

Histología y ultraestructura del testículo del charal *Chirostoma jordani* (Osteichthyes: Atherinidae)

Rodolfo Cardenas Reygadas* y Héctor Barrera Escorcia

Laboratorio de Histología, Unidad de Morfología y Función. ENEP Iztacala UNAM
Av. de los Barrios s/n, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México. C.P. 54090; Fax (525) 623-1155; rodolf@servidor.unam.mx+ Módulo de Biología Celular y Bioquímica. ENEP Iztacala UNAM.

* A quien debe remitirse la correspondencia.

Recibido 9-V-1997. Corregido 15-VII-1998. Aceptado 13-VIII-1998.

Abstract: Histological characteristics and gametogenesis have received little attention in endemic Mexican fish, thus they are little understood. In this study, the histology of the testis of charal *Chirostoma jordani*, and ultrastructure of gamete cells through fotonic and electron microscopy are described. Sixty male fish were collected in Corrales, Hidalgo state, México, 70 km NW México city. Charal testis are paired, and added to the dorsolateral wall of abdomen. They are covered by a mesorquium, which has small black pigmentation spots. Testes are tubular, and spermatogonia are restricted to the distal part of tubules, basically in the cortical region. Cell sizes were measured: spermatogonia ($8 \pm 0.7 \mu\text{m}$), primary spermatocytes ($6.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$), secondary spermatocytes ($4.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$), spermatids ($2.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$) and spermatozoa ($15.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$). Sertoli cells surround gamete cells; together they form cysts which have approximately the same degree of development. All the testes have gamete cells simultaneously, and Leydig cells are easy to see in the central part of the testis.

Key words: *Chirostoma jordani*, Atherinidae, testis, spermatogenesis, Leydig cells.

En México, el género *Chirostoma* (Álvarez y Navarro 1957, Espinosa *et al.* 1993) se encuentra distribuido en los estados de Aguascalientes, Coahuila, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas y Veracruz, en algunos estados de manera natural y en otros debido a la introducción del género (Espinosa *et al.* 1993). El género incluye 19 especies, algunas de ellas de importancia económica como el pez blanco (*Chirostoma estor*), y los diversos tipos de charal como *Chirostoma jordani* (Álvarez 1970). Se han realizado algunos informes previos sobre sistemática, biología, distribución y ecología (Álvarez y Navarro 1957, Barbour 1966, Álvarez 1970).

La gametogénesis se realiza en la parte distal del lóbulo y las etapas finales del desarrollo de la espermiogénesis se llevan a cabo hacia la región central del órgano (Grier 1981, Selman y Wallace 1986, Grier 1993).

Los objetivos del presente trabajo son describir la morfología y la ultraestructura del testículo del charal *C. jordani*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron ejemplares de charales machos de la especie *Chirostoma jordani* en la represa de Corrales, Estado de Hidalgo, aproximadamente a 70 km al noroeste del Distrito Federal ($19^{\circ}58'48''\text{N}$, $99^{\circ}27'00''\text{W}$).

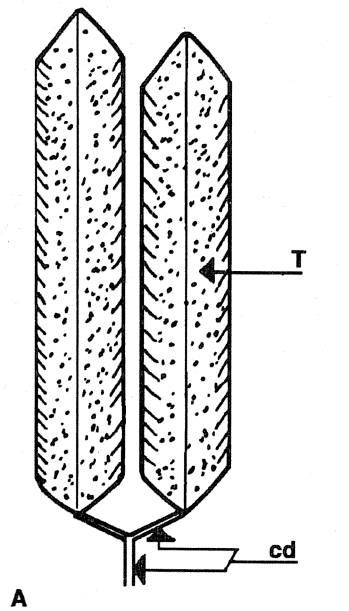
Microscopia de luz: Cincuenta peces fueron sacrificados, disecados y fijados en formol neutro o Bouin. Posteriormente, los testículos fueron removidos, lavados con agua y deshidratados por medio de una gradiente de alcoholes, para su posterior inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 7μ mm de grosor en un microtomo rotatorio, y fueron teñidos con hematoxilina y eosina, para ser montados con resina sintética (Luna 1968). 50 células de cada uno de los tipos del linaje gamético fueron medidas con objeto de registrar su tamaño.

Microscopia electrónica: Fragmentos de gónadas de diez ejemplares fueron fijadas en glutaraldehído al 2% en solución amortiguadora de fosfatos por 2 horas a pH 7.2 Los testículos fueron postfijados con tetraóxido de osmio al 1%, deshidratados en una gradiente de alcoholes, embebidos en resina epon, obteniéndose cortes semifinos (1μ m) que fueron teñidos con azul de toluidina al 1% y los cortes finos ($0.4 - 0.7\mu$ m) que fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo (Sjöstrand 1971). Los cortes semifinos fueron observados en el microscopio Reichter y los finos en un microscopio electrónico de transmisión JEOL.

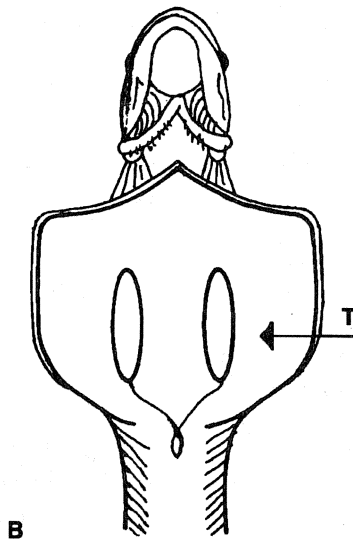
RESULTADOS

Morfología del testículo: Los ejemplares entre 4 y 7 cm de longitud patrón fueron considerados sexualmente maduros. Después del procesamiento histológico del testículo, el criterio se ratificó por la presencia de espermatozoides en los cortes.

Los testículos maduros de charal *Ch. jordani* son órganos pares de color blanco y forma triangular. El testículo izquierdo puede presentar mayor tamaño respecto a su homólogo (Fig. 1A), pero para ambos, el grado de madurez encontrado fue similar. En cada una de las gónadas se presentó un mesorquio, con algunos melanóforos. A bajo aumento, los cortes histológicos del testículo revelan la presencia de tres a cinco lóbulos, (Fig. 2A).



A



B

Fig. 1.- A) Esquema de testículos (T) de charal en los que muestra conducto deferente (cd) y la fusión del mismo. B) Esquema que ilustra la posición que guardan los testículos (T) en el pez.

Fig. 1.- A) Testis (T) of the charal with deferent ducts (cd) and their fusion. B) Anatomical position of the testis (T) in the fish.

Cada uno de los testículos presenta un conducto deferente el cual se fusiona con su homólogo y posteriormente desemboca en el poro genital (Fig. 1A y 1B).

Espermatogénesis: El proceso de la espermatogénesis inicia en la periferia del órgano, donde se encuentran grupos pequeños de espermatogonias; aunque no es un tipo celular abundante (Fig. 2B). Estas células son de aspecto más o menos esférico, con bordes irregulares y de aproximadamente $8 \pm 0.7 \mu\text{m}$ de diámetro, con citoplasma ligeramente basófilo y núcleo central, con un nucleólo evidente. El núcleo mide $6 \pm 0.1 \mu\text{m}$ (Fig. 2B). Este y otros de los grupos celulares resultantes de la espermatogénesis se encuentran delimitados por células de Sertoli. (Fig. 3B y 4A)

El proceso continua con los espermatozoides primarios, que al igual que las espermatogonias se localizan hacia la periferia del órgano. Bajo el microscopio óptico, estas células se observan esféricas, miden $6.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$ y poseen un citoplasma ligeramente acidófilo. Su núcleo es altamente basófilo y no existe nucleólo evidente. Este tipo celular se presenta asociado en grupos, su presencia en el órgano es frecuente. (Fig. 2C).

Después de concluir su meiosis I, el espermatozoides primario da origen a espermatozoides secundarios, los cuales miden $4.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$, que bajo el microscopio óptico se identifican como células morfológicamente similares a los espermatozoides primarios (Fig. 2D). A nivel de microscopía electrónica este tipo celular aparece ovoide, lo mismo que su núcleo, el cual ocupa la mayor parte del volumen de la célula. Se identifica la cromatina en grandes grumos, que constituyen la mayor parte del núcleo. En algunos espermatozoides secundarios empieza a notarse la polarización de organelos (Fig. 3A).

El siguiente tipo celular, son las espermátides, las cuales se encuentran en una posición más central en el órgano y es frecuente observarlas en la cercanía del conducto deferente y sus ramificaciones. Estas células se ven al microscopio óptico, como células pequeñas de

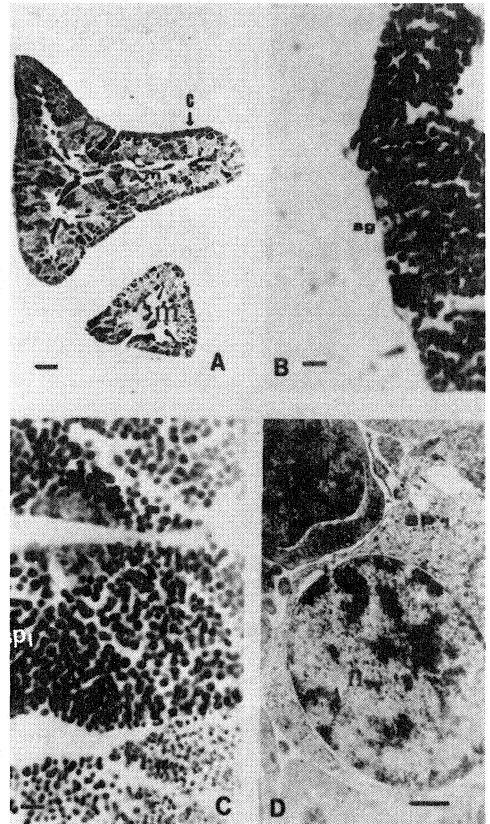


Fig. 2. Testículo del charal *Chirostoma jordani*. A) Corte transversal del testículo del charal teñido con Hematoxilina y Eosina en la que se aprecian una zona donde la gametogénesis es intensa (c) y otra donde se presentan principalmente conductos que contienen espermatozoides y células de Leydig (m), barra 200 μm . B) Corte teñido con hematoxilina y eosina en la región periférica del testículo donde se observan espermatogonias (sg) barra 10 μm . C) Corte teñido con hematoxilina y eosina donde se aprecian espermatozoides primarios (SP1), barra 10 μm . D) Espermatozoides secundario (sp), donde se observa el inicio de la polarización del núcleo celular (n), barra 1 μm .

Figure 2. Testis from *Chirostoma jordani*.

A) Transversal section stained with hematoxylin and Eosin. In one zone the strong gametogenesis is observed (c); another contains spermatozoon and Leydig cells (m). Bar 200 μm . B) Transversal section with spermatogonia (sg). Bar 10 μm . C) Transversal section with Primary spermatocytes (SP1). Bar 10 μm . D) Primary spermatocyte (SP). Note that the nucleus has an excentric position. Bar 1 μm .

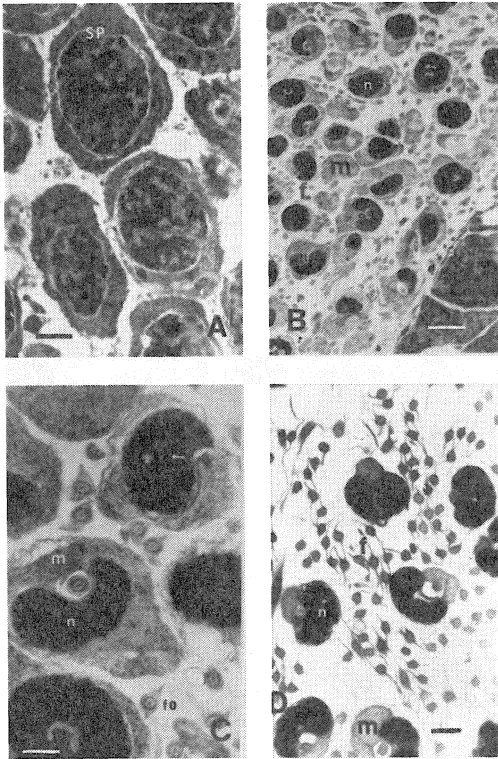


Fig. 3. Tipos celulares de la espermatogénesis del charal. A) Espermatocitos secundarios (SP), barra 1 μm . B) Conjunto de espermatídes que están sufriendo la espermiogénesis, presentándose varias etapas de esta. (n), núcleo; (f), Flagelos; (m), conjunto de mitocondrias; (cs) células de Sertoli, barra 1 μm . C) Detalle de la espermiogénesis, la célula central presenta una condensación del material genético (n) dispareja con relación al resto del núcleo y forma una fosa (f) que rodea al flagelo, junto con la mitocondria (m), varios flagelos (fo) se observan entre las espermatídes. La flecha indica puntos más oscuros del material genético atribuidos a una fase de mayor condensación, barra 0.5 μm D) Conjunto de espermatozoides con su núcleo completamente condensado (n), mitocondrias (m) y una gran cantidad de flagelos (f) que pertenecen a otros espermatozoides, barra 1 μm .

Figure 3. Different cellular types from spermatogenesis. A) Secondary spermatocyte (SP). Bar 1 μm . B) Group of spermatids in diverse phases of spermiogenesis. (n), nucleus; (f), flagellum; (m), mitochondria. Bar 1 μm . C) Detail of spermiogenesis. The central cell has a condensation of genetic material (n) different from the rest of the nuclear material. The nucleus has a fossa (f) which is surrounding the flagellum, close to mitochondria (m), some flagella (fo) are seen between spermatids. The arrow shows darker spots in the genetic material indicating more condensation. Bar 0.5 μm . D) A group of spermatozoa with their nucleus completely condensed (n), mitochondria (m), many flagella from other spermatozoons are observed. Bar 1 μm .

2.5 \pm 0.2 μm , esféricas y con su núcleo ligeramente excéntrico, mientras que el microscopio electrónico revela, con mayor precisión el proceso de espermiogénesis, con las correspondiente variaciones en la morfología celular. El evento parece comenzar con la aparición de pequeños gránulos negros en la cromatina, mientras se inicia la formación de una fosa nuclear. Conforme la espermiogénesis avanza, los cromosomas gradualmente se tornan más electrodensos, mientras que las mitocondrias van migrando a un polo de la célula cerca del centriólo, sitio en el cual se forma el flagelo, el que comienza a desarrollarse. Conforme la espermiogénesis sigue avanzando, el resto de los organelos comienza a desaparecer (Figs. 3B, 3C).

No se observaron cuerpos residuales en el exterior de la células o fagocitados por células de Sertoli.

El espermatozoide mide 15.4 \pm 0.3 μm , pero en gran medida esta longitud esta dada por el flagelo, ya que la cabeza mide solo alrededor de 2 \pm 0.1 micrómetros. Con el microscopio óptico, la parte más evidente es la cabeza, pues incluso los flagelos pueden quedar enmascarados por la intensa basofilia de este u otro de los tipos celulares del linaje. Al igual que todos los espermatozoides descritos para teleósteos, estas células carecen de acrosoma. La cromatina se observa altamente condensada. En la región media el centriólo y cuatro o cinco mitocondrias están ubicadas. El flagelo muestra el típico arreglo con nueve pares de microtúbulos periféricos y un par central. (Fig. 3C, 3D)

Las células de Sertoli siempre se encuentran rodeando a células del linaje gamético, formando quistes espermáticos, son más evidentes en la región de la corteza del órgano y en los cuales se incluyen espermatogonias, espermatocitos primarios o espermatocitos secundarios, pero no localizaron dentro de estas estructuras espermatídes o espermatozoides. Las células de Sertoli exhiben una forma aplanada (Fig. 3B y 4A).

Las células de Leydig tienen una forma poliédrica y se encuentran fundamentalmente en la parte central del órgano. Estas células presentan abundantes vacuolas citoplásmicas,

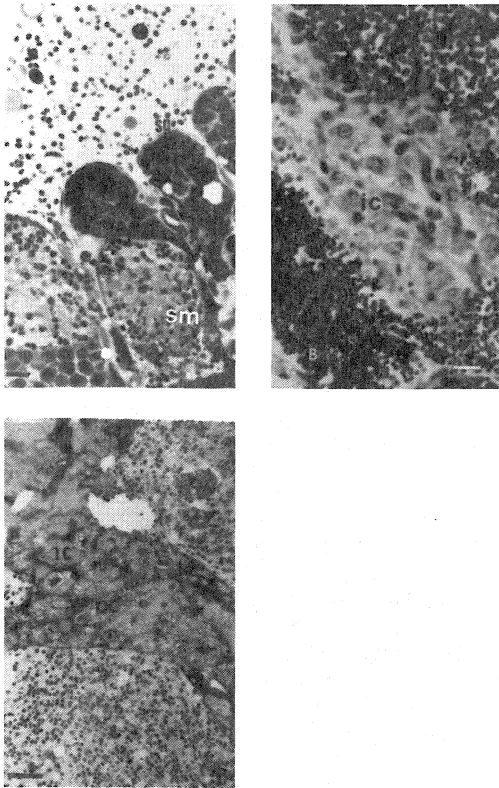


Fig. 4. Células que no pertenecen a la línea gamética. A) un nido de espermatogonias (sg) y célula de Sertoli (flecha) que rodea a células de la línea gamética, y un grupo de espermátides (sm). Corte semifino teñido con azul de toluidina, barra 10 μ m. B) Células de Leydig (ic). Corte teñido con hematoxilina y eosina, barra 10 μ m. C) Corte semifino teñido con azul de toluidina. Se aprecian un conjunto de células de Leydig (ic) con una gran cantidad de vacuolas en su citoplasma (flecha) y un vaso sanguíneo (bc) que pasa entre ellas, barra 10 μ m.

Figure 4. Cells which do not belong to the gametic line.

A) Semithin section stained with Toluidin blue. Sertoli cell (arrow) surrounding the spermatogonia (sg), and a group of spermatids (sm). Bar 10 μ m.

B) Leydig cells in the interstitial tissue. Stained with hematoxin and eosin. Bar 10 μ m.

C) Semifine section stained with toluidine blue. It shows a group of Leydig cells (ic) with many vacuoles included in their cytoplasm (arrow) and a blood capillary (bc) between. Bar 10 μ m.

las cuales podrían ser precursoras de las hormonas esteroides. Bajo el microscopio óptico muestran un citoplasma acidófilo, núcleo de posición central con su cromatina difusa. En cortes semifinos su citoplasma presenta una gran cantidad de vacuolas y pueden encontrarse próximas a los vasos sanguíneos (Fig. 4B y 4C).

DISCUSIÓN

El proceso de espermatogénesis en el charal *Ch. jordani* presenta un patrón de desarrollo similar al descrito para *Fundulus* y otras especies de atheriniformes (Grier 1975 y 1981, Selman y Wallace 1986). Las espermatogonias fueron encontradas hacia la parte terminal de los lóbulos. Para la mayoría de las otras especies se han descrito dos tipos de espermatogonias, una de ellas encargada de realizar mitosis con objeto de renovar esta subpoblación celular, mientras que el otro tipo de espermatogonia se dice es una célula que inicia el proceso de maduración para transformarse en espermatozito primario. En el presente trabajo solo se pudo evidenciar la presencia de una de ellas, la correspondiente al primer tipo de espermatogonia descrita con anterioridad, y ello podría ser explicado por el momento en el que se realizó la recolección, que limitaría la presencia del otro de los tipos de espermatogonia a un momento diferente del ciclo reproductivo.

Las características descritas para espermatozitos primarios y secundarios en otras especies, no presentan grandes variaciones con respecto a los resultados encontrados en el presente estudio.

Durante la espermiogénesis existe un cambio de histonas que se encuentran asociadas al ácido desoxirribonucleico por protaminas (DeFelice y Rash 1969), a objeto de obtener una mayor condensación del material nuclear, los puntos electrodensos que se reconocen en las espermátides del charal pudieran representar el inicio de esta sustitución de proteínas. Por lo que se sugiere que en posteriores investigaciones se utilicen anticuerpos antiprotaminas a fin de corroborar

si los mencionados puntos electrodensos corresponden a este tipo molecular.

La migración de mitocondrias a la región de la pieza media del espermatozoide se ha descrito para especies de peces como *Notopterus notopterus* y *Labeo rahita* como un cuerpo denso denominado condrioesferas y es característico de la espermiogénesis (Updadyay y Guraya 1970). Resultaría interesante saber si otras especies del género *Chirostoma* cuentan con la misma cantidad de mitocondrias en la pieza media del espermatozoide, pues en caso de no resultar así, podría constituirse como una herramienta valiosa a nivel taxonómico dado el grado de hibridación entre especies del género, lo cual, no requeriría siquiera el sacrificio de los organismos donadores, sino solo una pequeña toma de gametos recolectados directamente de machos sexualmente maduros, pues es sabido que para otras especies, cuando existe proximidad taxonómica, por las características morfológicas de algunos tipos celulares, entre ellos espermatozoides, existe la posibilidad de diferencias en el número de mitocondrias en la parte media del espermatozoide (Billard 1986).

El espermatozoide presenta una morfología muy similar a la señalada en la carpa y en general en ciprínidos, los cuales tienen una forma globular en la cabeza y hacia una de las partes laterales las mitocondrias y el origen del flagelo (Billard 1986).

Trabajos realizados con *Oryzias latipes* (Gresik *et al.* 1973) registraron el hecho de que, las células de Sertoli cambian su morfología de acuerdo a las células con las cuales se encuentran asociadas, es decir, que cuando la células de Sertoli se encontraba asociada a células como espermatogonias su morfología corresponde a célula plana, mientras que cuando esta asociada a espermátides su morfología es columnar. En el caso de las células de Sertoli en el testículo del charal, no encontramos variación en la morfología, mostrándose siempre como células planas, independientemente de las células asociadas.

Las células de Leydig tienen una disposición característica dentro de la gónada (Grier

1993), haciendo más sencilla su identificación con respecto al resto de las células presentes en el testículo. La presencia de vacuolas en el citoplasma de las células de Leydig sugiere fuertemente la síntesis de esteroides.

RESUMEN

Las características histológicas de la gónada y la gametogénesis en peces endémicos mexicanos han sido poco estudiadas y por lo tanto poco comprendidas. En el presente trabajo se describe la histología del testículo del charal *Chirostoma jordani*, y la ultraestructura de las células del linaje gamético por medio de microscopía fotónica y electrónica. Se recolectaron 60 peces en Corrales, estado de Hidalgo, México, 70 km al Noroeste de la ciudad de México. Los testículos del charal *Ch. jordani* son órganos pares, pegados a la pared en la región laterodorsal del abdomen. Se encuentran recubiertos por un mesorquio, el cual presenta algunos puntos de pigmentación. El testículo es de tipos tubular, encontrándose las espermatogonias restringidas a los extremos distales del túbulo fundamentalmente en la región cortical. Se registraron los tamaños de espermatogonias ($8.0 \pm 0.7 \mu\text{m}$), espermátocitos primarios ($6.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$), espermátocitos secundarios ($4.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$), espermátides ($2.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$) y espermatozoides ($15.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$). Las células de Sertoli también se encuentran presentes rodeando a las células gametogénicas formando nidos en los cuales, las células del linaje gamético que se encuentran en su interior, tienen aproximadamente el mismo grado de desarrollo. El testículo presenta todas las células del linaje gamético al mismo tiempo, y bien desarrolladas células de Leydig, estas últimas fundamentalmente en la parte central del órgano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Rodolfo Paredes Díaz y al Instituto de Fisiología Celular por su ayuda técnica y facilidades en el uso del equipo de microscopía electrónica.

REFERENCIAS

- Alvarez del Villar, J. & G.L. Navarro. 1957. Los peces del valle de México. Dirección General de Pesca e Industrias conexas. Secretaría de Marina. México, D.F. 62 p.
- Alvarez del Villar, J. 1970. Peces mexicanos (claves) Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras. Secretaría de Industria y Comercio. México, D.F. 166 p.

- Barbour, C. D. 1966. The systematics and evolution of the genus *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae). Tesis Doctoral, Universidad de Tulane, Tulane, Alabama.
- Billard R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod Nutr Develop.* 26: 877-920.
- DeFelice, D.A. & E.M. Rash. 1969. Chronology of spermatogenesis and spermiogenesis in poeciliid fishes. *J. Exp. Zool.* 171: 191-208.
- Espinosa, P. H., M.P. Gaspar & P. Fuentes. 1993. Listados faunísticos de México. III. Los peces dulceacuícolas mexicanos. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 99 p.
- Gresik, E.W., G. Quirk & J.B. Hamilton. 1973. Fine structure of the Sertoli cell of the testis of the teleost *Oryzias latipes*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21: 341-352.
- Grier, H.J. 1975. Spermiogenesis in the teleost *Gambusia affinis* with particular reference to the role played by microtubules. *Cell Tissue Res.* 165: 89-102.
- Grier, H.J. 1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Am. Zool.* 21: 345-357.
- Grier, H.J. 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cells barrier. 703-739. *In* L.D. Russel & Griswold M. D (eds.). *The Sertoli cell.* Cache River, Agua Clara, Florida.
- Luna, L.G. 1968. Manual histologic staining methods of the Armed Forces. Institute of Pathology. Mc Graw, Nueva York. 258 p.
- Selman, K. & R. Wallace. 1986. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *Amer. Zool.* 26: 173-192.
- Sjöstrand, F.S. 1971. Electron microscopy of cells and tissues. Academic, Nueva York. 453 p.
- Updadhay, S. & S.S. Guraya. 1970. Histochemical studies on the spermatogenesis of some teleost fishes. *Acta Anat.* 86: 484-514.