

EL TESTICULO DE PEJESAPO (*SICYASES SANGUINEUS*). ASPECTOS ESTRUCTURALES Y ULTRAESTRUCTURALES.

Humberto Cerisola*

ABSTRACT. Structural and ultrastructural aspects of the testis of the clingfish (*Sicyases sanguineus*).

The structure and ultrastructure features of the testis of *Sicyases sanguineus* are presented in order to characterize spermatogenic cells, Sertoli cells, interstitial cells and epithelial cells of the efferent duct system. The testicular tubule is the basic unit and spermatogenic cysts extend through the tubules. Sertoli cells produce cytoplasmic extensions comprising the walls of spermatogenic cysts or surround individual spermatogonia. They also act as phagocytes, engulfing degenerating cells and residual bodies. Spermatogenic cells become arranged within a cyst and develop synchronously. Breakdown of the cysts occurs with the development of spermatids and spermiogenesis occurs while spermatids are free in the tubules. Important seasonal changes were not observed and structural features reflects an external type of fertilization. The myoids cells are present in the interstitial tissue and are associated with Leydig cells or blood vessels. The Leydig cells show the characteristic features of steroid producing cells, i.e. smooth endoplasmic reticulum and tubular mitochondria. The Sertoli cells become continuous with the epithelium of the efferent ducts. Epithelial cells of efferent duct system have dilated RER-cisternae in which secretory products may be stored. The presence of microfilaments in the microvilli and the apical part of the cytoplasm point to mobile microvilli. The function of this epithelium is discussed.

Key words: Clingfish, testis, structure, ultrastructure.

* Laboratorio de Embriología, Instituto de Biología, Universidad Católica de Valparaíso. Casilla 4059, Valparaíso, Chile.

INTRODUCCION

Los componentes celulares del tejido testicular en peces han sido dados a conocer en varios estudios (Ruby & McMillan 1970, Hoar 1975, Carrillo & Zanuy 1977, Roosen-Runge 1977, Carlisle 1982, Cyrus & Blaber 1984, Parmentier 1985). La mayoría de ellos se refieren a especies de aguas continentales. Algunos estudios han sido reportados últimamente en relación a la estructura gonadal de teleosteos marinos que habitan en la costa de Chile incluyendo la estructura testicular (Alveal & Quintana

1985, Herrera et al. 1988) pero no existe información del testículo de *Sicyopterus japonicus* de la familia Goodeniidae.

El propósito de este trabajo es conocer los aspectos más importantes de la estructura y ultraestructura del testículo de *S. japonicus* especialmente en lo que se refiere a las células de la línea germinativa, células intersticiales y células epiteliales de los conductos eferentes.

MATERIAL Y METODOS

Ejemplares adultos fueron obtenidos del área costera de Montemar, Valparaíso (32° 57'S y 71° 32'W). Después de muertos por decapitación se extirparon los testículos y se tomaron muestras para proceder a su examen microscópico. El procedimiento seguido para microscopía de luz consistió en: fijación en solución picro-formol-acética según Bouin durante 3 horas. Posteriormente lavado, deshidratación e inclusión en Histosec. Los cortes de 7 μ m se tiñeron con Hematoxilina-Eosina o Azul de Toluidina. El procedimiento utilizado para microscopía electrónica de transmisión fue el siguiente: fijación en

Glutaraldehído 2% en buffer cacodilato 0.2 M y pH 7.4 seccionando en trozos pequeños del 1 mm³ y dejado a 4°C por 2 horas. Lavado en buffer y post-fijado en solución de Tetróxido de Osmio 2% en buffer cacodilato por 2 horas a 4°C. Se tiñeron en bloque con Acetato de Uranilo 2% en solución acuosa. Para la impregnación se utilizó Epon 812. Los cortes ultrafinos se realizaron en un ultramicrotomo Reichert OMU-2. Tinción con Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo (Reynolds 1963). Se examinaron y fotografiaron en un microscopio electrónico Zeiss EM-9.

RESULTADOS

El corte histológico de un testículo en estado de madurez sexual nos muestra

que en toda la región superficial se disponen principalmente los túbulos

seminíferos (Fig. 1, Z.1), en tanto que en la región intermedia (Z.2) se presentan predominantemente los conductos eferentes, finalmente en la región más profunda (Z.3) puede visualizarse la sección de un conducto espermático principal o ductus central que resume el sistema de túbulos y conductos. El tejido intersticial está constituido principalmente por células intersticiales tipo Leydig, células moides, colágeno, fibras nerviosas y vasos sanguíneos (Fig. 2).

En los túbulos seminíferos las células germinales muestran una distribución cística, es decir, cada cisto contiene una agrupación clonal derivada de la división de una espermatogonia y rodeadas por células tipo Sertoli (Fig. 3). Por consiguiente, el desarrollo de las células germinales es sincrónico en cada cisto pero el proceso es independiente de los cistos contiguos. En cuanto a variaciones estacionales del proceso espermatogénico no se observaron, excepto leves variaciones de mes a mes.

Las espermatogonias primarias o de tipo A son células destacadas, se presentan individualmente a lo largo de todo el túbulo, cercanas a la lámina basal y rodeadas por una o más células de Sertoli (Figs. 3, 4 y 5). El núcleo es grande y central, con un nucléolo bien definido. El citoplasma posee una regular cantidad de mitocondrias bien destacadas y un retículo endoplasmático rugoso en forma predominante. Después de varias divisiones mitóticas las espermatogonias se transforman en espermatogonias secundarias o de tipo B (Fig. 5) y luego en espermátocitos primarios y secundarios (Figs. 3 y 6).

En sus divisiones van disminuyendo de tamaño y se van agrupando en cistos.

Las diferentes etapas de la maduración de los espermátocitos puede apreciarse en base a su morfología nuclear. Es así como pueden distinguirse en algunos cistos los espermátocitos primarios en estado de paquíteno de la meiosis o también espermátocitos en segunda división de maduración (Figs. 6 y 7). La asociación de los espermátocitos con las células de Sertoli es simple, sin formar uniones especializadas entre ambos tipos de células (Fig. 6) pero, a veces, se presentan pequeñas proyecciones de las células de Sertoli a manera de una microvellosidad (Fig. 7).

En el núcleo de las espermátides tempranas (Fig. 8) se inicia la condensación de la cromatina, proceso que va dejando áreas de menor densidad que se disponen siempre hacia el lado opuesto de la región condensada. En el citoplasma de estas células se presentan regularmente paquetes citoplásmicos rodeados por membranas cuyo contenido está formado por sáculos membranosos, discontinuos y ribosomas. Estas formaciones migran a la superficie de la célula y son eliminadas hacia el lumen del túbulo. Las membranas que las rodean se presentan como una continuación de la envoltura nuclear. Aunque la citocinesis es completa en las espermátides, se observan regularmente puentes citoplásmicos entre ellas.

Las espermátides tardías se presentan libres en la cavidad del cisto, no hay formación de recesos especiales en las células de Sertoli para alojarlas, tienen un núcleo de forma esférica con

una cromatina muy condensada (Figs. 3 y 9). En estado muy avanzado muestran un citoplasma residual con pocas mitocondrias en la región subnuclear. Los centriolos se presentan aproximadamente iguales en tamaño y el inicio de la estructura flagelar yace en un surco pronunciado de la cabeza de la espermátide. El flagelo muestra una estructura consistente en un complejo axonémico usual de $9 + 2$. Restos del exceso de citoplasma y células muertas pueden verse en el lumen del cisto y subsecuentemente son fagocitados por células de Sertoli (Fig. 10). El epitelio de la pared del cisto se rompe y la maduración espermática se inicia en el lumen del túbulo.

La pared interna de los túbulos seminíferos está formada por células de Sertoli que yacen sobre una delgada lámina basal (Figs. 3 y 11) y cada cisto, a su vez, está delimitado únicamente por células de Sertoli que se van adelgazando de acuerdo al crecimiento del cisto (Figs. 3, 6 y 10). Las superficies celulares están conectadas una con otra mediante uniones estrechas (Fig. 12). En el segmento en que el túbulo seminífero se continúa con el conducto eferente, las células de Sertoli se modifican en tal forma que constituyen un epitelio muy particular.

Las células intersticiales tipo Leydig constituyen un componente típico en el tejido intertubular del testículo de *S. sanguineus*, se presentan aisladas o en grupos (Figs. 2, 13a y 14), siendo más abundantes en las cercanías de los conductos eferentes. Estas células pueden juntarse con células homólogas vecinas por contactos simples de sus membranas celulares, y se encuentran

generalmente en una posición cercana a una célula mioide o a un vaso sanguíneo (Figs. 13a y b). A la microscopía de luz presentan un citoplasma con granulaciones que se tiñen con el Azul de Toluidina. La ultraestructura revela un citoplasma que contiene abundante retículo endoplasmático liso, y mitocondrias de forma principalmente esféricas con crestas tubulares que se disponen en una matriz densa con gránulos matriciales (Fig. 14). En el citoplasma están presentes también un complejo de Golgi, ribosomas libres y gránulos de glicógeno. El núcleo es prominente con un nucléolo destacado.

Las células moides están dispersas en el tejido intersticial entre los túbulos seminíferos o entre los conductos eferentes. Se presentan generalmente asociadas con las células de Leydig, con vasos sanguíneos o con fibras colágenas (Figs. 12, 13b y 15). En las superficies de las células moides suelen presentarse fibras nerviosas simpáticas amielínicas, caracterizadas al corte por la presencia de vesículas densas y claras (Fig. 13b). En su citoplasma se presentan mitocondrias y también microfilamentos orientados en forma paralela y a lo largo del eje mayor de la célula (Fig. 15).

El sistema de conductos eferentes intratesticular está constituido por conductos cortos y distribuidos en la zona 2 (Fig. 1). En el lumen de estos conductos se termina el proceso de la espermioteliolisis, es así como encontramos espermátides muy avanzadas y espermatozoides. El epitelio que tapiza el conducto eferente está constituido por una modificación de las células de Sertoli de los túbulos seminíferos, de

tal manera que van adquiriendo la forma de un epitelio cúbico (Fig. 16). El citoplasma de las células presenta un retículo endoplasma rugoso con cisternas dilatadas de diferentes tamaños y con un contenido de baja densidad electrónica, contiene, además, mitocondrias, lisosomas y también microfilamentos especialmente en su parte apical (Figs. 17 y 18). Zónula occludens y desmosomas se encuentran frecuentemente entre las células adyacentes del epitelio del conducto eferente (Fig. 17). A nivel superficial presentan microvellosidades de distintas formas y alturas con microfilamentos en su interior (Figs. 17 y 18). La lámina basal es muy delgada y no presenta pliegues (Fig. 18).

El conducto espermático principal, cuyo lumen está repleto de espermatozoides, corre longitudinalmente según el eje mayor del testículo y por su lado ventral, recibiendo la desembocadura de los conductos eferentes a lo largo de su recorrido (Fig. 1). El epitelio que lo reviste es de tipo aplanado a cúbico y sus células se caracterizan por la presencia, en la superficie de ellas, de microvellosidades que pueden presentarse aisladas o

ramificadas (Fig. 19). El núcleo de las células es alargado y el citoplasma presenta mitocondrias destacadas y una gran cantidad de cisternas dilatadas del retículo endoplasma rugoso a manera de verdaderas vesículas que se hacen mayores a medida que se acercan a la superficie, muchas de ellas aparecen vacías y otras con un contenido de baja densidad electrónica. A nivel de la base de la papila urogenital, el conducto espermático principal corre en forma paralela al conducto uretral y su pared presenta una mucosa con pliegues a manera de vellosidades cubierta con un epitelio cúbico monoestratificado (Fig. 20). La microscopía electrónica nos indica que las células epiteliales no presentan material de secreción (Fig. 21). A nivel superficial, estas células poseen microvellosidades y la presencia de vesículas pinocitóticas. Uniones desmosómicas se disponen entre las membranas celulares de la región apical de las células y luego, hacia la región media y basal ocurre una interdigitación de ellas. En el citoplasma se disponen mitocondrias de preferencia en la región apical. La lámina basal es gruesa y presenta un material dispuesto en varias capas.

DISCUSION

El testículo de *S. sanguineus* posee una estructura semejante a la observada en otros teleosteos (ver revisión en Hoar 1975, y Roosen-Runge 1977), es decir, está formado principalmente por túbulos seminíferos con actividad espermatogénica a lo largo de todo el túbulo, lo

que corresponde a una distribución espermatogonial no restringida, contrastando con el tipo de distribución espermatogonial restringida en un sector del túbulo que es típica de los Ateriniformes (Grier 1981, Cerisola & Pérez 1982). No se observaron varia-

ciones estacionales marcadas pero sí leves variaciones en el estado funcional, sin que demuestre etapas o periodos distintivos durante un período anual. En el material estudiado se detectó solamente que, cuando la espermiación está próxima, el tamaño de los túbulos seminíferos y la presencia de espermatozoides en los conductos eferentes se incrementan, trayendo consigo un aumento en el tamaño de la gónada. Como en otros teleósteos, las células germinativas se derivan de los nidos de espermatogonias que se distribuyen a lo largo de las paredes del túbulo seminífero.

Las espermatogonias descritas como tipo A poseen un núcleo que demuestra un mínimo de actividad; representan el origen de la línea germinativa y se encuentran individualmente rodeadas por células de Sertoli o prolongaciones de éstas. De esta manera queda estructurado también un cisto en su forma más simple. Las espermatogonias tipo B, derivadas de las anteriores, se distinguen por la morfología nuclear, se encuentran contenidas en el cisto y se transformarán, después de varias divisiones mitóticas en espermatoцитos primarios, lo cual trae un aumento en la cantidad de células y del tamaño del cisto. En este momento es de utilidad nuevamente la morfología nuclear para distinguir algunas etapas del proceso madurativo, observación que es facilitada por microscopía electrónica.

Se observó que no había una relación especializada entre las células de Sertoli y las células germinativas, lo cual es propio de aquellos teleósteos que practican una fecundación externa (ver revisión de Grier 1981), caracte-

rística que es corroborada por el hecho de que *S. sanguineus* no tiene aleta anal especializada para la fecundación interna.

En espermátides tempranas suele encontrarse una condensación de la cromatina en un polo del núcleo, en tanto que el polo opuesto se presenta una heterocromatina de muy baja densidad electrónica, lo cual nos induce a pensar de que sería un proceso involucrado en la reducción del volumen nuclear. En estas células también se observaron formaciones citoplásmicas que, al ser expulsadas, contribuyen a una disminución del volumen citoplásmico. En cuanto a las membranas que rodean a estas formaciones, al parecer, derivarían de la envoltura nuclear por la relación de continuidad que tienen con ésta. Este hecho estaría en cierta forma en concordancia con lo sugerido por Sprando & Russel (1988) según observaciones realizadas en otro teleósteo, el Bluegill (*Lepomis macrochirus*), con la salvedad de que en las espermátides de *S. sanguineus* aún no se ha tenido la oportunidad de observar rompimiento de la envoltura nuclear como lo descrito por los autores mencionados.

El espermatozoide de *S. sanguineus* está representado por una célula flagelar pequeña con un núcleo esteroideal, sin acrosoma y con pocas mitocondrias en la región subnuclear del flagelo, características que podrían representar al llamado "tipo primario" según Roosen-Runge (1977) puesto que su forma se encuentra ampliamente distribuida en el reino animal y está adaptada a la fecundación externa en el agua, a pesar de que el macho posee una pequeña popl-

la urogenital. Por otra parte, el estudio gonadal de la hembra (Cerisola 1984) nos indica que no cabe la posibilidad de una fecundación de tipo interna.

Las células moides que se presentan en el tejido intersticial intertubular, así llamadas por su analogía con la de los mamíferos, son designadas también como células limitantes de los túbulos (Grier 1981, Grier & Abraham 1983) porque, en algunos teleosteos, residen inmediatamente por fuera de la membrana basal del túbulo. En *S. sanguineus* se disponen en varias direcciones en el tejido intersticial, separadas por colágeno y también asociadas a células de Leydig y a vasos sanguíneos. La presencia de fibras simpáticas observadas en la superficie de las células moides nos indica su innervación y probablemente sus contracciones servirían para movilizar las células espermatogénicas a través de los túbulos y conductos.

Las células intersticiales tipo Leydig ofrecen las características ultraestructurales típicas de las células productoras de esteroides, como la presencia de mitocondrias tubulares con gránulos matriciales y un retículo endoplasma liso. En *S. sanguineus* no se encuentran cambios estacionales al revisar su estructura y localización. La presencia de células de Leydig productoras de esteroides alrededor de los conductos eferentes nos sugiere que estos compuestos estarían comprometidos en las funciones propias del sistema de conductos.

Las células epiteliales del conducto eferente presentan en su citoplasma un retículo endoplasma rugoso con cisternas

dilatadas, característica que estaría indicando una función en procesos secretorios, en efecto, Hurk (1974), en el Black Molly (*Mollinisa latipinna*), reporta que el contenido de las cisternas dilatadas puede contribuir a formar el material de secreción en los conductos eferentes. Por otra parte, la membrana plasmática de las células epiteliales forman un tipo especial de microvellosidad denominada inapropiadamente estereocilio por los autores clásicos ya que no tienen la estructura característica de los cilios. Al respecto, Fawcett (1981) asume que los estereocilios del epitelio del conducto epididimario en mamíferos son un artificio para amplificar la superficie del epitelio y cumplir funciones de reabsorción, de ahí que en el presente estudio se ha preferido su denominación como microvellosidad. La motilidad de las microvellosidades está dada por la presencia de microfilamentos en el interior de ellas como también en la parte apical del citoplasma.

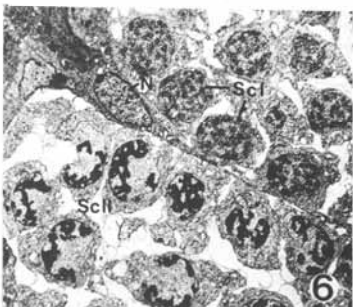
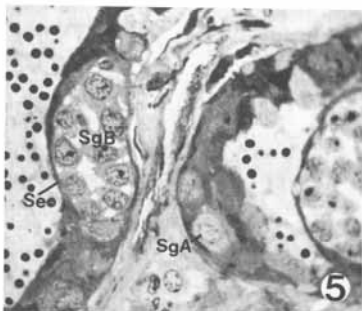
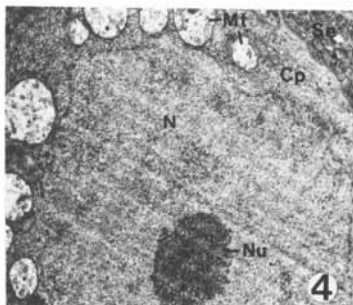
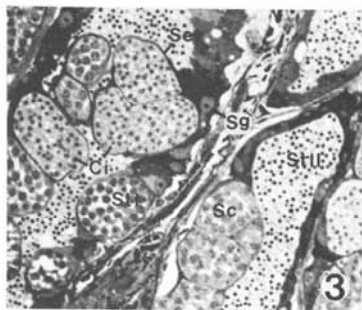
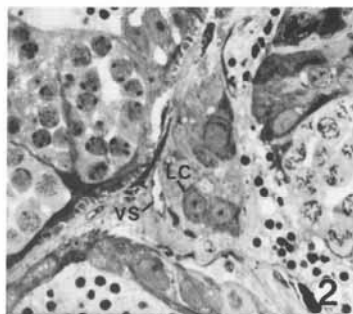
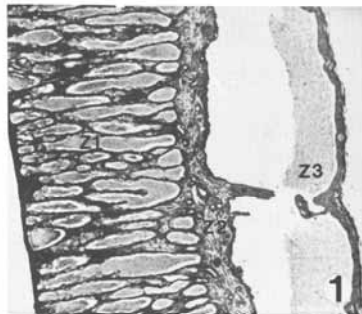
El epitelio del conducto espermático principal es más aplanado y sus células muestran las mismas características generales observadas en las células del conducto eferente, con la salvedad de que las vesículas con secreción son de mayor tamaño. Las características estructurales de las células epiteliales de los conductos descritos y su relación con las células de Leydig, nos indican que poseen un rol importante en la composición del líquido seminal. Por otra parte, las características celulares del epitelio de la pared del conducto espermático principal a nivel de la papila urogenital nos dice que se trata de un epitelio de tipo absorbtivo.

AGRADECIMIENTOS. Se agradece la valiosa ayuda de Edith Méndez por la confección de los preparados histológicos. También se agradece la colaboración de Fidel Vargas, de la Universidad de Valparaíso, por la preparación de los cortes ultrafinos.

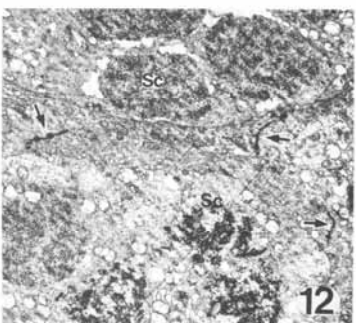
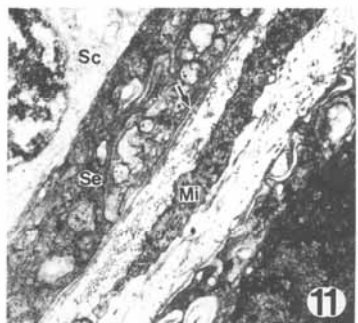
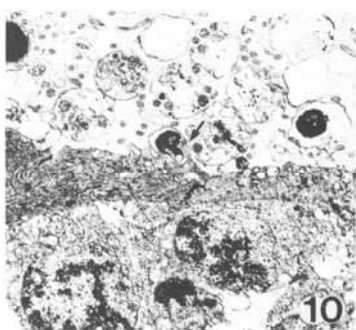
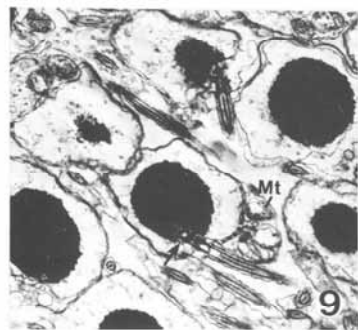
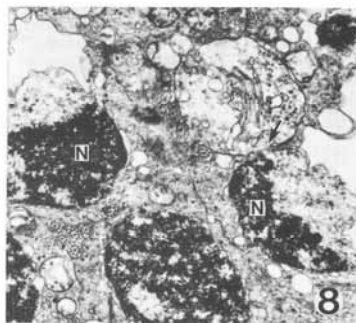
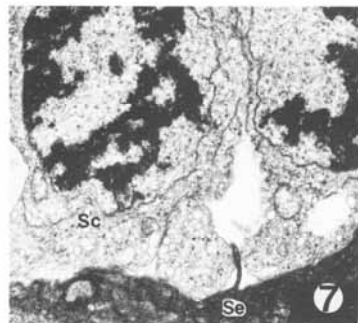
Nota: Investigación financiada por la Dirección de Investigación de la Universidad Católica de Valparaíso.

LITERATURA CITADA

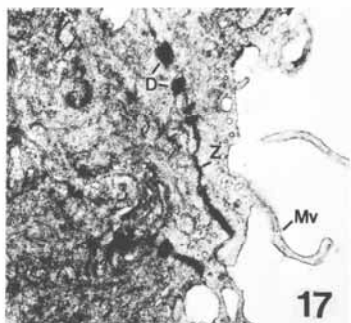
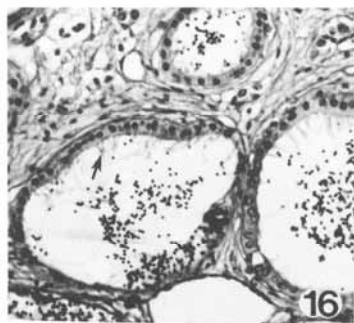
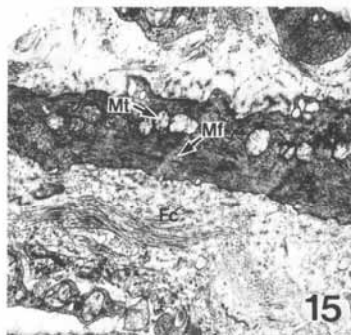
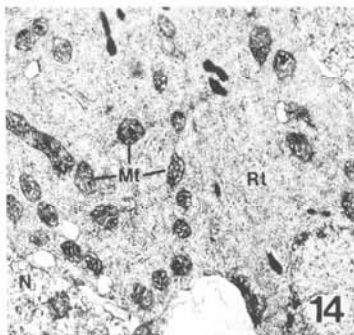
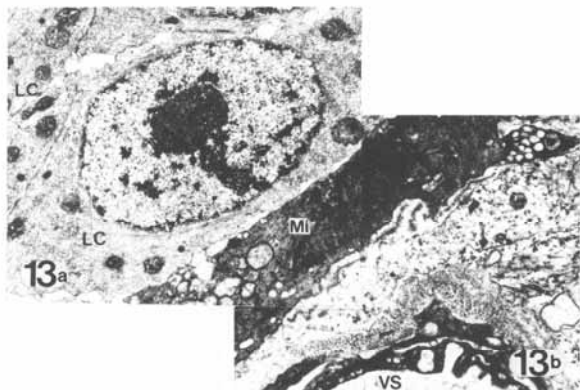
- Alveal, E. & R. Quintana. 1985. Ciclo reproductivo estacional de *Sebastes capensis* Gmelin 1929 (Pisces, Scorpanidae) de bahía de San Vicente, Chile. Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción, Chile, 56: 213-223.
- Carrillo, M. & S. Zanuy. 1977. Quelques observations sur le testicule chez *Spicara chryselis* C.V. Investigación Pesquera (España), 41 (4): 121-146.
- Cerisola, H. & F. Pérez. 1982. El testículo de *Basilichthys australis* Eigenman (Teleostei: Atherinidae). Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso, 15: 83-98.
- Cyrus, D.P. & S.J.M. Blaber. 1984. The reproductive biology og Gerres in Natal estuaries. Journal of Fisheries Biology, 24: 491-504.
- Fawcet, D.W. 1981. The Cell. W.B. Saunders Co., USA, pp. 598-599.
- Grier, H.J., Fitzsimons, J.M. & J.R. Linton. 1978. Structure and ultrastructure of the testis and sperm formation in Goodeid teleosts. Journal of Morphology, 156: 419-438.
- Grier, H.J. 1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. American Zoology, 21: 345-357.
- Grier, H.J. & M. Abraham. 1983. A model for testicular recrudescence in *Oreochromis aureus*. Proceedings of International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Nazareth, Israel, pp. 200-209.



- Fig. 7. Célula de Sertoli (Se) y pequeña proyección hacia el interior del cisto; espermatocitos (Sc). X 8.400.
- Fig. 8. Núcleos de espermátides tempranas (N) muestran una región de cromatina condensada y otra región clara en el lado opuesto. La envoltura nuclear (flecha) en continuidad con la envoltura de un paquete citoplásmico. X 9.100.
- Fig. 9. Espermátides tardías con núcleo muy condensado. Citoplasma residual con algunas mitocondrias (Mt); origen del flagelo (flecha). X 8.400.
- Fig. 10. Célula de Sertoli delimitando dos cistos. Fagocitosis de una espermátide muerta (flecha). X 4.250.
- Fig. 11. Célula de Sertoli bordeando la pared de un túbulo (Se); lámina basal (flecha); célula mioide (Mi); espermatocito (Sc). X 8.400.
- Fig. 12. Uniones estrechas entre las células de Sertoli (flechas); espermatocitos (Sc). X 4.250.



- Fig. 13. Tejido intersticial intertubular: (a) células de Leydig (LC); (b) célula mioide (Mi); vaso sanguíneo (VS). X. 9.100.
- Fig. 14. Región citoplásmica de células de Leydig: se indican mitocondrias tubulares con gránulos matriciales (Mt) y un retículoendoplasma de tipo liso (Rl); Núcleo (N). X 10.500.
- Fig. 15. Parte de una célula mioide: se indica la presencia de microfilamentos (Mf) y mitocondrias (Mt); fibras colágenas (Fc). X 9.800.
- Fig. 16. Conductos eferentes: se indica epitelio con microvellosidades (flechas). X 345.
- Fig. 17. Región apical de células epiteliales del conducto eferente: Microvellosidades (Mv); desmosomas (D) y zonula occludens (Z). X 10.500



- Fig. 18. Célula epitelial del conducto eferente: microvellosidades (Mv); núcleo (N); cisternas dilatadas del retículoendoplasma rugoso (flechas); lámina basal (Lb). X 9.800.
- Fig. 19. Células epiteliales del conducto espermático principal a nivel testicular: microvellosidades ramificadas (Mv); cisternas dilatadas del retículoendoplasma rugoso (flechas); unión estrecha (I). X 9.100
- Fig. 20. Corte transversal a nivel de la base de la papila urogenital: conductos espermático principal (Dp); uretra (U); epidermis (Ep). X 90.
- Fig. 21. Parte de células epiteliales del conducto espermático principal a nivel de la papila urogenital: microvellosidades (Mv); vesículas pinocitósicas (Vp); mitocondria (Mt); uniones desmosómicas (D); interdigitaciones de las membranas celulares (flecha); núcleo (N); lámina basal (Lb). X 17.500.
- Fig. 22. El conducto se hace superficial (Dp). X 90.
- Fig. 23. Desembocadura en común del conducto (Dp) y de la uretra (U) en el ápice de la papila. X 90.

