la pérdida de células germinales es consecuencia directa de la disminución de la proliferación espermatogonial y el aumento de la apoptosis celular, traduciéndose en la depleción de la línea germinal, disminución del diámetro tubular, disminución de la altura epitelial y el aumento del lumen tubular. Sin embargo, resta por comprobar si esta disminución se debe a una menor actividad proliferativa o a un aumento en la muerte celular.

5.3.- CARACTERIZACIÓN DE LA FASE DE PROLIFERACIÓN ESPERMATOGONIAL

Las células involucradas en la fase de proliferación de la espermatogénesis son las espermatogonias tipo A. Estudios realizados en rata por Clermont y Bustos-Obregón [8] permitieron identificar cinco tipos de espermatogonias A: A₀, A₁-A₄. Las espermatogonias A₀ se consideraron “células madre de reserva”, se caracterizaron como células individuales o pares de células que estaban presentes en todos los estados del ciclo del epitelio seminífero. Las figuras mitóticas rara vez se observan en estas células, por lo que se consideraron como células madre de

reserva que no se dividen a menos que el epitelio fuese dañado por agentes tóxicos. Por su parte el “pool” activo de células que proliferan está compuesto por las espermatogonias A_1 - A_4 , donde el periodo de “amplificación gonial” comprende mitosis de estos tipos de espermatogonias A. De acuerdo a este modelo, las espermatogonias A_4 se dividen para formar nuevas espermatogonias A_1 (auto-renovarse) o para dar lugar a espermatogonias In (diferenciación). Por otra parte, estudios realizados en ratas por Huckins [9] y en ratón por Oakberg [10] en túbulos seminíferos montados “*in toto*”, identificaron espermatogonias indiferenciadas que a su vez se clasifican en espermatogonias A_s , A_{pr} y A_{al} de acuerdo a su disposición topográfica cerca de la membrana basal del túbulo seminífero. Las espermatogonias A_s son definidas como células madres [8, 9, 54], las espermatogonias A_{pr} y A_{al} como células proliferantes, y las espermatogonias A_1 - A_4 , In y B como células que se diferencian. Las espermatogonias indiferenciadas no siguen el patrón de división sincrónico que muestran las espermatogonias diferenciadas (A_1 -B). Se distribuyen a lo largo del epitelio seminífero y proliferan en determinados estados del ciclo [55], para posteriormente diferenciarse en espermatogonias A_1 que entran en la fase S del ciclo celular y dan lugar a espermatogonias A_2 , que luego originan las A_3 , A_4 , In y B sucesivamente. En contraste con las espermatogonias indiferenciadas, las espermatogonias diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , Intermedia y B) se dividen de una manera sincronizada en estados específicos del ciclo del epitelio seminífero [8, 55].

Ambos modelos que explican la fase de proliferación espermatogonial indican la existencia de espermatogonias A diferenciadas (A_1 - A_4) que proliferan en determinados estados del ciclo del epitelio seminífero. Si bien ambos modelos de renovación espermatogonial muestran diferencias [12], concuerdan en la existencia de un patrón de divisiones sincrónicas circunscritas a estados específicos del ciclo, como consecuencia de la presencia de puentes intercelulares entre estas células germinales producto de citocinesis incompleta [17]. Los puentes permiten compartir productos génicos entre las células de un clon. Si se comparten productos de los genes en las células adyacentes, las actividades celulares se sincronizan, lo que resulta en un desarrollo sincronizado [56].

Luego de la proliferación de espermatogonias indiferenciadas, estas se diferencian en espermatogonias A_1 , las cuales experimentan cinco divisiones mitóticas hasta la formación de espermatogonias tipo B [12]. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se determinó

la frecuencia de aparición de secciones circulares de túbulos seminíferos con presencia de figuras mitóticas de espermatogonias. Se observaron “peaks” en la frecuencia de aparición que se manifestaron de igual manera en los tres grupos de animales analizados, las figuras mitóticas que corresponderían a espermatogonias tipo A se observaron con mayor frecuencia en túbulos seminíferos en los estados VIII, X, XIII y II mientras que figuras mitóticas de espermatogonias In fueron visualizadas en túbulos en el estado IV, y en el estado V se observaron espermatogonias tipo B en mitosis. Se observó que la frecuencia de aparición de túbulos con figuras mitóticas de espermatogonias es menor en los estados IV y V, lo cual podría asociarse a la menor frecuencia en que aparecen en los cortes histológicos y a la menor duración de dichos estados [18]. La caracterización de la fase proliferativa realizada tanto en ratas como en ratón [9, 10, 55] se realizó en base al estudio de túbulos seminíferos montados “*in toto*” de animales tratados con timidina tritiada lo que permitió identificar células en la fase S del ciclo celular. En cambio en este estudio la caracterización se realizó en base al estudio de la histología testicular determinando la frecuencia con que aparecen figuras mitóticas de espermatogonias en túbulos seminíferos, los resultados obtenidos permitirían estimar los estados del ciclo del epitelio seminífero del *Octodon degus* en donde ocurren las divisiones mitóticas sincrónicas de las espermatogonias diferenciadas (A₁-A₄). Si bien estas células no se pueden diferenciar en base a su morfología, se postula que podrían diferenciarse entre sí al determinar en qué estado del ciclo están presentes [12] coincidiendo además con el estado en el cual proliferan.

5.4.- CICLO DEL EPITELIO SEMINÍFERO DEL *OCTODON DEGUS*

El ciclo del epitelio seminífero del *Octodon degus* consta de 13 asociaciones celulares diferentes [18]. Dichas asociaciones se organizan gráficamente en un mapa del ciclo compuesto por filas y columnas de células germinales, donde en cada alineación vertical (columna) se sitúan las células germinales más inmaduras en la parte inferior del mapa y a las más maduras en la parte superior [7]. El proceso de la espermatogénesis se interpreta en un mapa de ciclo al observar horizontalmente de izquierda a derecha la progresión de las células germinales presentes en las filas del mapa.

El método histoquímico del ácido peryódico-Schiff (PAS) permite identificar los distintos estados del ciclo en base a los cambios que experimenta el sistema acrosómico de las espermatidas en la fase de la espermiogénesis. Este método histoquímico resultó ser fundamental para la identificación de las distintas asociaciones celulares y la re-elaboración del mapa del estado del ciclo seminífero del *Octodon degus* con fotomicrografías.

De esta forma el envejecimiento afecta la actividad espermatogénica, manifestándose cambios en la morfología de los túbulos seminíferos que se relacionan con una disminución en el número de las poblaciones celulares. Dichos cambios se explicarían en base a la alteración de procesos de proliferación celular y apoptosis.

La caracterización de la fase de proliferación espermatogonial realizada en base a la determinación de “peaks” en la frecuencia de aparición de figuras mitóticas de espermatogonias asociadas a un determinado estado de ciclo, podrían considerarse como una estimación de los estados específicos del ciclo en donde ocurren las divisiones sincrónicas de las espermatogonias. Sin embargo, la interpretación de estos resultados debería sustentarse en un estudio más amplio que contemple un mayor número de muestras, en conjunto con la adición de otras metodologías analíticas como lo es la determinación del índice mitótico presente en cada estado de ciclo en particular, lo cual permitiría realizar un análisis más detallado. Aun así los resultados obtenidos en este estudio podrían ser considerados en futuras investigaciones centradas en el periodo de proliferación espermatogonial en *Octodon degus* con la inclusión de otros métodos de análisis.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

La disminución del diámetro tubular, altura epitelial y el aumento del lumen tubular observada en animales de edad avanzada se asociaría a un menor recuento celular y a la disminución de la actividad espermatogénica.

El aumento del diámetro tubular, altura epitelial y reducción del lumen tubular observada en animales jóvenes se relacionaría con una mayor celularidad y una mayor actividad espermatogénica.

El mayor porcentaje de túbulos seminíferos con la línea germinal depletada observada en animales de edad avanzada es coincidente con la disminución del recuento de células germinales y de Sertoli, y se vincularía con una disminución en la actividad espermatogénica.

Las variaciones morfológicas descritas reflejarían la actividad espermatogénica del *Octodon degus*, y representarían el efecto que tiene el envejecimiento sobre la espermatogénesis.

Los “peaks” en la frecuencia de aparición de mitosis espermatogonial, indicarían una estimación de los estados del ciclo del epitelio seminífero donde se producen las divisiones sincrónicas de los diferentes tipos de espermatogonias.

La fase de proliferación espermatogonial en *Octodon degus* está caracterizada por divisiones sincrónicas de espermatogonias diferenciadas, así las espermatogonias A₁ se dividirían en el estado VIII, A₂ en X, A₃ en XIII, A₄ en II, In en IV, y B en el estado V.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gartner, L.; y Hiatt, J. «Sistema Reproductor Masculino» En: *Texto Atlas de Histología*, de L. Gartner y J. Hiatt, 463-483. México DF: Interamericana McGraw Hill, 2002.
2. Arrau, J.; Bustos-Obregón, E.; Hoecker, G.; y Ramos, A. *Biología de la Reproducción Animal*. Santiago: Andrés Bello, 1981.
3. Ross, M.; y Pawlina, W. «Aparato Genital Masculino» En: *Texto y Atlas a Color con Biología Celular y Molecular*, de M. Ross y W. Pawlina, 782-826. Buenos Aires: Panamericana, 2007.
4. Redgrove, K.; y McLaughlin, E. «The role of the immune response in Chlamydia trachomatis infection of the male genital tract: a double-edged sword». Figura.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4209867/figure/F2/>.
5. Kerr, J.; Loveland, K.; O'Bryan, M.; y de Kretser, D. «The Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms» En: *The Physiology of Reproduction*, de E. Knobil y J. Neill, 827-920. New York: Elsevier Academic Press, 2006.
6. Sharma, R.; y Agarwal, A. «Spermatogenesis: An Overview» En: *Sperm Chromatin*, de A. Zini y A. Agarwal, 19-44. New York: Springer, 2011.
7. Russell, L. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater: Cache River Press, 1990.

8. Clermont, Y.; y Bustos-Obregón, E. «Re-examination of Spermatogonial Renewal in the Rat by Means of Seminiferous Tubules Mounted “*in toto*”» *Developmental Dynamics*, 1968: 237-247.
9. Huckins, C. «The Spermatogonial Stem Cell Population in Adult Rats. I. Their Morphology, Proliferation and Maturation» *The Anatomical Record*, 1971: 533-557.
10. Oakberg, E. «Spermatogonial Stem-Cell Renewal in the Mouse» *The Anatomical Record*, 1971: 515-531.
11. Huckins, C., y Oakberg, E. «Morphological and Quantitative Analysis of Spermatogonia in Mouse Testes Using Whole Mounted Seminiferous Tubules. I. The Normal Testes» *The Anatomical Record*, 1978: 519-527.
12. de Rooij, D.; y Russell, L. «All you Wanted to Know About Spermatogonia but were Afraid to Ask» *Journal of Andrology*, 2000: 776-798.
13. Huckins, C.; y Kopriva, B. «A Technique for the Radioautography of Germ Cells in Whole Mounts of Seminiferous Tubules» *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1969: 848-851.
14. Clermont, Y.; y Perey, B. «The Stages of the Cycle of the Seminiferous Epithelium of the Rat: Practical Definitions in PA-Schiff-hematoxylin and Hematoxylin-eosin Stained Sections» *Revue Canadienne de Biologie/Editee par l'Universite de Montreal*, 1957: 451-462.

15. Leblond, C.; y Clermont, Y. «Spermiogenesis of Rat, Mouse, Hamster and Guinea Pig as Revealed by the “Periodic Acid-fuchsin Sulfurous Acid” Technique» *Developmental Dynamics*, 1952: 167-215.
16. Oakberg, E. «A Description of Spermatogenesis in the Mouse and its Use in Analysis of the Cycle of the Seminiferous Epithelium and Germ Cell Renewal» *Developmental Dynamics*, 1956: 391-413.
17. Weber, J.; y Rusell, L. «A Study of Intercellular Bridges During Spermatogenesis in the Rat» *Developmental Dynamics*, 1987: 1-24.
18. Potocnjak, P.; y Bustos-Obregón, E. «Espermatogénesis y Duración del Ciclo del Epitelio Seminífero en Octodon degus Molina» *Medio Ambiente*, 1977: 100-111.
19. Amory, J.; y Bremner, J. «Regulation of Testicular Function in Men: Implications for Male Hormonal Contraceptive Development» *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2003: 357-361.
20. Junqueira, L.; y Carneiro, J. «Métodos de Estudio em Histologia» En: *Histologia Básica: Texto e Atlas*, de L. Junqueira y J. Carneiro, 2-19. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
21. Bacha, W.; y Wood, L. «Aparato Reproductivo del Macho» En: *Atlas Color de Histología Veterinaria*, de W. Bacha y L. Wood, 205-222. Buenos Aires: Intermédica, 2001.
22. Bustos-Obregón, E. «On Sertoli Cell Number and Distribution on Rat Testis» *Archives de Biologie*, 1970: 81-99.

23. Mruk, D.; y Cheng, C. «Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium During Spermatogenesis» *Endocrine Reviews*, 2004: 746-806.
24. O'Donnell, L.; Stanton, P.; de Kretser, D. «Endocrinology of the Male Reproductive System and Spermatogenesis». Figura.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279031/bin/endocrin-male-reprod_etx-male-ch1-fig11.jpg.
25. Johnson, L.; Blanchard, T.; Varner, D.; y Scrutchfield, W. «Factors Affecting Spermatogenesis in the Stallion» *Theriogenology*, 1997: 1199-1216.
26. Wang, C.; McDonald, V.; Leung, A.; Superlano, L.; Berman, N.; Hull, L.; y Swerdloff, R. «Effect of Increased Scrotal Temperature on Sperm Production in Normal Men» *Fertility and Sterility*, 1997: 334-339.
27. Watanabe, T.; Ebara, S.; Kimura, S.; Maeda, K.; Watanabe, Y.; Watanabe, H.; y Nakano, L. «Maternal Vitamin B12 Deficiency Affects Spermatogenesis at the Embryonic and Immature Stages in Rats» *Congenital Anomalies*, 2007: 9-15.
28. Morales, E.; Pastor, L.; Horn, R.; Zuasti, A.; Ferrer, C.; Calvo, A.; Santamaría, L.; y Canteras, M. «Effect of Ageing on the Proliferation and Apoptosis of Testicular Germ Cells in the Syrian Hamster *Mesocricetus auratus*» *Reproduction, Fertility and Development*, 2003: 89-98.

29. Alvarado, A.; y Salazar, A. «Análisis del Concepto de Envejecimiento» *Gerokomos*, 2014: 57-62.
30. Cutler, R. «Human Longevity and Aging: Possible Role of Reactive Oxygen Species» *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1991: 1-28.
31. Nieschlag, E.; Freischem, C.; Wickings, E.; y Schurmeyer, T. «A New Look at Testicular Function in Old Age» En: *Recent Advances in Male Reproduction Molecular Basis and Clinical Implications*, de R. D'Agata, P. Lipsett y Van der Molen, 145-149. New York: Raven Press, 1983.
32. Midzak, A.; Chen, H.; Papadopoulos, V.; y Zirkin, B. «Leydig Cell Aging and the Mechanisms of Reduced Testosterone Synthesis» *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009: 23-31.
33. Mahmoud, A.; Goemaere, S.; El-Garem, Y.; Van Pottelbergh, I.; Comhaire, F.; y Kaufman, J. «Testicular Volume in Relation to Hormonal Indices of Gonadal Function in Community-dwelling Elderly Men» *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003: 179-184.
34. Pastor, L.; Zuasti, A.; Ferrer, C.; Bernal-Mañas, C.; Morales, E.; Beltrán-Frutos, E.; y Seco-Rovira, V. «Proliferation and Apoptosis in Aged and Photoregressed Mammalian Seminiferous Epithelium, with Particular Attention to Rodents and Humans» *Reproduction in Domestic Animals*, 2011: 155-164.
35. Salama, M.; Tsuji, M.; Tamura, M.; y Kagawa, S. «Impact of Aging and Diabetes Mellitus on the Expression of the Proliferating Cell Nuclear Antigen in Rat Testicular Tissue» *Archives of Andrology*, 1998: 95-107.

36. Bustos-Obregón, E.; y Ramírez, O. «Ageing and Testicular Function in *Octodon degus*» *Andrología*, 1997: 319-326.
37. Kimura, M.; Itoh, N.; Takagi, S.; Sasao, T.; Takahashi, A.; Masumori, N.; y Tsukamoto, T. «Balance of Apoptosis and Proliferation of Germ Cells Related to Spermatogenesis in Aged Men» *Journal of Andrology*, 2003: 185-191.
38. Morales, E.; Horn, R.; Pastor, L.; Santamaria, L.; Pallarés, J.; Zuasti, A.; Ferrer, C.; Canteras, M. «Involution of Seminiferous Tubules in Aged Hamsters: An Ultrastructural, Immunohistochemical and Quantitative Morphological Study» *Histology and Histopathology*, 2004: 445-455.
39. Lee, T. «*Octodon degus*: A Diurnal, Social, and Long-lived Rodent» *ILAR Journal*, 2004: 14-24.
40. Muñoz, A.; y Yáñez, J. *Mamíferos de Chile*. Valdivia: Cea Ediciones, 2009.
41. Visticot, M. *Un Nouvel Animal de Compagnie: l'octodon, Octodon degus (Doctoral Dissertation)*. Créteil: Université Paris-Est Créteil Val de Marne, 2002.
42. Contreras, L.; y Bustos-Obregón, E. «Anatomy of Reproductive Tract in *Octodon degus* Molina: A Nonscrotal Rodent» *Archives of Andrology*, 1980: 115-124.
43. Reynolds, T.; y Wright, J. «Early Postnatal Physical and Behavioural Development of *Degus* (*Octodon degus*) » *Laboratory Animals*, 1979: 93-100.

44. Colby, L.; Rush, H.; Mahoney, M.; y Lee, T. «Degu» En: *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, de M. Suckow, K. Stevens y R. Wilson, 1031-1051. San Diego: Academic Press/Elsevier, 2012.
45. Datiles, M.; y Fukui, H. «Cataract Prevention in Diabetic Octodon degus with Pfizer's Sorbinil» *Current Eye Research*, 1989: 233-237.
46. Rivera, D.; Inestrosa, N.; y Bozinovic, F. «On Cognitive Ecology and the Environmental Factors that Promote Alzheimer Disease: Lessons from Octodon degus (Rodentia: Octodontidae)» *Biological Research*, 2016: 1-10.
47. Sitzmann, B.; Brown, D.; Garyfallou, V.; Kohama, S.; Mattison, J.; Ingram, D.; Roth, G.; Ottinger, M.; y Urbanski, H. «Impact of Moderate Calorie Restriction on Testicular Morphology and Endocrine Function in Adult Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*)» *Age*, 2014: 183-197.
48. Grocock, C., y Clarke, J. «Photoperiodic Control of Testis Activity in the Vole, *Microtus agrestis*» *Journal of Reproduction and Fertility*, 1974: 337-347.
49. Abercrombie, M. «Estimation of Nuclear Population from Microtome Sections» *The Anatomical Record*, 1946: 239-247.
50. Bernal-Mañas, C.; Cortes, S.; Morales, E.; Horn, R.; Seco-Rovira, V.; Beltran-Frutos, E.; Ferrer, C.; Canteras, M.; y Pastor, L. «Influence of Histological Degree of Seminiferous Tubular Degeneration and Stage of Seminiferous Cycle on the Proliferation of Spermatogonia in Aged Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*)» *Andrologia*, 2014: 672-679.

51. Hikim, A.; Lue, Y.; Diaz-Romero, M.; Yen, P.; Wang, C.; y Swerdloff, R. «Deciphering the Pathways of Germ Cell Apoptosis in the Testis» *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2003: 175-182.
52. Johnson, L.; Thompson, D.; y Varner, D. «Role of Sertoli Cell Number and Function on Regulation of Spermatogenesis» *Animal Reproduction Science*, 2008: 23-51.
53. Wang, C.; Hikim, A.; Lue, Y.; Leung, A.; Baravarian, S.; y Swerdloff, R. «Reproductive Aging in the Brown Norway Rat is Characterised by Accelerated Germ Cell Apoptosis and is not Altered by Luteinizing Hormone Replacement» *Journal of Andrology*, 1999: 509-518.
54. de Rooij, D. «Stem Cells in The Testis» *International Journal of Experimental Pathology*, 1998: 67-80.
55. Huckins, C. «The Spermatogonial Stem Cell Population in Adult Rats. II. A Radioautographic Analysis of their Cell Cycle Properties» *Cell Tissue Kinet*, 1971: 313-334.
56. Lee, K.; Haugen, H.; Clegg, CH.; y Braun, R. «Premature Translation of Protamine 1 mRNA Causes Precocious Nuclear Condensation and Arrests Spermatid Differentiation in Mice» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995: 12451-12455.

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo procesador de tejidos

1. ETOH 80%	1 h 15'
2. ETOH 95% I	1 h 15'
3. ETOH 95% II	1 h 15'
4. ETOH 95% III	1 h 15'
5. Mezcla I	1 h 15'
6. Mezcla II	1 h 15'
7. Butanol I	8 h
8. Butanol II	8 h
9. Butanol III	8 h
10. Paraplast Plus I	10 h
11. Paraplast Plus II	10 h
12. Paraplast Plus III	11 h

Anexo 2: Protocolo de desparafinación e hidratación

1. Xilol	5 min.
2. Xilol	5 min.
3. Xilol	5 min.
4. Alcohol 100%	5 min.
5. Alcohol 100%	5 min.
6. Alcohol 100%	5 min.
7. Alcohol 95%	5 min.
8. Alcohol 95%	5 min.
9. Alcohol 80%	5 min.
10. Alcohol 70% con Li_2CO_3	5 min.
11. Alcohol 70%	5 min.
12. Agua destilada	5 min.
13. Agua destilada	5 min.

Anexo 3: Método Tricrómico de Arteta

1. Desparafinar e hidratar.
2. Hematoxilina de Harris por 75 seg.
3. Lavar en agua corriente por 10 min.
4. Lavar con agua destilada por 5 min.
5. Eritrosina-Orange G por 30 min.
6. Lavar en agua destilada por 5 min.
7. Ácido Fosfotúngstico 0,5% por 10 min.
8. Lavar en agua destilada por 5 min.
9. Azul de anilina por 75 seg.
10. Deshidratar y aclarar:
 - Alcohol 95% por 1 min.
 - Alcohol 95% por 1 min.
 - Alcohol 95% por 1 min.
 - Alcohol 100% por 5 min.
 - Alcohol 100% por 5 min.
 - Alcohol 100% por 5 min.
 - Xilol por 5 min.
 - Xilol por 5 min.
 - Xilol por 5 min.
10. Montaje en resina sintética (Entellán).

Anexo 4: Método Histoquímico PAS-Hematoxilina

Soluciones:

a) Ácido peryódico: 0,5 g de Ácido peryódico

100 ml de agua destilada

b) Reactivo de Schiff: 1 g de Fucsina básica

200 ml de agua destilada

20 ml de ácido clorhídrico 1 N

1 g de metabisulfito de sodio o potasio

0,2 g de carbón activado

Disolver 1 g de fucsina básica en 200 ml de agua destilada hirviendo, dejar enfriar a 50 °C, filtrar, agregar 20 ml de Ácido clorhídrico 1 N, enfriar a 25 °C agregar 1 g de metabisulfito de sodio o potasio, agregar 0,2 g de carbón activado. Dejar reposar la solución en la oscuridad durante 24 h. Se debe almacenar refrigerada en un frasco ámbar.

1. Desparafinar e hidratar.
2. Ácido peryódico por 10 min.
3. Lavar en agua corriente por 5 min.
4. Lavar en agua destilada por 5 min.
5. Reactivo de Schiff por 35-40 min.
6. Lavar en agua corriente por 10 min.
7. Hematoxilina de Harris por 10 min.
8. Virar en agua corriente por 10 min.
9. Deshidratar y aclarar

Alcohol 95% por 1 min.

Alcohol 95% por 1 min.

Alcohol 95% por 1 min.

Alcohol 100% por 5 min.

Alcohol 100% por 5 min.

Alcohol 100% por 5 min.

Xilol por 5 min.

Xilol por 5 min.

Xilol por 5 min.

10. Montaje en resina sintética (Entellán).