



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**INDICADORES MORFOLÓGICOS DE ESTACIONALIDAD
REPRODUCTIVA EN TESTÍCULOS DE *Chinchilla laniger*, (MOLINA,
1782) EN CAUTIVERIO)**

LINA NEGRETE LOZANO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUÍA: DRA. RAQUEL CEPEDA CANALES

**SANTIAGO, CHILE
2008**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
DE CIENCIAS VETERINARIAS

INDICADORES MORFOLÓGICOS DE ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN TESTÍCULOS DE *Chinchilla laniger*, (MOLINA, 1782) EN CAUTIVERIO)

LINA NEGRETE LOZANO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

NOTA FINAL:

NOTA FIRMA

PROFESOR GUÍA: DRA. RAQUEL CEPEDA CANALES
PROFESOR CONSEJERO: DRA. MÓNICA DE LOS REYES SOLOVERA
PROFESOR CONSEJERO: DR. RICARDO OLIVARES PÉREZ-MONTT

SANTIAGO, CHILE
2008

1. Índice

2. Resumen	2
3. Summary	3
4. Introducción	4
5. Revisión bibliográfica	5
5.1 Origen	5
5.2 Taxonomía	5
5.3 Morfología	6
5.4 Reseña histórica	6- 7
5.5 Características de la explotación	7
5.6 Características reproductivas de la especie	7- 8
5.7 Estacionalidad reproductiva en mamíferos	8- 9
5.8 Aspectos neuroendocrinos.....	9 - 13
5.9 Testículo	13- 17
5.10 Espermatogénesis.....	18- 21
5.11 Control del ciclo y Proliferación celular	21- 25
5.12 Generalidades de apoptosis.....	26- 29
5.13 Vías de activación de la apoptosis	29- 33
5.14 Método de detección de apoptosis.....	33
6. Objetivo general.....	34
7. Objetivos específicos.....	34
8. Material y métodos.....	35- 37
9. Análisis estadístico.....	37
10. Resultados.....	38- 65
11. Discusión.....	66- 72
12. Conclusiones.....	73- 74
13. Bibliografía.....	75- 85

2. Resumen

En el presente trabajo se buscó identificar indicadores morfológicos para determinar estados de actividad reproductiva en *Chinchilla laniger*. Para esto, se estudiaron los testículos de animales adultos, mantenidos en cautiverio, durante un año. Detectando posibles variaciones en peso gonadal, cambios morfo-histológicos estacionales en los distintos compartimentos testiculares, altura del epitelio seminífero, área y diámetro tubular, índice gonado somático e índice espermatogénico. Además, se realizó un análisis inmunohistoquímico para la detección de células en proliferación por medio del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y detección de células apoptóticas a través de la técnica de TUNEL con la finalidad de identificar los cambios en la actividad proliferativa y apoptótica en un ciclo reproductivo anual.

Los resultados indicaron claras diferencias histológicas durante el año, lo que hace pensar en la existencia de distintos periodos durante un ciclo anual: reposo, recrudescencia, actividad y regresión gonadal. Las tendencias en las curvas de los indicadores mostraron un aumento en los meses de otoño- invierno y disminución en verano (diciembre, enero y febrero), por lo tanto, el testículo de la *Chinchilla laniger* presenta mayor actividad durante los meses de otoño-invierno, demostrando que al utilizarlos en forma complementaria son buenos indicadores de actividad reproductiva. Lo que, además, coincide con los estudios de estacionalidad reproductiva realizados a las glándulas sexuales accesorias para la especie en el mismo período.

3. Summary

The present work seeks to identify indicators to determine morphological states of reproductive activity in *Chinchilla laniger*. For this, we studied the testicles of adult animals kept in captivity for a year. We identified possible morpho-histological seasonal variations in different testicular compartments, gonadal weight, height of the seminiferous epithelium, tubular area and diameter, gonadal-somatic index and spermatogenic index. In addition, we performed an immunohistochemical analysis to detect proliferative cells, using the nuclear proliferation cell antigen (PCNA), and detection of apoptotic cells through the TUNEL technique, in order to identify proliferative and apoptotic changes in an annual reproductive cycle.

The results indicated clear histological differences during the year, which suggests the existence of different periods during an annual cycle: gonadal sleep, resurgence, activity and regression. The trend of the indicator curves showed an increase in autumn-winter and a decrease in summer (December, January and February), hence, *Chinchilla laniger* testicles exhibit increased activity during the months of autumn-winter, demonstrating that by using them in a complementary manner they are good indicators of reproductive activity. Furthermore, this coincides with the accessory sex glands seasonal reproductive studies conducted for the species in the same period.

4. Introducción:

La Chinchilla es un roedor hystricognatha perteneciente a la familia Chinchillidae, nativo de la Cordillera de Los Andes de Chile, Perú, Bolivia y Argentina, que debido a la caza y explotación descontrolada a la que se vio sometida, por la finura de su piel, actualmente se encuentra en grave peligro de extinción y rara vez se la puede ver en su hábitat natural.

En general, el inicio y término del período reproductivo en algunos mamíferos está condicionado por factores muy diversos, siendo uno de los más importantes la variación en la duración de la luz día (fotoperíodo). La mayoría de las especies silvestres limita el período de nacimientos, a las estaciones del año en que el clima es menos riguroso y la disponibilidad de alimentos abundante.

Estudios del sistema reproductor de la *Chinchilla laniger*, tanto en machos como en hembras, han demostrado, que presentan un período de actividad reproductiva en los meses de otoño-invierno y de reposo gonadal en verano (Cepeda *et al.*, 1996; Orostégui *et al.*, 1996 y Cepeda *et al.*, 1999). Adaro *et al.*, (1999) encontraron que los índices órgano-somático de los testículos de la chinchilla, en cautiverio, estaban altamente correlacionados con los índices correspondientes a epidídimo, glándulas vesiculares y glándulas bulbouretrales. Sin embargo no se han descrito los cambios morfo-histológicos en los testículos de *Chinchilla laniger*, en cautiverio, por lo que el objetivo del presente trabajo fue obtener más información sobre estos cambios, indicadores de la influencia de la estacionalidad, durante un ciclo anual.

5. Revisión bibliográfica

5.1 Origen

Las chinchillas son roedores hystricognatha pertenecientes a la familia Chinchillidae, endémico de América del Sur. Esta familia está formada por cuatro géneros: *Dinomys*, *Chinchilla*, *Lagidium* y *Lagostomus*, estos dos últimos conocidos como vizcachas (Spotorno *et al.*, 2004; Galaz, 2005).

Se reconocen dos especies de chinchilla: *Chinchilla laniger* (Molina, 1782) y *Chinchilla brevicaudata* (Waterhouse, 1818), basándose en el número de vértebras caudales (23 y 20, respectivamente) y la comparación entre el largo del húmero y el radio (Spotorno *et al.*, 2004; Galáz, 2005).

5.2 Taxonomía

Clase	Mammalia
Subclase	Eutheria
Orden	Rodentia
Suborden	Hystricognatha (Caviomorpha)
Superfamilia	Chinchilloidea
Familia	Chinchillidae
Subfamilia	Chinchillinae
Género	Chinchilla
Especie	<i>Chinchilla laniger</i> (Molina, 1782) <i>Chinchilla brevicaudata</i> (Waterhouse, 1818).

5.3 Morfología

La chinchilla es un roedor de pelaje suave y denso, de coloración gris, variando desde el gris bruno al gris azulado; su cola es larga, de unos 15 cm. aproximadamente, con pelos en forma de bandera. Presenta grandes pabellones auriculares y el cráneo muestra amplias bulas timpánicas, ojos grandes, pardos y brillantes. Con un tamaño corporal aproximado de 27 cm. de largo (Alquartí, 1986; Galáz, 2005).

5.4 Reseña histórica

A fines del siglo XIX y a comienzos del XX, este roedor fue prácticamente exterminado por cazadores que comercializaban su piel que era muy cotizada en el mercado peletero. Ante dicha situación, las autoridades chilenas prohibieron su captura a partir de 1929, autorizaron su cría en cautiverio y la exportación de animales vivos a distintos países de Europa y Norteamérica.

Ante el rápido decremento de las poblaciones de este roedor, producto de su sobreexplotación, se pensó durante un largo período que la especie se había extinguido. Sin embargo, a mediados de 1975 se descubrieron algunas colonias de chinchillas silvestres en el sector de Aucó, comuna de Illapel, IV región. Este descubrimiento condujo al establecimiento de una Reserva Nacional para la conservación y recuperación de las poblaciones allí existentes (Galáz, 2005).

La distribución histórica de la *Chinchilla laniger* se extendía desde Taltal (II región) hasta Talca (VII región) en el valle central, entre los 400 y los 2500 m.s.n.m. en la Cordillera de la costa y la precordillera andina; sin embargo, en la actualidad sólo se conocen colonias silvestres en el sector de Illapel (31° 28'S; 71° 03'O) y La Higuera (29° 27'S; 71° 13'O) 90 Km. al norte de la Serena, IV región (Galáz, 2005).

La otra especie, *Chinchilla brevicaudata*, se distribuía en la zona andina de Perú, Bolivia, Argentina y Chile, sin embargo, en el país actualmente sólo se encuentra en la zona andina de Antofagasta (Galáz, 2005).

Según informes no documentados, en algunas de las actuales poblaciones domésticas existirían híbridos descendientes de individuos silvestres introducidos secundariamente en la población cautiva, incluyendo ejemplares de *Chinchilla brevicaudata* (Grau, 1986; Galáz, 2005).

5.5 Características de la explotación

La crianza de la chinchilla se rige por los mismos fundamentos productivo – económico de cualquier otra explotación animal (Alquarti, 1986). Sus ingresos están dados, principalmente, por la venta de pieles, dependiendo ésta, del número de crías nacidas en el plantel y la calidad de las pieles; y en segundo lugar, la venta de animales vivos (Neira, 1987).

Por lo tanto, es muy importante contar con información de la reproducción de la especie, para así aumentar el número de pieles producidas en el año y con ello los ingresos totales del plantel comercial.

5.6 Características reproductivas de la especie

Hembra

La chinchilla hembra alcanza un peso corporal adulto de 500 a 700 g. Inicia la pubertad entre los 6 a 7 meses de edad y el rendimiento reproductivo máximo es a los 9 años; es poliéstrica estacional y de ovulación espontánea, presentando ciclos ovulatorios cada 30 a 50 días, con un promedio de 41 días, detectándose el celo mediante el examen de las membranas vaginales que son permeables sólo durante el estro y parto (Weir, 1972). En Chile, la mayoría de los cruzamientos ocurren entre los meses de abril a octubre, decayendo – a medida que se acerca al verano – significativamente el número de cópulas y partos (Neira *et al.*, 1989). Presenta un período de anestro en los meses de verano y comienzo de otoño

(Weir, 1972). Su período de gestación es de 111 días y puede tener dos partos al año correspondientes al primer celo de la estación, y al celo posparto (Weir, 1972), con un tamaño de camada de una a cuatro crías por parto (Neira *et al.*, 1989). El destete se produce entre las 6 a 8 semanas de edad (Weir, 1972).

Macho

Posee testículos de situación intrabdominal gran parte del año. Las gónadas pueden descender a una especie de bolsa de posición más caudal durante la pubertad en la mayoría de los animales, pero este hecho no se observa en todos los casos. No obstante este descenso, no se describe un escroto propiamente tal (Dellman, 1962). La espermatogénesis comienza ya a los dos meses de edad, pero la pubertad sólo se alcanza a los 8 meses aproximadamente, ya que para ello además debe estar presente el desarrollo de las glándulas accesorias, como las glándulas vesiculares y la próstata, así como también un tamaño corporal adecuado con un peso entre 400 a 600 g (Weir, 1972).

5.7 Estacionalidad reproductiva en mamíferos

En la mayoría de las especies mamíferas, los cambios ambientales pueden afectar un amplio rango de procesos fisiológicos, morfológicos y conductuales. Como por ejemplo, grandes cambios en la actividad reproductiva (Goldman, 2001; Malpoux *et al.*, 2001).

La disponibilidad de comida, lluvia, temperatura y cambios en la duración del día, son señales medioambientales que controlan el momento de la reproducción para muchos animales (El Bakry *et al.*, 1998; Leah *et al.*, 2005).

La perpetuación de la especie es el objetivo esencial de la reproducción animal. Se ha observado en distintas especies, entre ellas roedores, la utilización de diversas estrategias reproductivas, como la habilidad de restringir la actividad reproductiva a una época del año,

que coincide con las condiciones ambientales más propicias para la supervivencia de los neonatos (Chemineau, 1993; Goldman, 2001; Young *et al.*, 2001).

Grocock y Clarke en 1974, observaron que el ratón de campo (*Microtus agrestis*) se reproducía en los meses de primavera y verano. Grupos de animales de esta especie, fueron sometidos a tratamientos de luz. Posteriormente se sacrificaron, se tomaron muestras de tejido testicular y mediante técnicas histológicas se estableció un índice espermatogénico (IE) compuesto por una escala de 0 a 5 que representa los distintos niveles de actividad espermatogénica.

Escala de IE:

IE 5: Espermatogénesis completa, con abundante producción de espermatozoides.

IE 4: Espermatogénesis completa pero con disminución en el número de espermátidas elongadas y espermatozoides.

IE 3: Existe una disminución mayor en el número de espermatozoides y espermátidas.

IE 2: Presencia de espermatogonias, espermatoцитos, existen aún espermatogonias redondas y no hay presencia de espermátidas elongadas.

IE 1: Los túbulos son pequeños y contienen sólo espermatogonias, espermatoцитos I y células de Sertoli.

IE 0: Los túbulos son muy pequeños y contienen sólo espermatogonias y células de Sertoli.

Mediante la comparación de los tratamientos de horas luz / oscuridad se estableció que la longitud del período de oscuridad es importante para el control de la actividad testicular.

5.8 Estacionalidad reproductiva: aspectos neuroendocrinos

El mecanismo fisiológico que está involucrado en la función reproductiva en un ciclo anual, es la glándula pineal, donde la duración de la fase de oscuridad se traduce por disminución o aumento de la síntesis y secreción nocturna de melatonina (Chemineau, 1993;

Malpaux *et al.*, 2001; El Qandil *et al.*, 2005) Esta hormona, (N-acetil-5-metoxitriptamina) es sintetizada a partir de Triptofano, que por medio de reacciones enzimáticas es transformado a Serotonina y finalmente a Melatonina (Arendt, 1998; Hafez *et al.*, 2002). La secreción de melatonina es exclusivamente nocturna, en algunas especies (ovejas), ésta es elevada durante todo el período de oscuridad, mientras que en otras especies (hámster sirio, ratas, etc.), la secreción de la hormona no comienza hasta unas horas después del inicio de oscuridad (Arendt, 1998). La amplitud del ritmo de secreción de melatonina (diferencia entre los niveles de noche y día) es muy variable entre las especies, pero es muy similar dentro de individuos con una fuerte determinación genética (Chemineau, 1993; Malpaux *et al.*, 2001).

El ritmo de secreción de melatonina es manejado por vías neurales que incluye el tracto retinohipotalámico, núcleo paraventricular del hipotálamo y fibras preganglionares del cordón espinal cervical del ganglio cervical superior (GCS). Desde el GCS es inervada la glándula pineal mamífera, que provee acción noradrenérgica, la que estimula la actividad enzimática. Por lo tanto, la síntesis y secreción de melatonina (Arendt, 1998; Goldman, 1999) Fig.1.

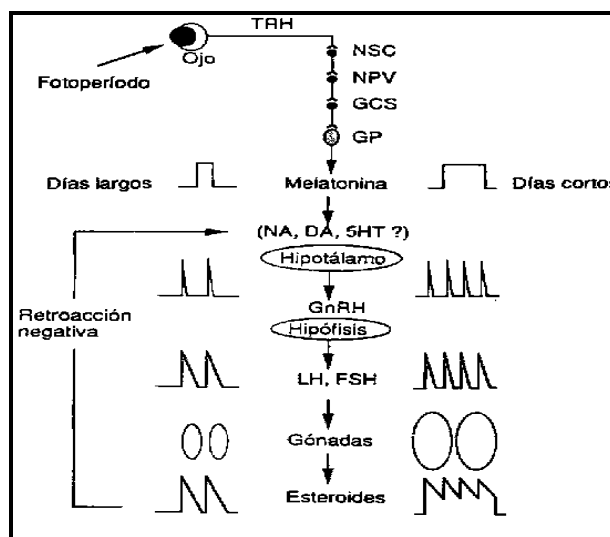


Fig.1 Cambios estacionales en el eje Hipotálamo-Hipófisis-gonadal. Los impulsos luminosos son percibidos en la retina y son conducidos por el tracto retino-hipotalámico (TRH) hasta los núcleos supraquiasmáticos (NSC) y paraventriculares (NPV) del hipotálamo, pasando por el ganglio cervical superior (GCS) llegando, finalmente, a la glándula pineal (GP). Esta glándula, sintetiza y secreta melatonina, la que modifica la retroalimentación negativa de los esteroides sobre la actividad neuroendocrina. (Chemineau, 1993).

Los receptores de melatonina se ubican en el *pars tuberalis* en la pituitaria y actúa en el hipotálamo medio-basal, modulando la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH (Goldman, 1999; Thiery *et al.*, 2002).

Investigaciones en el mecanismo de ritmicidad estacional reproductiva en mamíferos han revelado una relación entre las hormonas hipofisarias y gonadales en muchas especies (Goldman, 1999). En algunas especies, la inhibición estacional de la actividad reproductiva está asociada con el aumento en la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis al efecto del *feedback* negativo de hormonas esteroidales gonadales. Por ejemplo, hámster sirios machos (especie de días largos), en días cortos exhiben un aumento 3 o 5 veces en la sensibilidad al efecto del *feedback* negativo de testosterona en la secreción de LH y FSH comparados con machos mantenidos en días largos (Goldman, 1999).

La hormona del hipotálamo que regula la reproducción, es la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). La GnRH es un decapeptido (10 aminoácidos), con un peso molecular de 1.183 daltons. Este es sintetizado y luego almacenado en el hipotálamo medio basal. La GnRH proporciona un enlace humoral entre los sistemas neural y endocrino. La conexión del hipotálamo con la adenohipófisis se realiza mediante un sistema portal venoso. Por lo tanto, en respuesta a las señales neurales, se liberan pulsos de GnRH hacia el sistema portal hipofisiario, que actúa sobre las células gonadotróficas de la adenohipófisis. Éstas, estimuladas por la GnRH sintetizan y secretan dos gonadotropinas: LH y FSH (Hafez *et al.*, 2002; Cunningham, 2003).

La LH y FSH son hormonas glucoproteínicas con un peso molecular de 32.000 daltons. Las células gonadotróficas en el lóbulo anterior de la hipófisis secretan ambas hormonas. Su liberación depende de los patrones pulsátiles de secreción de GnRH. Pulsos

irregulares y de pequeña amplitud resultan en la liberación de FSH mientras que pulsos de alta frecuencia inducen liberación de LH. Cada una de ellas está formada por 2 subunidades diferentes llamadas subunidad alfa y beta. La subunidad alfa es común a la FSH y LH en una especie determinada, mientras que la subunidad beta es diferente y da la especificidad a la gonadotropina (Hafez *et al.*, 2002; Cunningham, 2003).

En el macho, la FSH tiene receptores específicos en las células de Sertoli en los túbulos seminíferos, es responsable de la espermatogénesis hasta el estado de espermatocito secundario. La FSH y la testosterona estimulan ciertas funciones en las células de Sertoli, incluidas la síntesis y liberación de las proteínas transportadoras de andrógenos (ABP), inhibinas, activina, estrógenos y transferrina, que está implicada en la transferencia de nutrientes a las células germinales, la meiosis, maduración de los espermatocitos, espermiación y función de las células de Leydig. La LH se une a los receptores de membrana de las células intersticiales (Leydig) y estimula en ellas la conversión de colesterol en testosterona. Una vez sintetizados, los andrógenos se difunden a sangre y linfa, donde se unen a ABP. Altas concentraciones de testosterona y dihidrotestosterona se consideran esenciales para que la espermiogénesis pueda darse con normalidad. Las ABP potencian la acumulación de altas concentraciones de andrógenos en los túbulos seminíferos y en el intersticio testicular (Hafez *et al.*, 2002; Cunningham, 2003).

Las inhibinas son proteínas que están formadas por dos subunidades llamadas alfa y beta unidas con puentes de disulfuros. En el macho, son producidas en los testículos, principalmente por las células de Sertoli. Son secretadas por vía linfática y no sanguínea venosa como ocurre en la hembra (Hafez *et al.*, 2002).

Las activinas son proteínas heterodiméricas compuestas de una subunidad alfa y una o dos subunidades beta (β_a o β_b) presentes en los líquidos testiculares (Hafez *et al.*, 2002).

Los andrógenos son esteroides de 19 carbonos con un hidroxilo o un oxígeno en las posiciones 3 y 17 y un enlace doble en la posición 4. Se sintetizan a partir de colesterol, un esteroide de 27 carbonos, que por la separación de una cadena lateral se transforma en pregnenolona (20 carbonos), subsiguientemente se convierte en progesterona (21 carbonos) y posteriormente en andrógeno. La testosterona es un andrógeno producido en los testículos por las células de Leydig. Es transportada en la sangre unida a una alfa globulina denominada globulina de unión para esteroides. Aproximadamente el 98% de la Testosterona circulante está unida a esta globulina. La Testosterona restante se encuentra libre para entrar a la célula de Sertoli, en el citoplasma es convertida en dihidrotestosterona, la que actúa en el receptor nuclear (Hafez *et al.*, 2002).

Dentro de sus funciones están: Estimular los estados tardíos de la espermatogénesis y prolongar el lapso de vida del espermatozoide en el epidídimo, promover el crecimiento, desarrollo y actividad secretoria de los órganos sexuales accesorios de los machos, mantener las características sexuales secundarias y el comportamiento sexual o libido del macho.

5.9 Testículo

Según Leyton y Rodríguez (1995), el testículo se encuentra cubierto por una capa externa serosa llamada túnica vaginal, derivada del peritoneo, compuesta por una porción serosa visceral y una parietal. Además, presenta una capa interna gruesa de tejido fibroconectivo llamada albugínea, la que se profundiza y forma tabiques que dividen al testículo en lobulillos (Fig.2).

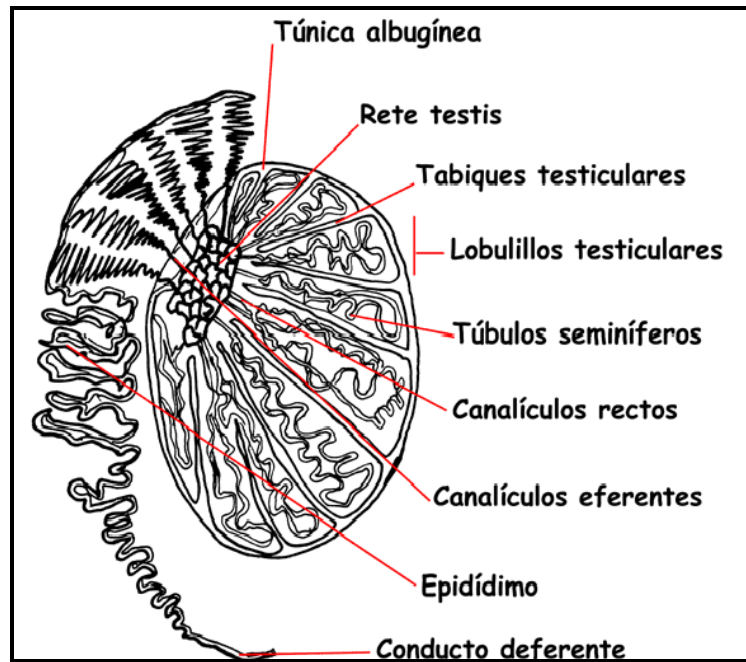


Fig.2 Organización del testículo (<http://www.laboratorioreproducao.com.br/fertilidade>)

Desde el punto de vista funcional, se describen tres compartimentos testiculares:

i) Compartimento tubular, representado por los túbulos seminíferos (TS), que se disponen adyacentes a la membrana basal. El epitelio de los TS, es estratificado, compuesto por membrana basal, células de Sertoli y células espermatogénicas.

ii) Compartimento peritubular, formado por numerosas capas de células mesenquimáticas concéntricas a la membrana basal del epitelio seminífero, entre las que se encuentra matriz extracelular no fibrilar y tejido conectivo formado por fibroblastos y colágeno, que sería sintetizado por las células de Sertoli y células mioideas.

iii) Compartimento intersticial que se dispone entre los TS, formado por tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos y linfáticos, fibroblastos, macrófagos y células de Leydig, productoras de los andrógenos testiculares. En la Fig.3 se observan los distintos compartimentos del testículo. En la Fig.4 se muestran las características histológicas del testículo de *Chinchilla laniger* obtenidas en esta memoria.

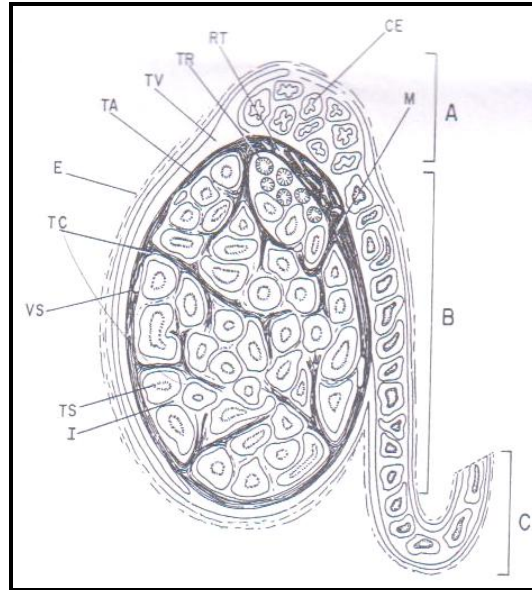


Fig.3 Organización testículo y vía genital inicial. RT, *rete testis*; TR, túbulo recto; TV, túnica vaginal; TA, túnica albugínea; E, pared escrotal; TC, tabique conectivo; VS, vaso sanguíneo; TS, túbulo seminífero; I, intersticio; CE, conductillos eferentes; M, mediastino; A, cabeza de epidídimo; B, cuerpo y cola del epidídimo; C, cola epidídimo (Leyton y Rodríguez, 1995)

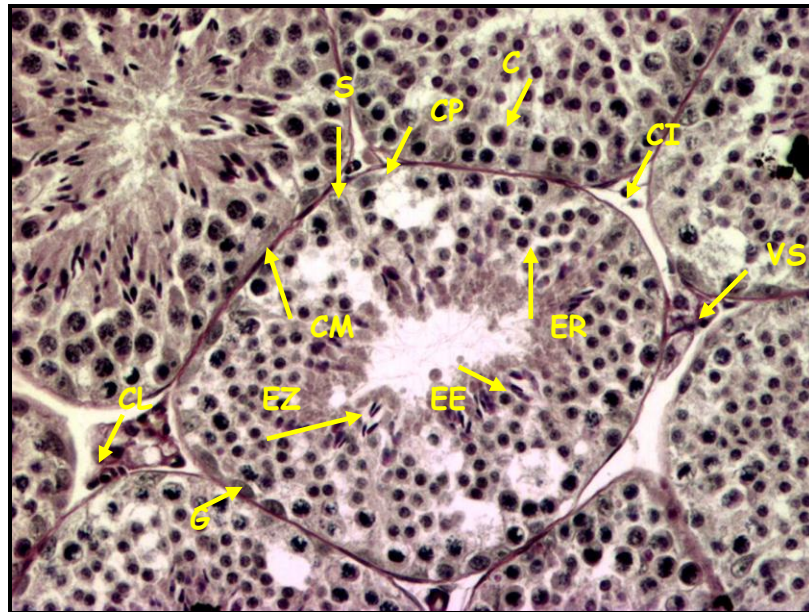


Fig.4 Se observan túbulos seminíferos, donde se muestran el compartimento intersticial (CI) donde se encuentran los vasos sanguíneos (VS) y células de Leydig (CL). Compartimento peritubular (CP) y las células mioides (CM). Compartimento tubular donde se ubican las células de la línea espermatogénica tales como espermatogonias (G), espermatocitos (C), espermatidas redondas (ER), espermatidas elongadas (EE) y espermatozoides (EZ), además de las células de Sertoli (S). H-E PAS, 200X

Los testículos de *Chinchilla laniger*, son intrabdominales, de forma ovalada y peso promedio de $2,5 \pm 0,8$ g. No presentan un escroto propiamente tal, sino que un saco cremastérico formado por musculatura abdominal, característica anatómica común al suborden de los histricomorfos (Villanueva, 1998). El epidídimo está formado por la cabeza ubicada en la parte más craneal testicular, el cuerpo está dirigido a caudal y la cola, con forma de cono, ubicada caudo-ventro-lateramente. Los conductos deferentes nacen de la cola epididimaria, orientados hacia craneal y en la mitad de su trayecto se flectan hacia caudal, llegando en forma independiente a la uretra (Villanueva, 1998).

En esta especie se observan tres glándulas accesorias: *i*) próstata, órgano impar situado caudal a las glándulas vesiculares y conductos deferentes, tiene dos lóbulos laterales difusos y un istmo central que rodea a la uretra intrapélvica, *ii*) glándulas vesiculares, constituidas por dos lóbulos con forma de cuerno con dirección caudo-lateral, poseen fondos de sacos ciegos orientados caudo- lateralmente, *iii*) glándula bulbouretral, órgano par, de forma ovoide, ubicado a ambos lados de la uretra intrapélvica (Peñailillo, 1997; Cepeda *et al.*, 2006).

Se ha descrito en *Chinchilla laniger*, en cautiverio, que la mayor actividad reproductiva se presenta en invierno y primavera (mayo a noviembre), mientras que ésta declina fuertemente a fines de verano, entre enero y marzo, estacionalidad reproductiva similar a la observada en el estado silvestre (Neira *et al.*, 1989; Adaro *et al.*, 1999).

Según Morales (1982), en el testículo de un macho estacional, se describen 4 etapas en un ciclo anual: reposo, recrudescencia, actividad y regresión, diferenciando a cada una de estas etapas cambios a nivel de compartimento tubular (diámetros tubulares, líneas espermatogénicas y número de células de Sertoli), peritubular e intersticial (número de células de Leydig, tejido conjuntivo) y, además, variaciones de tamaño y peso de gónadas y glándulas anexas. Se ha informado, que durante la regresión gonadal, los testículos

disminuyen de tamaño entre un 10 y 95% en respuesta a las señales ambientales asociadas con la estación no reproductiva (Young y Nelson, 2001) y muestran importantes cambios cuantitativos y cualitativos en la producción de semen, número de espermatozoides diarios por testículo, así como, disminución de la fertilidad en inseminación artificial (Chemineau, 1993).

Barrera hematotesticular

Está formada por elementos estructurales del tejido testicular que se interponen entre el capilar extratubular y epitelio seminífero que incluyen: endotelio capilar, membrana basal del capilar, matriz extracelular, vasos linfáticos (endotelio y membrana basal), células mioideas y uniones estrechas intersertoli (Leyton y Rodríguez, 1995).

Esta barrera está compuesta por: a) una barrera incompleta o parcial de las células mioideas, cuyas membranas celulares se disponen estrechamente con las adyacentes. b) la barrera de las uniones complejas entre las células de Sertoli adyacentes, situadas cerca de la base celular, donde las membranas opuestas se fusionan y forman dos compartimentos en los túmulos seminíferos: 1) compartimento basal que contiene espermatogonias y espermátocitos preleptoténicos, y 2) un compartimento adluminal, que contiene etapas más avanzadas de espermátocitos y espermátidas, el cual se comunica libremente con la luz del túbulo.

Es capaz de aislar el compartimento tubular de moléculas que llegan al intersticio por vía sanguínea, esto se ha comprobado experimentalmente al inyectar sustancias por vía vascular, las que no se incorporan totalmente a la membrana basal del túbulo seminífero y ninguna de estas atraviesa al compartimento adluminal del túbulo, por lo tanto, ocurre un aislamiento de las células germinales durante la espermatogénesis (Leyton y Rodríguez, 1995; Hafez y Garner, 2002).

5.10 Espermatogénesis:

Es un proceso en que las células madres diploides (espermatogonias) se dividen por mitosis para mantener su número, en forma cíclica generan progeñe sufriendo progresivas divisiones meióticas hasta diferenciarse en espermátidas haploides, liberándose posteriormente como espermatozoides.

La espermatogénesis se divide en tres procesos principales: espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis I (Dellman y Heinz, 1998; Cunningham, 2003).

Espermatocitogénesis:

Las espermatogonias son células de 10 a 12 μm de diámetro, ubicadas sobre la membrana basal del túbulo. Existen las espermatogonias tipo A que son células ovoides, con una gran área de contacto con la lámina basal y un nucléolo prominente. Estas células sufren divisiones mitóticas, las que son responsables de la capacidad del macho para producir de forma continua espermatozoides durante toda la vida adulta. Resultado de las divisiones se producen otras espermatogonias que no entrarán en el ciclo de producción de espermatozoides y que, por lo tanto, mantienen la población de células troncales y otras espermatogonias tipo A que se transformarán en espermatogonias tipo B, células redondeadas, con un nucléolo mucho menos prominente y escaso contacto con la lámina basal del túbulo. Estas células se dividirán por lo menos una vez y probablemente dos veces para formar espermatocitos I (Dellman y Heinz, 1998; Cunningham, 2003).

Meiosis:

Los espermatocitos I están ubicados en el compartimento adluminal del túbulo seminífero y al microscopio óptico se reconocen por la organización de la cromatina durante la extensa profase meiótica I, siendo la meiosis II muy breve, la observación de espermatocitos II es muy rara. Durante la primera división meiótica, los núcleos de los espermatocitos I

aumentan de tamaño notablemente por la duplicación de su ADN y se distinguen, principalmente, los estados de cigoteno y paquiteno, siendo la característica ultraestructural más notable de ésta etapa, la presencia de complejos sinaptonémicos, escasez de organelos y presencia de estrechos puentes citoplasmáticos entre espermatocitos en etapas sincrónicas de desarrollo. Como resultado de las dos divisiones meióticas, desde un espermatocito preleptoténico diploide se originan cuatro espermátidas haploides de menor tamaño que sus antecesoras (Leyton y Rodríguez, 1995; Hafez y Garner, 2002).

Espermiogénesis:

Es el proceso mediante el cual los clones interrelacionados de espermátidas recién formadas se diferencian en espermatozoides (Dellman y Heinz, 1998). Esta etapa comienza en los túbulos seminíferos y se completa en el epidídimo cuando el animal se acerca a la pubertad (MC Donald y Pineda, 1991).

Las espermátidas inicialmente son redondeadas, de tamaño relativamente grande en comparación a los espermatozoide y pequeñas con respecto a los espermatocitos I, luego ocurren profundos cambios morfológicos entre ellos: condensación de la cromatina y reducción del volumen nuclear, formación del acrosoma a partir del complejo de Golgi, alargamiento de la célula con la participación de los microtúbulos y microfilamentos, eliminación de parte del citoplasma como una gota residual, la adquisición de un flagelo estrechamente asociado al centriolo y mitocondrias y formación del acrosoma que se divide en cuatro fases: de Golgi, de encasquetamiento, acrosómica y maduración propiamente tal. Una vez formado el acrosoma, el espermio pasa al lumen tubular en un proceso denominado espermiación, para posteriormente pasar a la etapa de maduración en el epidídimo, donde adquiere movimiento y finalmente maduración donde adquiere capacidad fertilizante en el tracto femenino (Leyton y Rodríguez, 1995; Hafez y Garner, 2002).

Las numerosas divisiones celulares de las espermatogonias (9 a 11) y las 2 divisiones que sufren los espermatocitos, resulta en un crecimiento exponencial de células que son necesarias para una espermatogénesis normal, pero estas poblaciones de células germinales necesitan ser limitadas mediante mecanismos apoptóticos (Young *et al.*, 1999; Russell *et al.*, 2002) (Fig.5)

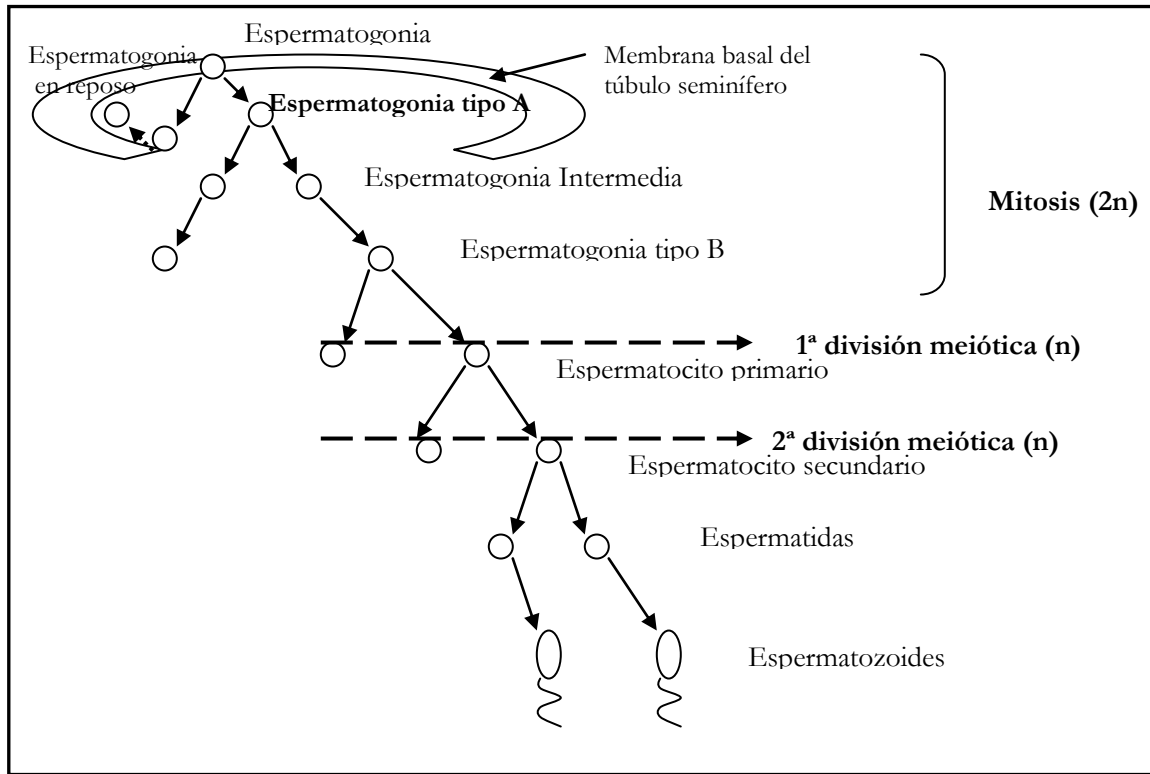


Fig. 5. Diagrama espermatogénesis (Cunningham, 2003).

En las especies estacionales, la actividad proliferativa varía según la época del año, esperando un mayor índice de renovación celular durante las etapas de recrudescencia y actividad gonadal (Young *et al.*, 1999; Russell *et al.*, 2002). Este aumento de células germinales en el testículo ocurre mediante mitosis y meiosis.

La mitosis se observa a nivel de espermatogonias y se describen las siguientes fases:

Fase G_1 corresponde al intervalo entre la mitosis y el comienzo de la síntesis. Durante esta fase la célula es metabólicamente activa y crece, pero no hay replicación del ADN.

Seguidamente tiene lugar la fase S o de síntesis, durante la cual se produce la replicación del ADN. Luego continúa con la fase G₂ donde sigue el crecimiento de la célula y se sintetizan proteínas en preparación de la mitosis. Finalmente, ocurre la Fase M o mitosis que corresponde la separación de los cromosomas, terminando en la división celular. Esta fase consta de 4 etapas: profase, metafase anafase , telofase y citocinesis o división del citoplasma resultando dos células hijas idénticas diploides (Cooper, 2002; Cotran *et al.*, 2002) (Fig. 6)

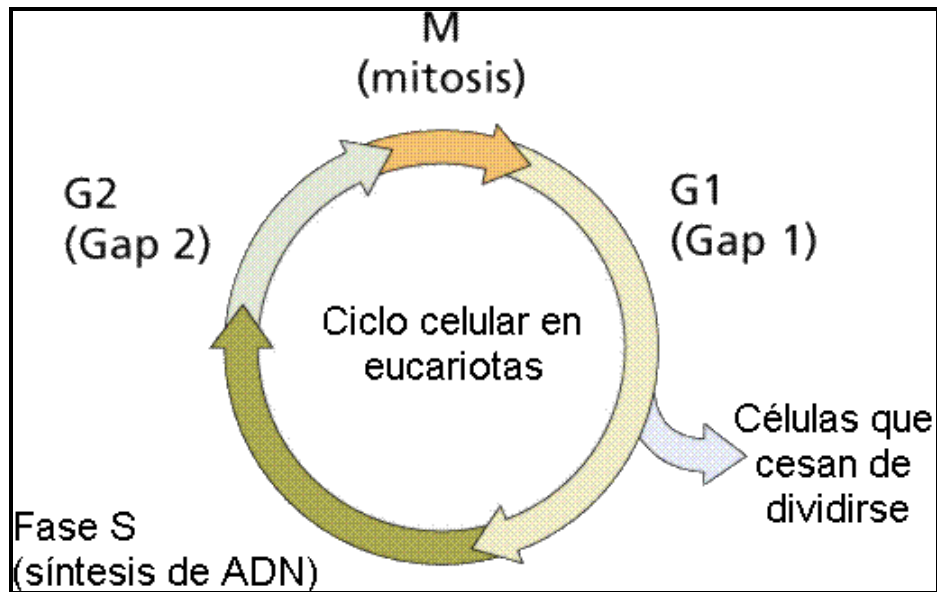


Fig.6 Esquema de mitosis celular (<http://www.vhfreeman.com/life/update>)

5.11 Control del ciclo celular

La progresión a través de las etapas del ciclo celular es controlado por una serie de reacciones enzimáticas secuenciales, ésta actividad es altamente ordenada y estrictamente controlada (Wolgemuth *et al.*, 2002).

Según Cotran *et al.*, (2002) se conocen 2 clases de control molecular:

- 1.- Una serie de puntos de control que vigilan la ejecución completa de los fenómenos moleculares y, si es necesario, retrasan el paso a la fase siguiente del ciclo.

2.- Una cascada de vías de fosforilación de las proteínas, en donde intervienen un grupo de proteínas llamadas ciclinas.

1.- Los procesos celulares como crecimiento celular, replicación de ADN y mitosis, se coordinan durante el transcurso del ciclo celular, los que se consiguen mediante una serie de puntos de control, los que regulan la progresión a través de las distintas fases del ciclo.

Uno de ellos se encuentra en la fase G_1 avanzada, controlando el paso de G_1 a S, denominado punto de restricción, este paso se regula principalmente por factores de crecimiento extracelular que son señales de proliferación celular. En presencia de estos factores las células atraviesan el punto de restricción y entran a la fase S. Una vez rebasado este punto, la célula queda determinada a proseguir a través de la fase S y el resto del ciclo, incluso en ausencia de estimulación del crecimiento. Si estos factores están ausentes en la fase G_1 , la célula no progresa por el ciclo, permaneciendo en estado de reposo denominado G_0 .

El punto de control en G_2 evita que comience la fase M antes que se haya completado la fase S, ya que detecta el ADN que no ha sido replicado y genera una señal que hace que se detenga el ciclo, hasta que se replique por completo. También la detención en este punto se genera en respuesta a lesiones en el ADN, permitiendo que se repare la lesión.

Otro punto de control se localiza al final de la mitosis, el que mantiene la integridad del genoma, supervisando que los cromosomas se alineen de manera correcta en el huso mitótico, lo que asegura que se distribuya un juego de cromosomas a cada célula hija.

2.- Cuando las células se incorporan y avanzan a lo largo del ciclo celular son controladas por variaciones en los niveles y grado de actividad de las ciclinas.

Las ciclinas son proteínas nucleares que actúan como subunidad regulatoria. Han sido divididas en 8 clases (A - H) Algunas ciclinas alcanzan su máxima concentración en ciertas

fases del ciclo y luego se degradan rápidamente cuando las células pasan a la fase siguiente del ciclo.

Estas proteínas forman complejos con un grupo de proteínas expresadas estructuralmente llamadas kinasas dependientes de ciclinas (CDK) divididas en CDK 2 a CDK 8, actúan como la subunidad catalítica.

Cuando la célula se incorpora a la fase G_2 sintetiza ciclina B y se une a CDK1, formándose el complejo ciclina B/CDK1 cuya actividad es indispensable para que las células pasen a la fase M. Este complejo se activa por fosforilación y, luego, la kinasa activa, fosforila a varias proteínas involucradas en la mitosis, en la replicación del DNA, la depolimerización de la lámina nuclear, la formación del huso mitótico. Luego de la Mitosis, las ciclinas son degradadas por la vía ubiquitina-proteasoma (Cooper, 2002; Cotran *et al.*, 2002; Wolgemuth *et al.*, 2002).

El paso de la fase G_1 a S se regula principalmente por CDK 2, CDK 4 y en algunas células CDK 6 en asociación con las ciclinas D y E. Los complejos CDK4 o CDK 6/ciclina D desempeñan un papel crítico en la progresión a través del punto de restricción en G_1 . La ciclina E se expresa posteriormente en G_1 y los complejos ciclina E /CDK 2 se requiere para el paso de G_1 a S y el inicio de la síntesis de ADN. Los complejos ciclina A/ CDK 2 intervienen en la progresión de las células a través de la fase S (Cooper, 2002; Cotran *et al.*, 2002) (Fig.7).

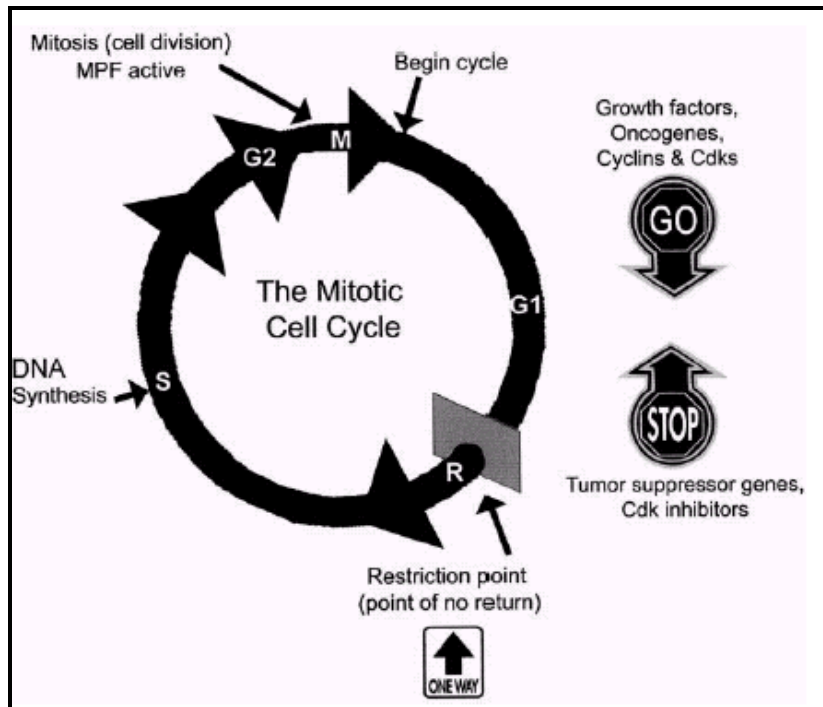


Fig.7 Regulación del ciclo celular, la progresión por cada una de las etapas es controlada por puntos de restricción en G₁/S y G₂/M (Wolgemuth *et al.*, 2002).

La proliferación celular se regula no sólo por factores de crecimiento sino que también por diversas señales que inhiben la progresión del ciclo celular, activando a los inhibidores de CDK como la proteína p53 regulador de la transcripción, activando la expresión del inhibidor p21 que inhibe varios complejos de ciclina /CDK y además inhibe la replicación de ADN en la fase S, uniéndose a PCNA. Rb (proteína retinoblastoma), desfosforilada secuestra a los miembros de la familia de los factores de transcripción E2F que estimulan la transcripción de distintos genes necesarios para el paso a la fase S. TGF- β (*Transforming growth factor*) es un inhibidor extracelular que detiene el ciclo celular en G₁ producida por la activación de p15 que se una al complejo ciclina D/CDK4 o 6 (Cooper, 2002; Cotran *et al.*, 2002; Huleihel y Lunenfeld., 2004).

Para el estudio de proliferación celular se utilizan distintos antígenos. Uno de éstos, es el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), proteína nuclear no histona de 36 KD,

que funciona como proteína adyuvante de la síntesis de ADN y, además, está implicado en la reparación de división de nucleótidos. La síntesis de PCNA es muy baja en la fase inicial de G1, aumenta durante la fase tardía de G1 y alcanza su máximo al inicio de la fase S. Finalmente, desciende a niveles basales durante el período final de la fase S2 (López *et al.*, 2001) (Fig.8)

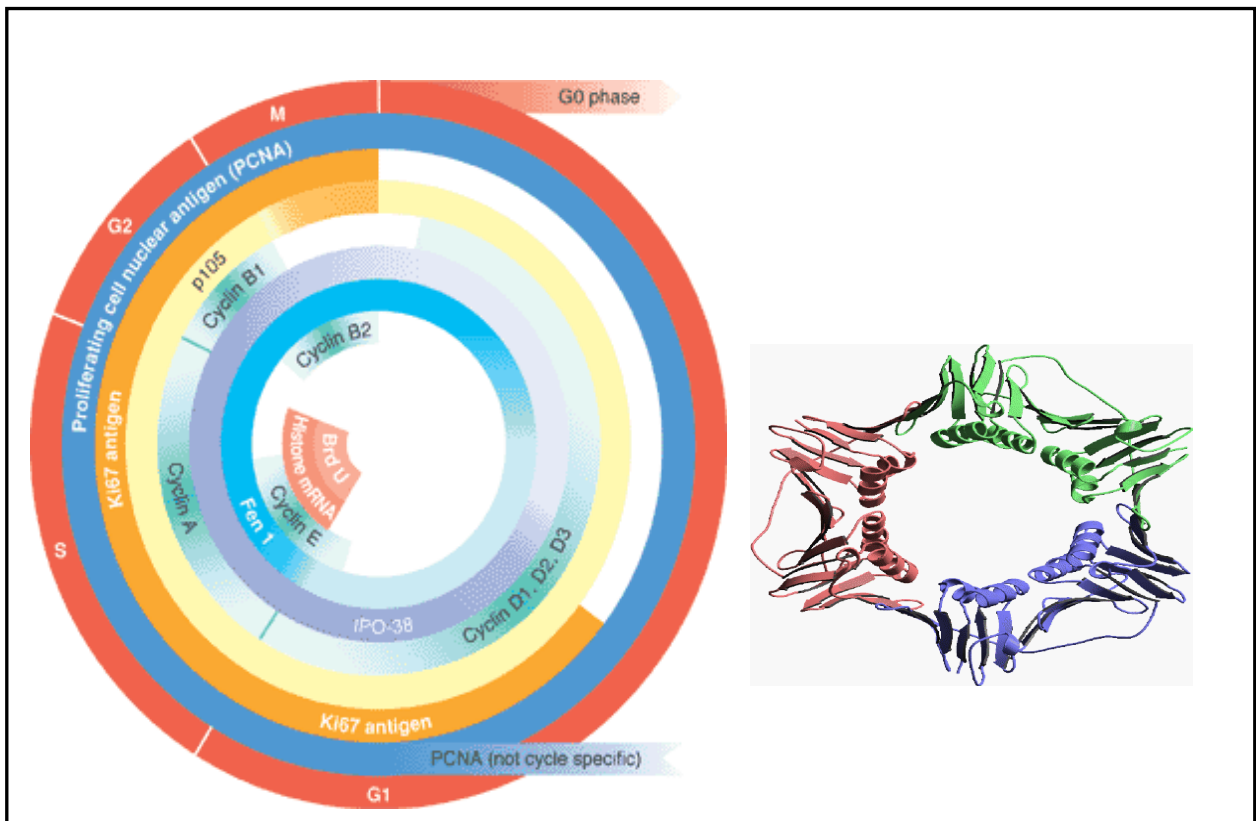


Fig. 8 Expresión de PCNA en el ciclo celular (izquierda) y molécula de PCNA (derecha) (<http://www.answers.com>)

Así como, para la función testicular normal es indispensable una dotación adecuada de células germinales en los túbulos seminíferos, para asegurar el éxito reproductivo de los animales, también es necesario que estas poblaciones de células necesitan ser limitadas mediante mecanismos de muerte celular o apoptosis (Young *et al.*, 1999; Russell *et al.*, 2002)

5.12 Generalidades de Apoptosis

Es una forma de muerte celular, cuyo objetivo es eliminar células que ya no son necesarias, a través de la activación de una serie coordinada y programada de acontecimientos internos. Afecta a células aisladas o a pequeños grupos celulares, eliminándolos con un compromiso mínimo del tejido adyacente (Cotran *et al.*, 2002).

La muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo fisiológico normal, que cumple un rol fundamental en el mantenimiento de tejidos adultos y en el desarrollo embrionario (Young y Nelson., 2001; Cooper, 2002).

Es un componente integral de la función testicular y limita la población de células germinales y previene la maduración de células aberrantes (Young y Nelson., 2001).

Estudios inmunohistoquímicos para detección de apoptosis en Liebre (*Lepus europaeus*), ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) y hámster ruso (*Phodopus sungorus*), han establecido que en respuesta al fotoperíodo, alteraciones en las concentraciones hormonales, temperatura y exposición a toxinas, la apoptosis es una forma de muerte celular en el testículo (Young *et al.*, 1999; Štrbenc y Bavdek, 2001).

Las células apoptóticas se caracterizan por presentar: constricción celular, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, formación de cuerpos apoptóticos y fagocitosis por células adyacentes (Young y Nelson., 2001; Cotran *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 2002). Además, de las alteraciones estructurales, ocurren modificaciones bioquímicas como fragmentación de proteínas del citoesqueleto y de la estructura nuclear, enlaces cruzados entre proteínas, fragmentación de ADN y presentación de moléculas de reconocimiento fagocitario por parte de macrófagos o células adyacentes (Schwartzman y Cidlowski, 1993; Cotran *et al.*, 2002). La apoptosis no produce un efecto inflamatorio en el tejido circundante, a diferencia de la necrosis cuyas células presentan alteración en la bomba sodio-potasio con la consiguiente

retención de agua provocando tumefacción celular , aumento en el tamaño de organelos, especialmente las mitocondrias y cambios en el núcleo, llegando finalmente, a la ruptura de la membrana plasmática, con el consiguiente vaciamiento del contenido celular al espacio extracelular, afectando a las células contiguas y generando una reacción inflamatoria aguda (Schwartzman y Cidlowski., 1993)(Fig. 9).

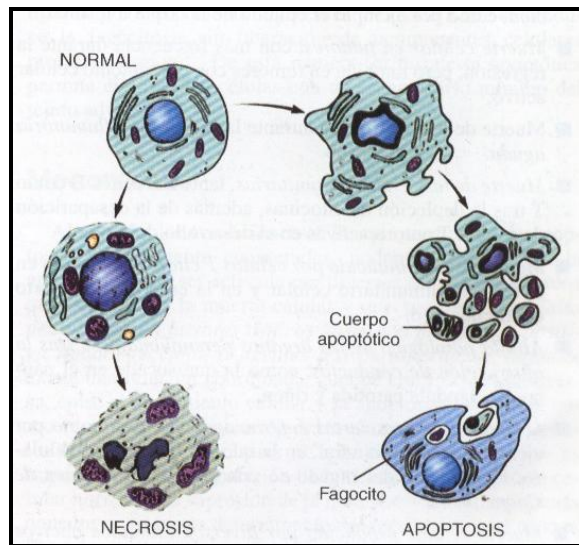


Fig.9 Cambios estructurales secuenciales que se observan en la necrosis por coagulación (izquierda) y la apoptosis (derecha) (Cotran *et al.*, 2002)

Según Cotran *et al.*, 2002 las etapas de la apoptosis son:

1.- Vía de señalización:

Los estímulos apoptóticos son transmitidos a través de la membrana plasmática, siendo determinantes positivos o negativos de apoptosis, entre ellos la presencia o ausencia de hormonas, factores de crecimiento y citoquinas, interacciones receptor- ligando que generan señales de activación de muerte celular como son los receptores de *Factor de Necrosis Tumoral* (TNF). Los estímulos como: glucocorticoides unidos a receptores nucleares, agentes físico-químicos como calor y radiación, hipoxia e infecciones virales se dirigen directamente al interior de la célula.

2.- Control e integración:

Esta fase es llevada a cabo por proteínas específicas que conectan las señales con la fase de ejecución de muerte celular. Un modelo es la transmisión directa mediante proteínas adaptadoras fasL-fas y destrucción de células efectoras por linfocitos T citotóxicos. Otro modelo es el de los miembros de la familia Bcl-2 con una función mitocondrial reguladora.

3.- Fase de ejecución:

En esta etapa convergen múltiples señales y mecanismos reguladores, siendo las caspasas las que inician y median esta fase.

4.- Eliminación de células muertas:

Las células apoptóticas y sus fragmentos presentan moléculas marcadoras en su superficie (fosfatidilserina y trombospondina (glucoproteína) las que son reconocidas precozmente por macrófagos adyacentes.

Las caspasas, son una familia de cistein- proteasas, que tienen la capacidad exclusiva para fragmentar residuos de ácido aspártico. Estas enzimas existen en la célula como zimógenos inactivos, que para su activación deben sufrir una autoproteólisis o proteólisis por otras caspasas, una vez recibida la señal de apoptosis. Las caspasas desestabilizan y destruyen al citoesqueleto, alteran las proteínas estructurales, perdiendo el contacto entre células, destruyen de la membrana nuclear, inhiben la replicación y reparación del ADN y lo fragmentan por activación de la endonucleasa CAD (Caspase- activated deoxyribonuclease) y además, liberan señales para la fagocitosis (Schwartzman y Cidlowski., 1993; Cotran *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 2003).

La familia de las caspasas, en la actualidad, tiene más de 10 miembros que se dividen dependiendo de su función y el orden con el que son activadas: iniciadoras y ejecutoras.

Caspasas iniciadoras: Son activadas por autoproteólisis al unirse a Apaf-1, caspasa 9 y la caspasa 8 o 10 estimulada por la interacción de tipo fas L –fas.

Caspasa ejecutoras: Son las responsables de los cambios celulares apoptóticos, caspasa 3, 6, 7 (Cotran *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 2003).

5.13 Vías de activación de la apoptosis

Existen 2 vías más importantes que están involucradas en el proceso de activación de las caspasas y apoptosis en las células mamíferas.

Vía extrínseca : Implica la transmisión directa de señales mediante la unión de ligandos a receptores de la superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral situados en la membrana (Cotran *et al.*, 2002).

Vía Intrínseca: Involucra acontecimientos en las mitocondrias en los cuales están implicados el citocromo c, el que genera una reacción en cadena de activación de las caspasas induciendo finalmente la muerte celular programada (Sinha *et al.*, 2003).

1.- Vía extrínseca

Algunos polipéptidos secretados, señalizan la muerte celular programada que pertenecen a la familia del TNF, que se unen a los receptores de TNF, Fas y otros. Uno de los miembros de ésta familia es el receptor de superficie celular denominado Fas, una proteína tipo I localizada en la membrana plasmática de las células germinales testiculares y su ligando FasL, una proteína tipo II localizada en la membrana plasmática de las células de Sertoli con un importante rol en el control de muerte celular (Lee *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1999). La unión de Fas L a Fas induce la trimerización de Fas receptor, las porciones citoplasmáticas de los receptores tienen un dominio de muerte (DD), que se une a moléculas adaptadoras FADD (Fas associated death domain). FADD contiene dominio efector de muerte o DED en la región terminal (Lee *et al.*, 1997; Sinha *et al.*, 2003).

El complejo Fas/FADD se une al dominio efector de muerte de las caspasas iniciadoras 8 o 10 activándolas por autoruptura y, entonces, éstas caspasas pueden activar otras caspasas posteriores, iniciando una cascada de caspasas que conduce a la muerte celular (Lee *et al.*, 1997; Kierszenbaum *et al.*, 2001; Cooper, 2002; Cotran *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 2003) (Fig. 10).

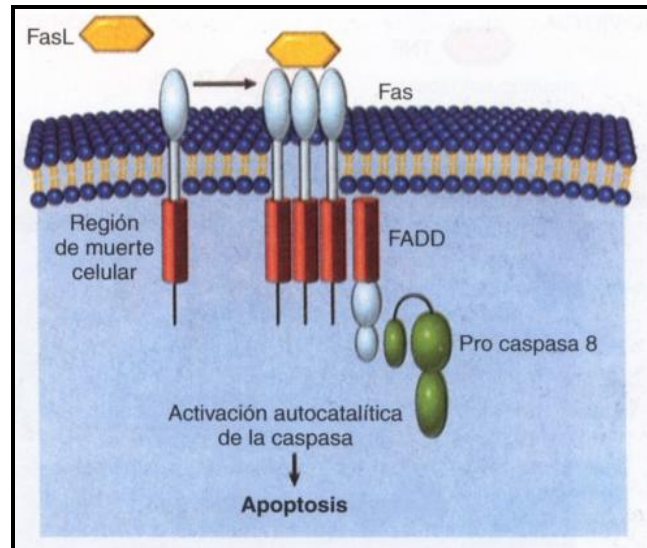


Fig.10 Señalización mediada por Fas, activación de la caspasa e inducción de muerte celular. Trimerización del receptor Fas y unión de FADD por un dominio de muerte (Cotran *et al.*, 2002)

La activación de uno de los receptores TNF (TNF R1) por la citoquina TNF puede producir apoptosis al asociarse el receptor con la proteína adaptadora TRADD que se une a FADD y causa apoptosis por activación de la caspasa. Sin embargo, en ciertas condiciones la unión de TNF R1 a TRADD se continúa con la unión a otras proteínas adaptadoras, activando el factor de transcripción llamado Factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) al estimular la degradación previa de su inhibidor (I $\kappa\beta$). El sistema regulador de la transcripción NF- $\kappa\beta$ /I $\kappa\beta$ es importante para la supervivencia celular y para diversas respuestas inflamatorias (Lee *et al.*, 1997; Kierszenbaum *et al.*, 2001; Cooper, 2002; Cotran *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 2003).

La caspasa 8 no sólo rompe otras caspasas, sino también rompe un miembro de la familia Bcl-2 denominado Bid. Bid induce apoptosis, se encuentra inactivado en el citosol, una

vez activado se transloca a la mitocondria, donde altera la membrana y se libera el citocromo c al citosol, activando a la caspasa 9, amplificando aun más la cascada de caspasas (Cotran *et al.*, 2002) (Fig. 11).

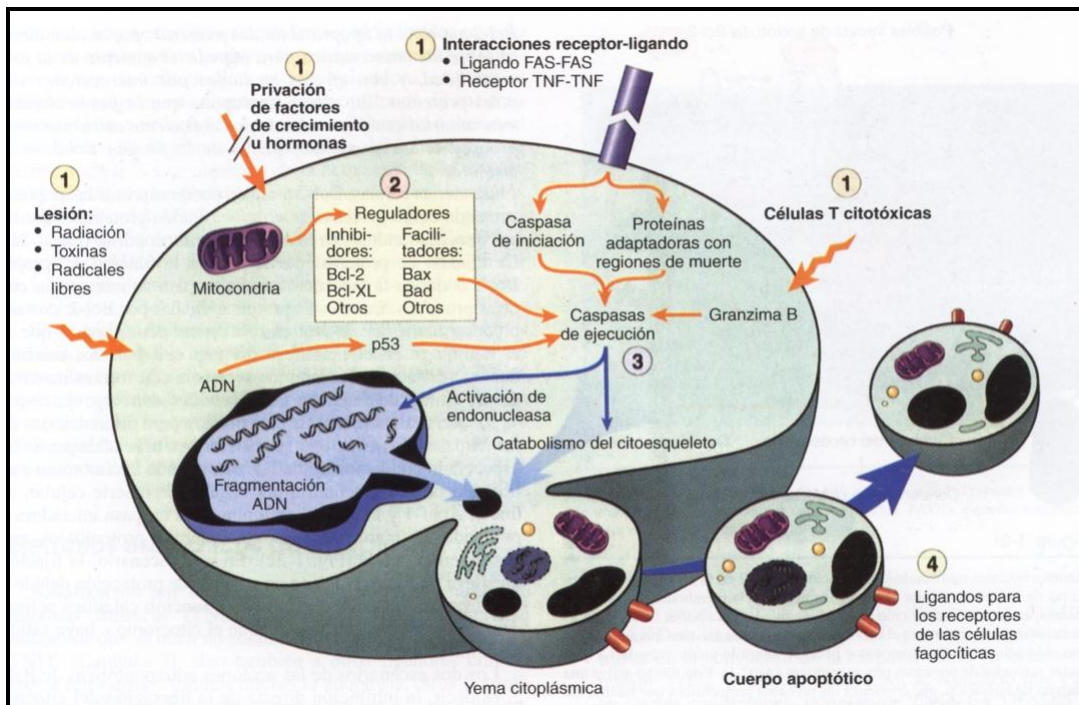


Fig.11 Representación esquemática de la apoptosis. Marcados con (1) aparecen los múltiples estímulos de la apoptosis, vía extrínseca. (2) Control y regulación influidos por miembros de la familia Bcl-2, que pueden inhibir o facilitar la muerte celular, Vía intrínseca (3) Las caspasas de ejecución. (4) Formación de cuerpos apoptóticos (Cotran *et al.*, 2002)

2.- Vía Intrínseca

Diversas proteínas regulan los procesos de permeabilidad mitocondrial, pero los más importantes son los miembros de la familia Bcl-2, que se localizan en la membrana mitocondrial externa, retículo endoplásmico y cubierta nuclear. Su función está regulada por otros miembros de la familia, al unirse selectivamente a Bcl-2, éstas proteínas pueden alterar las actividades y favorecer la apoptosis (Bax, Bad, Bid, Bik, Bak, Bcl-xS) o inhibir este proceso (Bcl-xl, bcl-2, Bcl-w, mcl-1), estos reguladores actúan en la mitocondria ya que forman poros en la membrana interior, disminuyendo el potencial de membrana con tumefacción

mitocondrial y aumentan la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa con la liberación del citocromo c al citosol, el que normalmente se localiza entre las membranas internas y externas de la mitocondrias, siendo un componente integral de la vía respiratoria. Se une y activa al factor activador de proteasas (Apaf-1) que a su vez por medio del dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) en el amino terminal se asocia con el zimógeno de la caspasa iniciadora 9, resultando en su activación y la posterior proteólisis de las caspasas ejecutoras 3, 6,7 (Young y Nelson., 2001; Kierszenbaum *et al.*, 2001; Cooper, 2002; Cotran *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 2003) (Fig. 12).

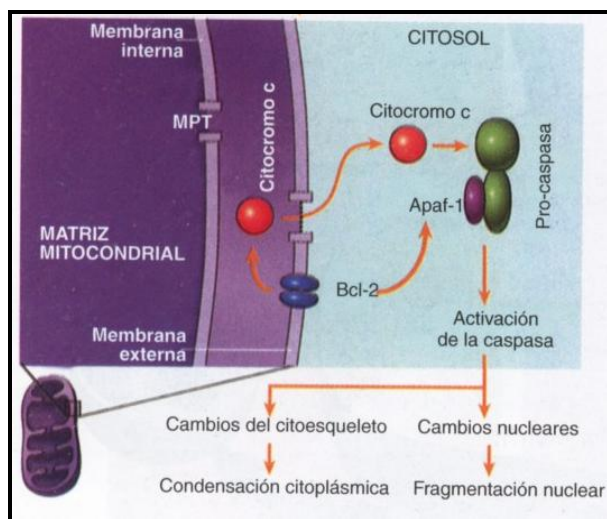


Fig.12 Acontecimientos mitocondriales y efectos de Bcl-2 (Cotran *et al.*, 2002).

En ciertas células, Bcl-2 también suprime la apoptosis, fijando proteínas del citosol y secuestrándolos en la membrana mitocondrial. La fijación de Apaf-1 tiene un carácter de protección, ya que lo secuestra e inhibe su función catalítica activadora de caspasas, incluso aunque el citocromo c haya salido de la mitocondria. La otra manera de suprimir la apoptosis es por acción directa sobre las mitocondrias impidiendo el aumento de la permeabilidad, la que está determinada por el cociente entre miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (Kierszenbaum *et al.*, 2001; Cotran *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 2003).

Además, la exposición de células a radiaciones o a agentes quimioterápicos induce apoptosis a través de un mecanismo que se inicia con la lesión de ADN y que implica al gen de supresión tumoral p53. Este gen se acumula cuando el ADN está lesionado y detiene el ciclo celular (en la fase G1), para que se produzca la reparación. Sin embargo, si esta fracasa, el gen p53 desencadena la apoptosis, por lo tanto, estimula normalmente éste proceso. Si este gen muta o está ausente, favorecen la supervivencia celular (Cotran *et al.*, 2002).

5.14 Método de detección de apoptosis

El estudio e identificación específica de las alteraciones moleculares, bioquímicas y morfológicas que ocurren en las células durante las etapas de la apoptosis, son la base para distintos métodos de detección.

La inducción de la fragmentación internucleosomal de ADN es la característica más importante. El método más comúnmente aplicado es TUNEL (terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick-end labeling) que detecta el extremo libre 3' -OH de las hebras de ADN mediante nucleótidos modificados y marcados con digoxigenina (Billig *et al.*, 1996; Blottner *et al.*, 2007) (Fig.13)

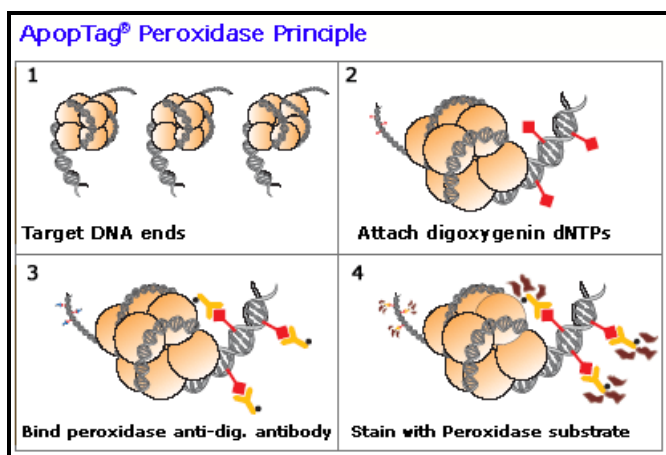


Fig.13 Método de TUNEL (www.qbiogene.com)

6. Objetivo General

Buscar indicadores morfológicos testiculares adecuados para determinar estados de actividad reproductiva durante un ciclo anual en *Ch. laniger*, en confinamiento.

7. Objetivos Específicos

- a) Describir las características histológicas de los testículos de *Ch.laniger*, en confinamiento durante un ciclo anual.
- b) Medir y comparar el diámetro tubular, altura del epitelio tubular y el recuento celular diferencial entre los distintos meses del año.
- c) Cuantificar y comparar los índices: Gonado-somático (IGS), espermatogénico, apoptótico y proliferativo en testículo de *Ch. laniger* en confinamiento, durante un ciclo anual.

8. Material y métodos

Se utilizaron, mensualmente durante un año, testículos de 3 chinchillas adultas, clínicamente sanas y provenientes de plantales de la Región Metropolitana, mantenidas con luz natural y alimentadas en base a *pellets*, heno de alfalfa y agua *ad libitum*.

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de Tiopental sódico al 2,5%, administrado por vía intraperitoneal..

Registros morfométricos macroscópicos:

Se obtuvo el peso corporal de cada animal (g), se extrajeron y pesaron ambos testículos, y se determinó el índice gonado somático (IGS) de acuerdo a la siguiente fórmula: (Adaro *et al.*, 1999)

$$\text{IGS (\%)} = \text{Peso órgano (g)} / \text{Peso corporal (g)} \times 100$$

Histología e inmunohistoquímica:

Los testículos fueron fijados en solución de Bouin Holland e incluidos en parafina sólida y se obtuvieron cortes de 5 µm de grosor, aproximadamente 15 cortes por testículo.

En los cortes se aplicaron las siguientes técnicas:

- H-E y PAS (ácido peryódico Schiff) para apreciar la morfología general del tejido y diferenciar las membranas basales.
- Método de TUNEL, para detectar apoptosis, para lo cual se utilizó un Kit apoptótico ApopTag® Peroxidase Kits S7100, Chemicon, USA, previa estandarización de la técnica.

- Para detectar la presencia de células en proliferación, se utilizó anticuerpo monoclonal primario anti- PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular SIGMA P-8825, Dinamarca). Como Anticuerpo secundario se usó el anticuerpo biotilado anti-inmunoglobulinas de ratón (Biotinylated Rabbit Anti-Mouse Inmunoglobulins, DAKO E 0354, Dinamarca). Para amplificar la reacción, se agregó un conjugado peroxidasa-estreptavidina (Peroxidase-Conjugated Streptavidin, DAKO Code N° P0397). La reacción enzimática se visualizó con un sustrato/cromógeno (DAB, DAKO K 3465, USA.) que dió un color café a la inmunomarcación positiva.

Los cortes histológicos fueron observados y fotografiados en un microscopio Nikon, modelo Eclipse 600, con videocámara incluida.

Registros morfométricos microscópicos:

1. Compartimento tubular y peritubular

En cada animal se observaron 10 túbulos seminíferos(T.S) cortados transversalmente y en cada uno de estos se midieron los siguientes indicadores, con un aumento de 200X:

1.1. Diámetro tubular (D.T) : Se registraron en su eje longitudinal y transversal.

1.2. Altura del epitelio tubular (A.E) : Se midieron cuatro puntos en los mismos ejes que se obtuvo el D.T, sin incluir el lúmen.

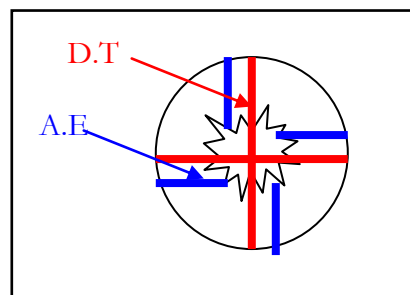


Fig.14 Esquema de diámetro y altura del epitelio en el T.S.

1.3. Se realizó un recuento celular diferencial de células de la línea espermatogénica , células de Sertoli y células mioides del peritúbulo. Se aplicó el índice espermatogénico (IE) propuesto por Grocock y Clarke (1974), con una escala de valor que va de 0 a 5, donde 5: representa espermogénesis completa con abundantes espermios y, 0: sólo presencia de espermatogonias y células Sertoli. Obteniéndose, además, el valor mensual que mas se repitió (moda).

Se obtuvieron los promedios mensuales de los indicadores.

2. Compartimento intersticial :

Se describieron las características histológicas de estos compartimentos, se hizo un recuento de 50 células de Leydig, con un aumento de 400X, para determinar índice apoptótico y proliferativo. Se obtuvieron los promedios mensuales de cada índice.

9. Análisis estadístico

Los valores obtenidos en los registros morfométricos macroscópicos y microscópicos se describieron a través de la media aritmética y desviación estándar. Se determinó la significancia estadística de los resultados mediante un análisis de varianza y la prueba de Tukey para comparar los valores entre los meses estudiados ($p < 0,05$). Además, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre las variables.

10. Resultados:

Se realizó un análisis histológico descriptivo y morfométrico de los compartimentos testiculares durante un ciclo anual. Identificando los siguientes indicadores: Diámetro de túbulos seminíferos (DT), Área del túbulo seminífero (AT), Altura del epitelio seminífero (AE), Índice gonadosomático (IGS) e Índice espermatogénico (IE) obteniéndose el promedio mensual de cada uno.

i) Compartimento tubular:

En los meses de diciembre y enero el epitelio seminífero presentó un aspecto vacuolado y desorganizado, lumen amplio y estrellado, con restos celulares en el interior. Se observaron escasa espermatogonias de forma redondeada e intensamente teñidas, espermatocitos I, espermátidas redondas y elongadas y sólo algunos espermatozoides. El citoplasma de las células de Sertoli se puede distinguir de forma piramidal, levemente eosinofílico y núcleo indentado y basófilo. En el mes de febrero el epitelio seminífero presenta vacuolas de gran tamaño, se observa una mayor cantidad células de Sertoli y escasas células de la línea espermatogénica (Foto 1).

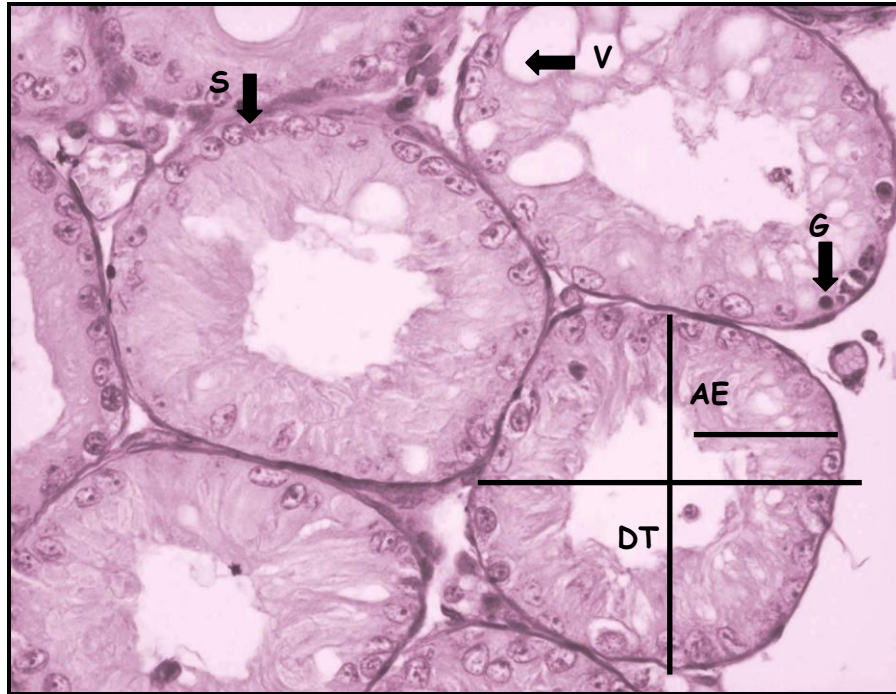


Foto 1. Corte de testículo de *Chinchilla laniger*, mes de febrero. Teñido con H-E PAS Donde se destacan TS en reposo gonadal , el epitelio seminífero está constituido por algunas espermatogonias (G) y células de Sertoli (S) además se indica el diámetro tubular (DT), altura epitelio seminífero (AE) y vacuolas de gran tamaño(V) 200X.

En los meses de marzo y abril aún se puede apreciar vacuolas en el epitelio seminífero y el lumen tubular se encuentran distintos tipos celulares de la línea espermatogénica, incluyendo algunos espermatozoides y detritus celulares. En éste período se distingue sólo el núcleo de las células de Sertoli y se observa un brusco aumento en la cantidad de espermatogonias, espermatocitos y predominio de espermátidas redondas, e incluso en algunos túbulos existen espermatozoides. En el mes de mayo se encuentra una mayor cantidad de túbulos seminíferos con espermatogénesis completa (Foto2).

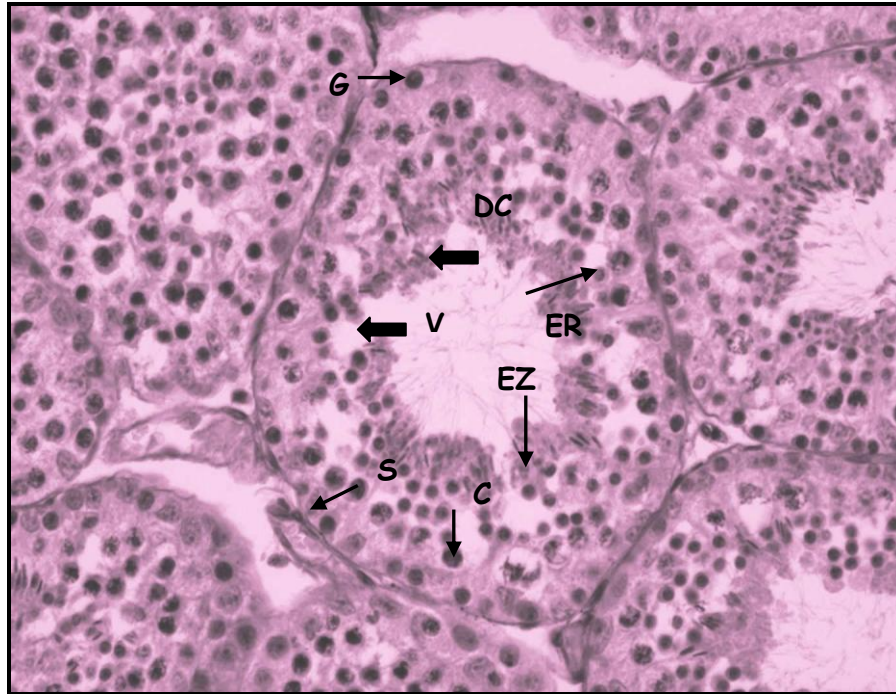


Foto 2. TS de testículo de *Chinchilla laniger*. Teñido con H-E PAS correspondientes al mes de mayo, en período de recrudescencia gonadal. Donde aún se pueden apreciar vacuolas (V), lumen tubular presenta detritus celulares (DC), se distinguen sólo los núcleos de las células de Sertoli (S) y se aprecia un brusco aumento en la cantidad de espermatogonias (G), espermatocitos (C) y espermatidas redondas (ER), e incluso en algunos túbulos existen espermatozoides (EZ) 200X.

En los meses de Junio, Julio y Agosto se aprecia en la mayoría de los T.S espermatogénesis completa, con un aumento claro en el recuento celular y mayor cantidad de células en división que el período anterior. Con la aparición de gran cantidad de espermatidas elongadas y espermatozoides ubicados en la zona más adluminal del túbulo. El lumen está más organizado, amplio y regular.

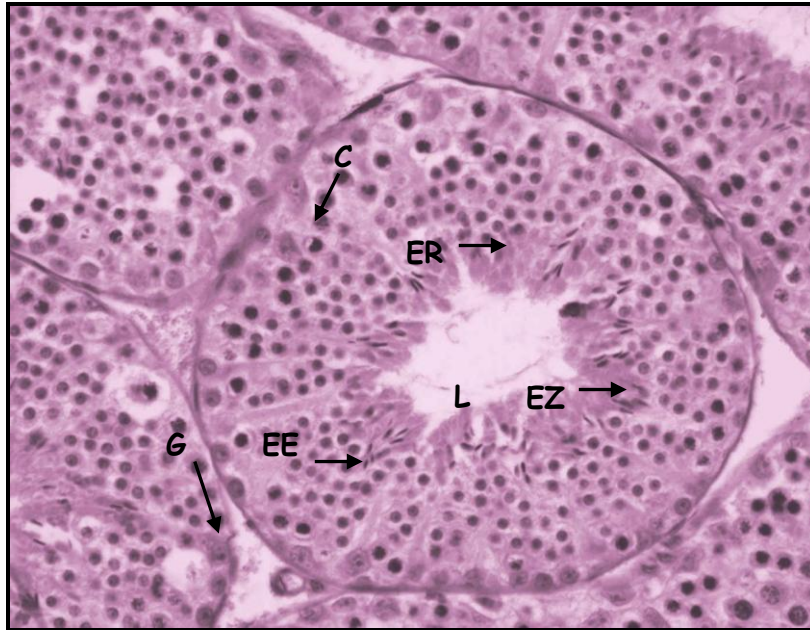


Foto 3. TS de testículo de *Chinchilla laniger*. Teñido con H-E PAS correspondientes al mes de julio, en actividad gonadal, donde se aprecia espermatogénesis completa, un aumento claro en la celularidad, presentando espermatogonias (G), espermatocitos (C), espermatidas redondas (ER), espermatidas elongadas (EE) y espermatozoides (EZ) ubicados en la zona más adluminal del túbulo. El lumen (L) está más organizado, amplio y regular. 200X.

En los meses de septiembre, octubre y noviembre se aprecia una disminución en la celularidad de los TS, sin embargo, en los meses de septiembre y octubre, algunos túbulos aún presentan espermatogénesis completa. En el mes de noviembre el epitelio germinal se aprecia desorganizado y vacuolado, con escasa espermatidas elongadas y espermatozoides y el lumen tubular de aspecto estrellado, con abundantes detritus celulares (Foto 4).

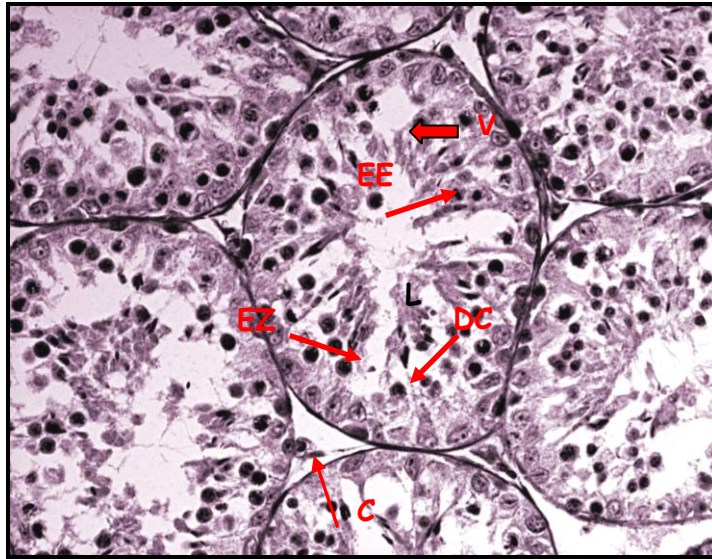


Foto 4. TS de testículo de *Chinchilla laniger*. Teñido con H-E PAS correspondientes al mes de noviembre, en regresión gonadal, el epitelio germinal se aprecia desorganizado y vacuolado (V) con una disminución en la celularidad, escasa presencia de espermatocitos (C), espermátidas elongadas (EE) y espermatozoides (EZ), además, un lúmen tubular de aspecto estrellado y con abundantes detritus celulares (DC).200X

Como se indica en la Tabla 1, los resultados del recuento total de células del epitelio de los TS mostraron que el mes de febrero (12.50 ± 9.26 células por túbulo) posee diferencias significativas ($p < 0,05$) en comparación con los otros meses estudiados. En la tabla 12 se observan las correlaciones de Pearson positivas y significativas entre el recuento celular e indicadores estudiados.

Además, en la Tabla 1, se pueden observar los resultados del recuento celular diferencial de todo el año con sus valores mensuales, desviaciones típicas y diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) donde el mes de febrero presentó el menor promedio de todos los tipos celulares de la línea espermatogénica. En el Gráfico 1, se muestran los resultados para espermatogonias, espermatocitos I, espermátidas redondas y espermátidas elongadas, respectivamente.

Con respecto a las células de Sertoli, en la Tabla 1 y Gráfico 1 se ve que el mes de febrero mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), con todos los meses estudiados.

Tabla 1. Promedio mensual del recuento total y diferencial del compartimento tubular. Tinción HE- PAS

Mes	N° espermatogonias	N° espermatocitos	N° espermátidas redondas	N° espermátidas elongadas	N° células totales/túbulo	N° células sertoli	N° células mioides
Enero	14.30 ± 5.21 b	51.33 ± 13.68 b	65.67 ± 28.23 cde	39.07 ± 27.63 bc	170.37 ± 32.13 bcd	11.70 ± 4.20 de	7.70 ± 2.1 bc
Febrero	4.50 ± 2.01 a	5.50 ± 5.76 a	0.90 ± 1.52 a	1.60 ± 5.06 a	12.50 ± 9.26 a	18.10 ± 5.36 f	9.60 ± 1.96 d
Marzo	19.33 ± 19.33 cde	86.20 ± 15.35 de	64.90 ± 45.69 bcde	40.60 ± 29.49 bc	211.03 ± 51.31 ef	4.53 ± 2.75 a	5.10 ± 1.49 ab
Abril	17.10 ± 3.00 bcd	89.03 ± 8.95 de	73.07 ± 41.12 de	36.50 ± 33.21 b	215.70 ± 27.05 ef	6.57 ± 2.28 ab	5.73 ± 1.78 ab
Mayo	20.90 ± 4.47 def	92.57 ± 12.74 de	80.90 ± 45.90 e	61.33 ± 31.34 bc	255.70 ± 30.51 g	8.90 ± 3.02 bcd	6.80 ± 1.78 bc
Junio	16.77 ± 4.73 bc	82.73 ± 10.32 d	43.67 ± 43.76 bcd	51.27 ± 22.99 bc	194.43 ± 43.67 de	9.00 ± 3.50 bcd	7.87 ± 1.87 bc
Julio	23.93 ± 4.48 f	85.47 ± 18.24 d	72.23 ± 47.74 de	54.97 ± 31.85 bc	236.60 ± 44.44 fg	7.57 ± 2.61 bc	8.77 ± 2.19 bc
Agosto	21.57 ± 5.78 ef	99.07 ± 16.60 e	40.80 ± 43.11 bcd	53.23 ± 41.00 bc	214.67 ± 39.81 ef	9.47 ± 2.84 cde	9.03 ± 2.24 cd
Septiembre	19.37 ± 4.41 cde	83.37 ± 10.66 d	39.30 ± 40.54 bcd	66.23 ± 33.35 c	208.27 ± 41.86 ef	9.73 ± 2.27 cde	8.30 ± 1.91 bc
Octubre	20.17 ± 4.06 cdef	69.70 ± 20.41 c	33.83 ± 36.56 abc	61.37 ± 32.06 bc	185.07 ± 46.83 cde	10.87 ± 2.73 de	9.33 ± 1.9 d
Noviembre	17.13 ± 3.03 bcd	62.20 ± 16.98 bc	30.13 ± 29.51 ab	44.43 ± 30.06 bc	153.90 ± 40.90 bc	12.23 ± 3.75 e	9.73 ± 1.44 d
Diciembre	14.00 ± 3.99 b	52.20 ± 10.99 b	33.20 ± 26.04 abc	43.33 ± 20.68 bc	142.73 ± 23.79 b	10.73 ± 3.13 de	9.00 ± 1.72 cd

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

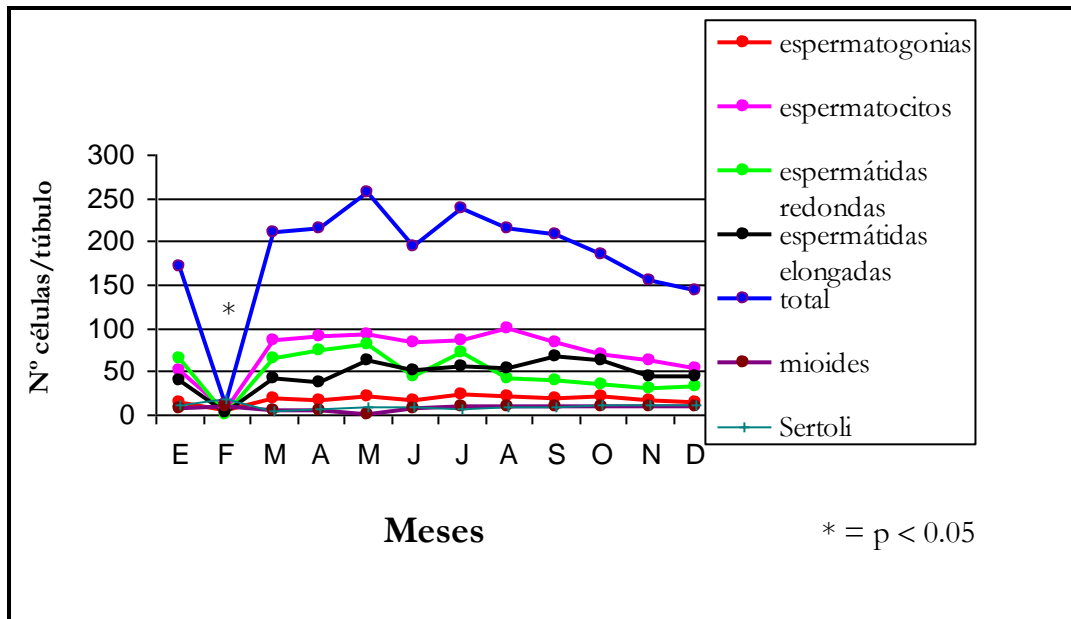


Gráfico 1. Promedio mensual del conteo total y diferencial.

Proliferación celular detectada con PCNA

En la Tabla 2, se indican los resultados anuales del recuento total de células inmunomarcadas y las diferencias estadísticas obtenidas entre los meses. Así se ve, que el mes de febrero registró el mínimo valor promedio (6.20 ± 5.96 células inmunomarcadas /Túbulo), el que mostró diferencias estadísticas con todos los otros meses ($p < 0,05$). Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre los recuentos celulares totales proliferativos (IPt) y apoptóticos (IAt) encontrándose una correlación de Pearson inversa ($r = -0.64$; $p < 0.05$) además, con los distintos indicadores estudiados (Tabla 12).

Al observar los resultados del recuento celular diferencial a lo largo del año, el mes de febrero fue el que presentó menor número de espermátogonias (2.4 ± 1.71) y espermátocitos (3.8 ± 5.79) con inmunorreacción positiva (Foto 5, 6, 7 y 8). En la Tabla 2 y Gráfico 2 se pueden observar diferencias estadísticas y valores donde febrero fue el que presentó

diferencias significativas ($p < 0,05$), con todos los meses, tanto para espermatogonias como para espermatoцитos I.

Con respecto a las células de Sertoli, en la Tabla 2 y Gráfico 3 se observa que los meses de enero, febrero y marzo registraron los valores promedios más bajos, siendo febrero estadísticamente distinto con ambos meses. Los mayores valores fueron en los meses de agosto, septiembre y octubre mostrando diferencias estadísticamente significativas entre agosto-septiembre y septiembre-octubre ($p < 0,05$). Además, se obtuvo un índice proliferativo para cada mes, donde enero mostró un 7,69 % y julio un 70,01 %. Pudiéndose observar con más detalles en la Tabla 3 y gráfico 4.



Foto 5. Corte de testículo con TS en febrero Sólo se muestran algunas espermatogonias (G) y espermatoцитos (C) en el lumen con inmunoreacción positiva 200X.

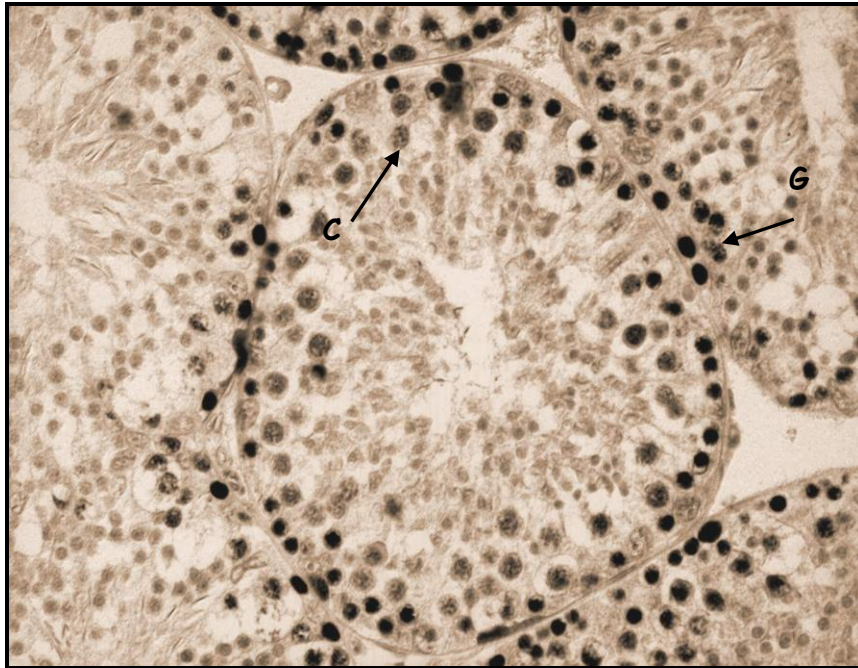


Foto 6. TS en el mes de abril donde se observan células de la línea espermatogénica en proliferación, espermatogonias (G) y espermatocitos I (C) 200X.

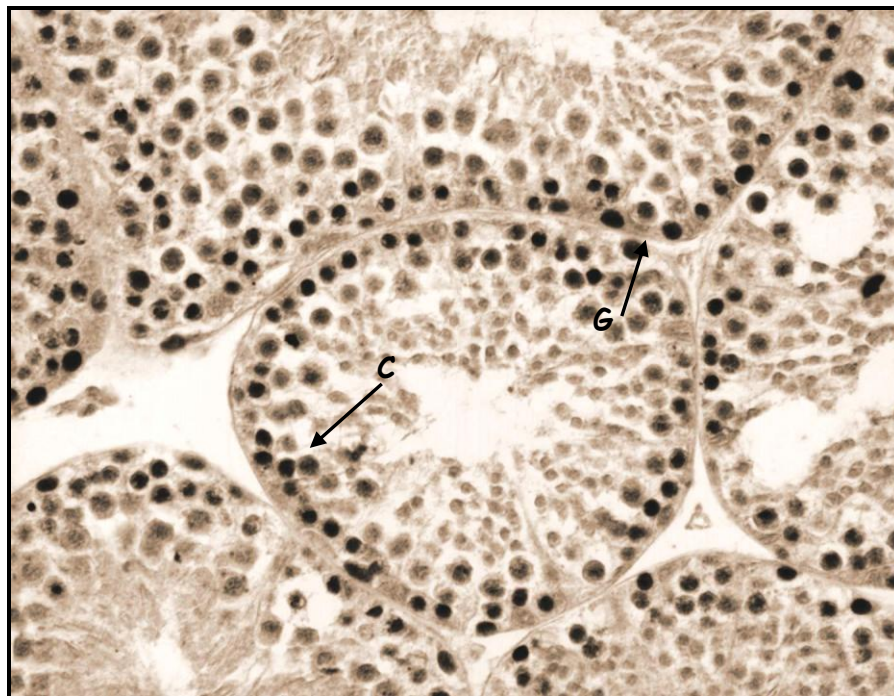


Foto 7. TS en julio donde se muestran espermatogonias (G) y espermatocitos I (C) PCNA positivas 200X.

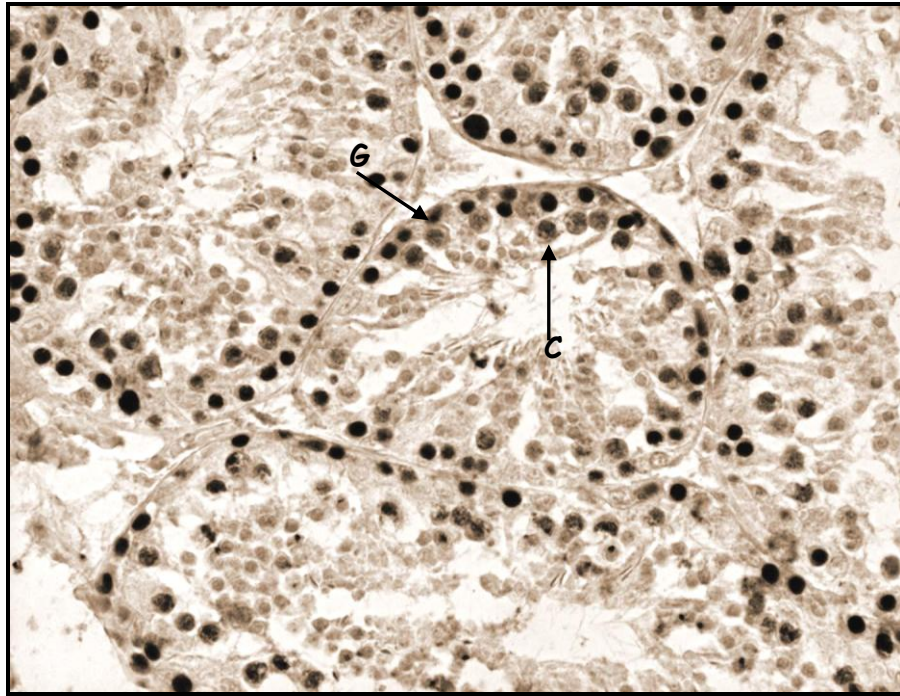


Foto 8. TS en noviembre donde se muestran espermatogonias (G) y espermatocitos I (C) con inmunoreacción positiva a PCNA. 200X.

Tabla 2. Promedio mensual del recuento total y diferencial de proliferación celular. Técnica PCNA.

Mes	N° espermatogonias	N° espermatoцитos	N° células totales inmunomarcadas/túbulo	N° células Sertoli
Enero	10.30 ± 5.30 b	31.10 ± 11.78 b	41.40 ± 13.21 b	0.90 ± 0.76 a
Febrero	2.40 ± 1.71 a	3.80 ± 5.79 a	6.20 ± 5.96 a	1.70 ± 0.82 ab
Marzo	11.97 ± 3.72 b	50.47 ± 15.90 cde	62.43 ± 16.18 cdef	0.83 ± 0.70 a
Abril	11.23 ± 3.54 b	43.80 ± 10.62 cd	55.03 ± 11.15 cd	2.10 ± 0.96 b
Mayo	18.07 ± 4.86 de	54.10 ± 15.30 de	72.17 ± 14.51 efg	4.13 ± 1.36 c
Junio	12.13 ± 4.75 b	46.80 ± 15.35 cde	58.93 ± 15.60 cd	4.63 ± 1.38 cd
Julio	20.53 ± 5.12 e	57.07 ± 17.23 e	77.60 ± 15.46 g	5.30 ± 1.49 d
Agosto	18.50 ± 5.81 de	56.37 ± 17.80 de	74.87 ± 16.64 fg	7.03 ± 1.30 f
Septiembre	16.27 ± 4.83 cd	50.17 ± 13.97 cde	66.43 ± 13.54 defg	5.47 ± 1.31 de
Octubre	13.03 ± 4.10 bc	49.13 ± 14.02 cde	62.17 ± 14.74 cde	6.50 ± 1.41ef
Noviembre	11.53 ± 3.12 b	39.97 ± 9.45 bc	51.50 ± 8.74 bc	5.37 ± 1.00 d
Diciembre	10.40 ± 3.38 b	30.33 ± 11.76 b	40.73 ± 10.89 b	2.20 ± 0.89 b

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05)

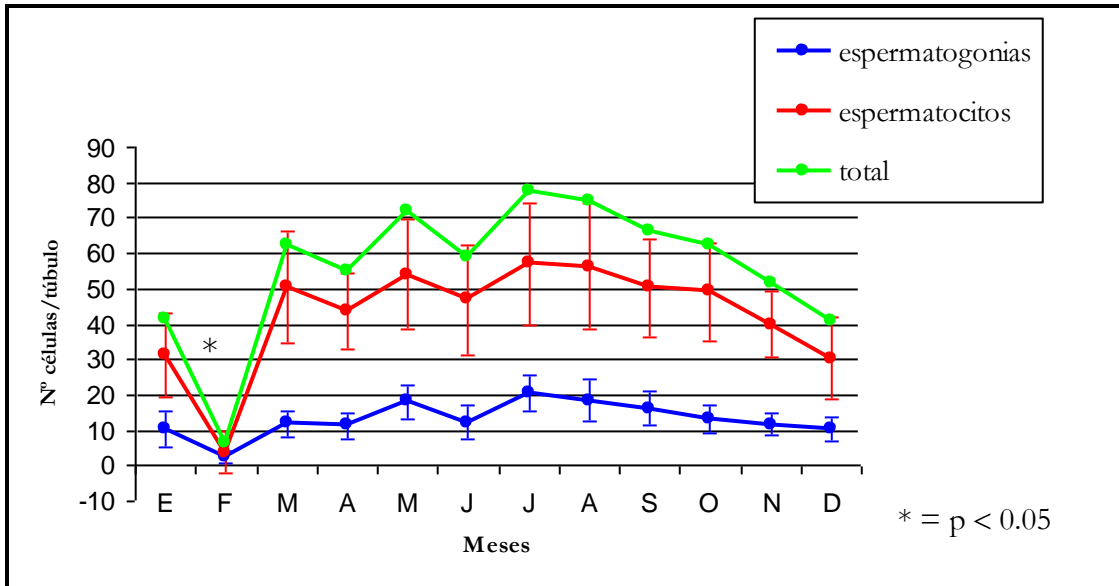


Gráfico 2. Promedio mensual del conteo total y diferencial de células inmunomarcadas positivamente con PCNA y desviaciones estándar.

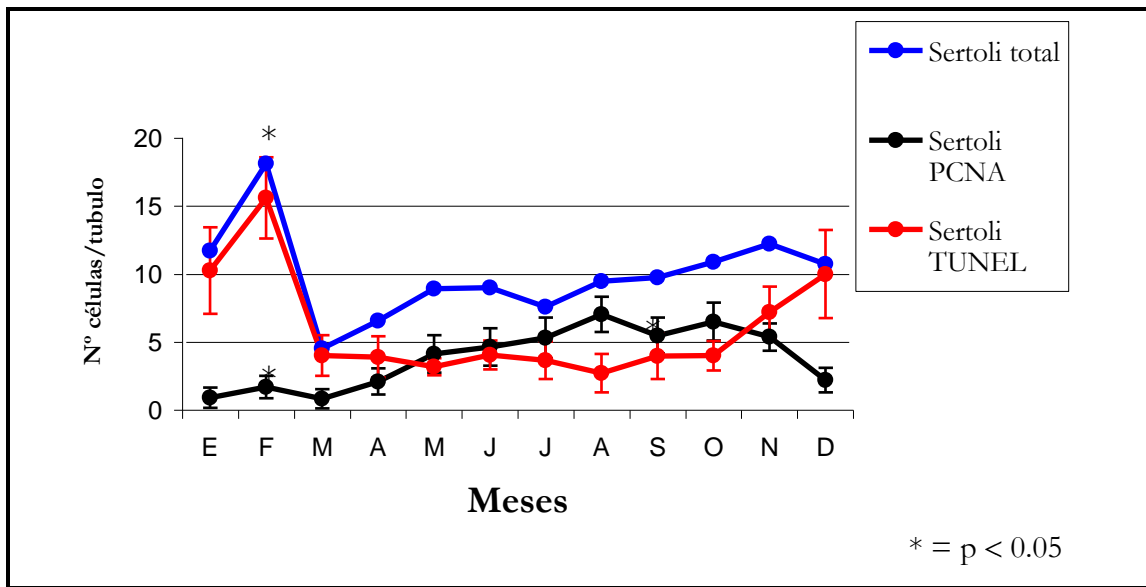


Gráfico 3. Promedio mensual de células de Sertoli inmunomarcadas positivamente con PCNA y TUNEL y desviaciones estándar.

Tabla 3. Índices proliferativo y apoptótico células de Sertoli mensuales

Mes	Promedio células inmunomarcadas PCNA	IP (%)	Promedio células inmunomarcadas TUNEL	IA(%)
enero	0.90 ± 0.76 a	7,69	10.25 ± 3.19 c	87,61
febrero	1.70 ± 0.82 ab	9,39	15.60 ± 2.99 d	86,19
marzo	0.83 ± 0.70 a	18,32	4.00 ± 1.49 a	88,30
abril	2.10 ± 0.96 b	31,96	3.90 ± 1.52 a	59,36
mayo	4.13 ± 1.36 c	46,40	3.20 ± 0.63 a	35,95
junio	4.63 ± 1.38 cd	51,44	4.05 ± 1.05 a	45,00
julio	5.30 ± 1.49 d	70,01	3.65 ± 1.39 a	48,22
agosto	7.03 ± 1.30 f	74,23	2.70 ± 1.42 a	28,51
septiembre	5.47 ± 1.31 de	56,22	3.95 ± 1.67 a	40,60
octubre	6.50 ± 1.41 ef	59,80	4.00 ± 1.08 a	36,80
noviembre	5.37 ± 1.00 d	43,91	7.2 ± 1.88 b	58,87
diciembre	2.20 ± 0.89 b	20,50	10.00 ± 3.23 c	93,20

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

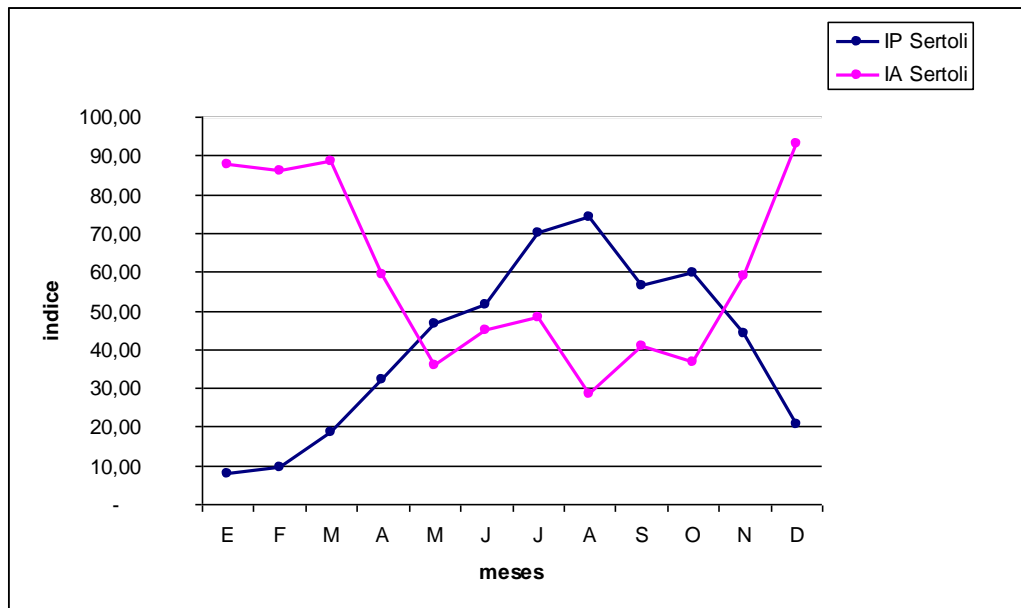


Gráfico 4. Promedios mensuales de índices proliferativo y apoptótico de células de Sertoli.

Apoptosis celular detectada con el método de TUNEL

Como se indica en la Tabla 4, los resultados del recuento total de células inmunomarcadas, el mes de febrero fue el que alcanzó el mínimo valor promedio (1.30 ± 1.25 células inmunomarcadas /Túbulo) el que mostró diferencias estadísticas ($p < 0,05$), con todos

los otros meses señalados en la misma tabla. Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre los recuentos celulares totales y los distintos indicadores estudiados (Tabla 12).

En la tabla 4 y Gráfico 5 se pueden observar los resultados del recuento celular diferencial en el ciclo anual y las diferencias estadísticas entre los meses. Además en las fotos 9, 10, 11 y 12 se aprecian cortes histológicos con inmunotinción positiva para los distintos meses del ciclo anual. Con respecto a las células de Sertoli, en la Tabla 4 y Gráfico 3 se ve que el mes de febrero mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con todos los meses. Además, se obtuvo un índice apoptótico para cada mes, donde agosto mostró un 28,51 % y diciembre un 93,2 % (Tabla 3 y grafico 4).

La correlación de Pearson (Tabla 12) entre los índices proliferativos (IPS) y apoptóticos (IAS) se encontró un $r = - 0.2$; ($p < 0.05$).

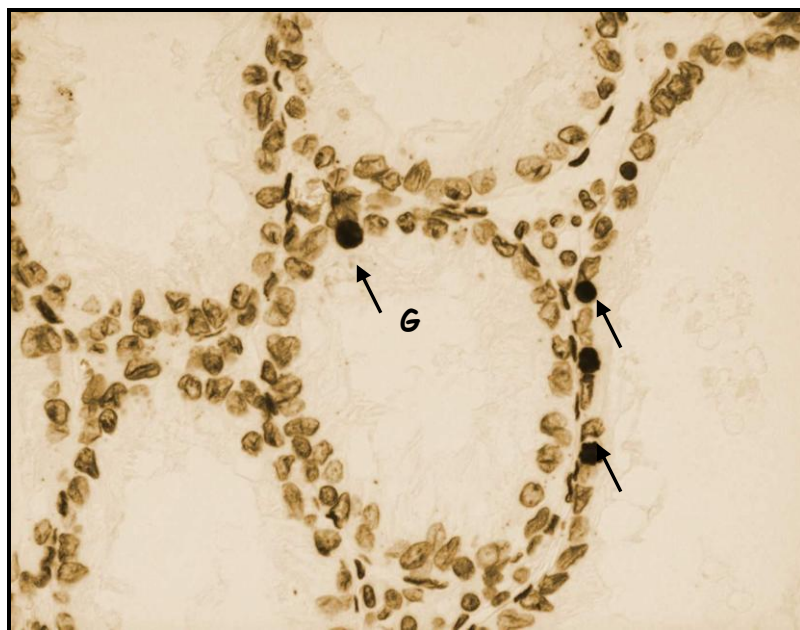


Foto 9. Corte de testículo donde se observan TS en el mes de febrero que muestran algunas espermatogonias (G) con reacción TUNEL positiva 200X.

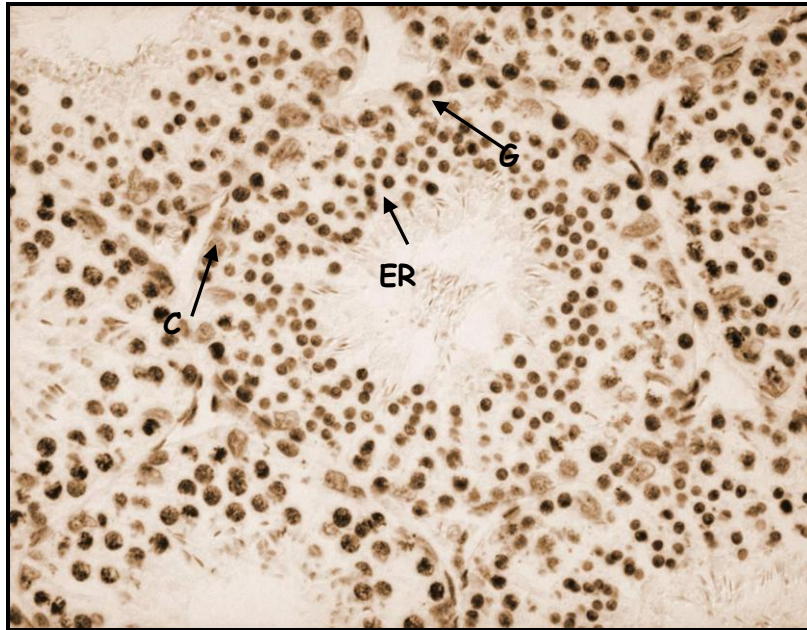


Fig. 10. TS en abril se observan espermatogonias (G), espermatocitos (C) y espermátidas redondas(ER) con reacción TUNEL positiva. 200X.



Fig. 11. TS en julio se aprecia escaso número de espermatogonias (G) y espermatocitos (C) con reacción apoptótica 200X.



Fig. 12. TS en noviembre donde se observan espermatogonias (G), espermatocitos (C), espermátidas redondas (ER) con reacción positiva a TUNEL 200X.

Tabla 4 Recuento total y diferencial de apoptosis celular. Técnica TUNEL.

Mes	N° espermatogonias	N° espermatocitos	N° espermátidas redondas	N° espermátidas elongadas	N° total células inmunomarcadas	N° células Sertoli
Enero	6.20 ± 3.65 de	24.95 ± 10.03 cd	47.35 ± 26.22 c	2.25 ± 6.17 a	80.75 ± 24.23 ef	10.25 ± 3.19 c
Febrero	1.30 ± 1.2 5 a	0 a	0 a	0 a	1.30 ± 1.25 a	15.60 ± 2.99 d
Marzo	3.65 ± 2.28 bc	42.20 ± 9.99 ef	11.80 ± 21.93 ab	25.00 ± 31.70 c	82.65 ± 35.29 ef	4.00 ± 1.49 a
Abril	7.00 ± 2.05 e	49.30 ± 16.32 f	45.00 ± 39.21 c	0 a	101.30 ± 25.64 f	3.90 ± 1.52 a
Mayo	2.50 ± 2.01 abc	36.00 ± 14.50 de	28.20 ± 24.22 bc	7.50 ± 16.63 ab	74.20 ± 35.54 def	3.20 ± 0.63 a
Junio	1.60 ± 1.10 ab	21.40 ± 10.39 bc	19.85 ± 22.02 ab	5.70 ± 10.82 ab	48.55 ± 24.69 bcd	4.05 ± 1.05 a
Julio	2.30 ± 1.34 abc	24.30 ± 4.52 c	17.25 ± 8.55 ab	1.85 ± 5.81 a	45.70 ± 9.97 bc	3.65 ± 1.39 a
Agosto	2.35 ± 1.69 abc	26.40 ± 6.88 cd	11.95 ± 10.22 ab	3.55 ± 8.73 ab	44.25 ± 11.96 bc	2.70 ± 1.42 a
Septiembre	1.80 ± 1.58 ab	11.80 ± 5.23 b	13.30 ± 8.63 ab	5.90 ± 9.95 ab	32.80 ± 13.16 b	3.95 ± 1.67 a
Octubre	3.40 ± 1.50 abc	23.55 ± 9.58 c	8.45 ± 13.04 ab	9.00 ± 14.21 abc	44.40 ± 23.25 bc	4.00 ± 1.08 a
Noviembre	6.60 ± 1.93 de	42.75 ± 14.77 ef	26.20 ± 29.20 bc	7.65 ± 11.78 ab	83.20 ± 37.52 ef	7.2 ± 1.88 b
Diciembre	4.40 ± 2.09 cd	25.30 ± 10.26 cd	14.25 ± 15.78 ab	18.35 ± 12.47 bc	62.30 ± 20.77 cde	10.00 ± 3.23 c

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05)

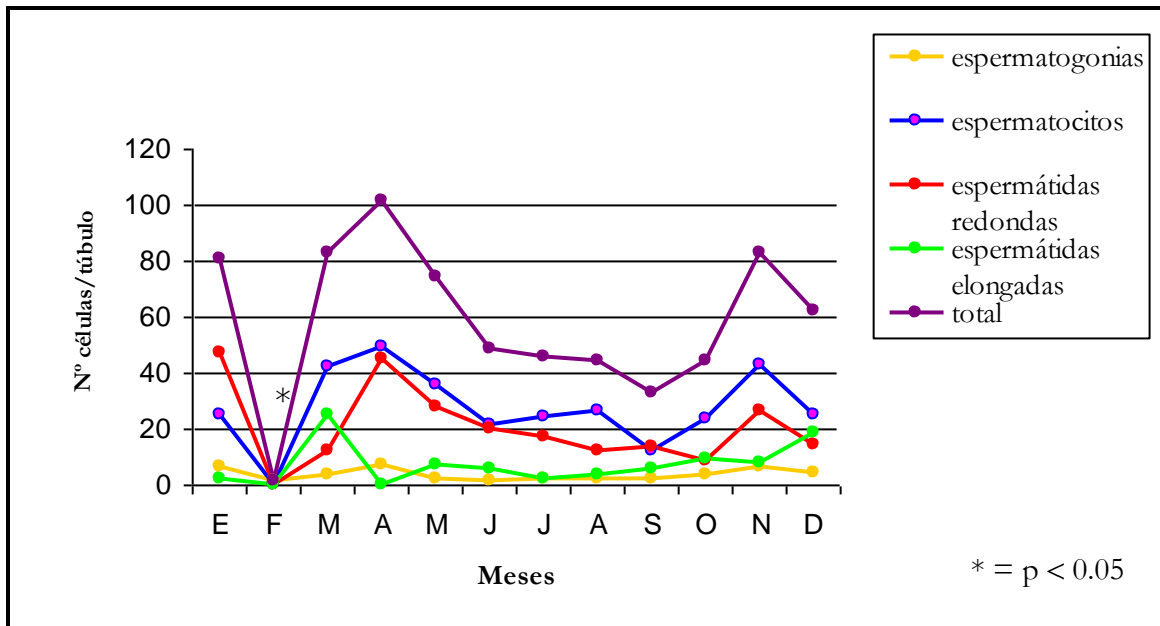


Gráfico 5. Promedios mensuales del conteo total y diferencial de células inmunomarcadas positivamente con TUNEL.

- **Diámetro promedio de túbulos seminíferos (DT) (μm)**

En la Tabla 5 y Gráfico 6 se pueden observar los datos obtenidos de los promedios mensuales durante un año, donde no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para los distintos meses, excepto para febrero (P1) El análisis de correlación de Pearson (Tabla 12), resultó ser positivo y significativo ($p < 0,05$): entre el DT- AE ($r = 0,97$), DT-AT ($r = 0,96$), DT-IE ($r = 0,93$), DT- IGS ($r = 0,94$).

Tabla 5. Promedio mensual del Diámetro tubular.

MES	D.T (μm)
Enero	109.61 ± 57.07 b
Febrero	80.21 ± 60.10 a
Marzo	110.27 ± 59.13 b
Abril	117.28 ± 64.33 b
Mayo	129.02 ± 63.47 b
Junio	110.94 ± 57.79 b
Julio	127.58 ± 63.86 b
Agosto	125.54 ± 65.78 b
Septiembre	122.69 ± 62.44 b
Octubre	115.95 ± 61.34 b
Noviembre	111.53 ± 54.13 b
Diciembre	110.89 ± 56.74b

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

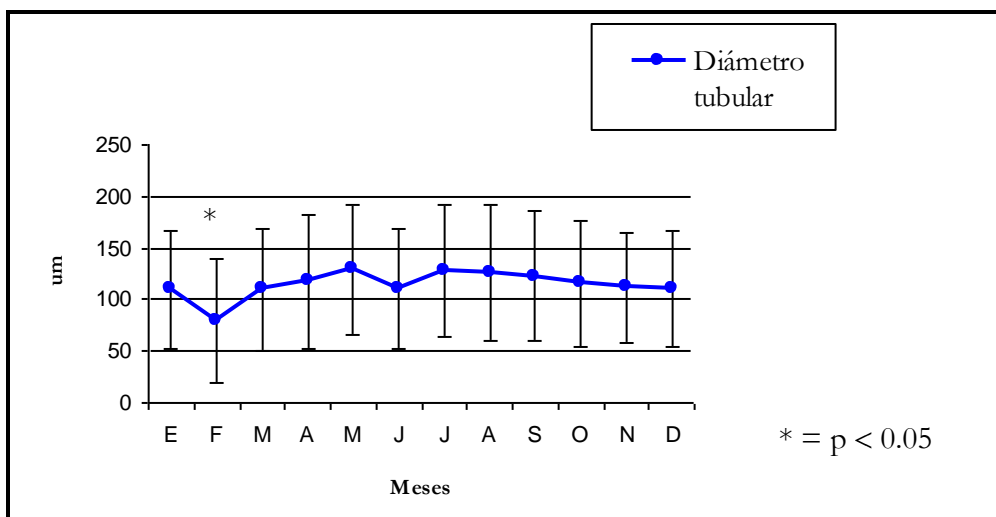


Gráfico 6. Promedio mensual de Diámetro tubular y desviación estándar.

- **Altura promedio del epitelio seminífero (AE) (μm):**

Los promedios de altura del epitelio seminífero se muestran en la Tabla 6 y Gráfico 7 apreciándose que Febrero fue significativamente menor ($p < 0,05$), en comparación con los otros meses. El análisis de correlación de Pearson resultó ser positivo y significativo, se puede observar en la Tabla 12.

Tabla 6. Promedio mensual de Altura epitelio seminífero.

MES	A.E. (μm) ²
Enero	54,57 \pm 10,1 b
Febrero	20,33 \pm 9,35 a
Marzo	55,86 \pm 11,01 b
Abril	56,32 \pm 11,00 b
Mayo	66,65 \pm 12,35 d
Junio	56,71 \pm 10,25 bc
Julio	66,44 \pm 12,56 d
Agosto	66,62 \pm 15,46 d
Septiembre	64,06 \pm 10,09 cd
Octubre	55,72 \pm 11,89 b
Noviembre	59,57 \pm 11,85 bcd
Diciembre	53,44 \pm 10,11 b

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

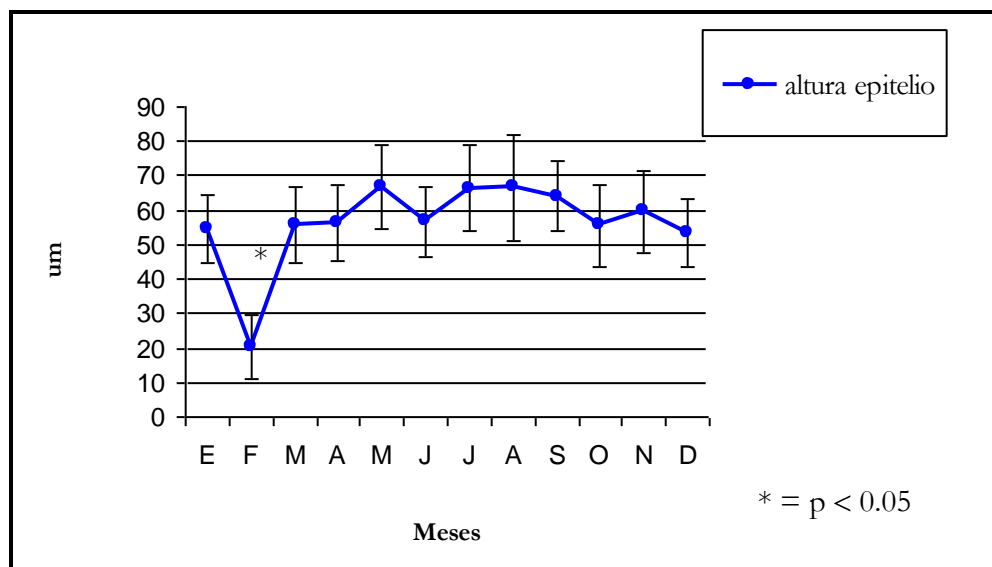


Gráfico 7. Promedios mensuales de Altura epitelio seminífero y desviación estándar.

- **Área promedio del túbulo seminífero (AT) (µm):**

Los datos se pueden observar en el Tabla 7 y Gráfico 8, donde no se encontraron diferencias significativas, entre los meses excepto para el mes de febrero ($p < 0,05$) donde se obtuvo el mínimo valor promedio. El análisis de correlación de Pearson (Tabla 12) resultó ser positivo y significativo.

Tabla 7. Promedio mensual de Área tubular.

Mes	A.T (µm) ²
Enero	21072.30 ± 3234.30 bc
Febrero	15158.98 ± 2703.49 a
Marzo	21581.81 ± 4425.28 bc
Abril	24683.86 ± 5487.03 cde
Mayo	28306.90 ± 3611.94 e
Junio	21634.52 ± 4038.49 bc
Julio	26765.22 ± 6268.69 de
Agosto	27091.03 ± 5806.17 de
Septiembre	25491.22 ± 5525.17 cde
Octubre	23364.58 ± 6025.30 bcd
Noviembre	20071.58 ± 4925.23 b
Diciembre	21226.91 ± 3936.99 bc

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

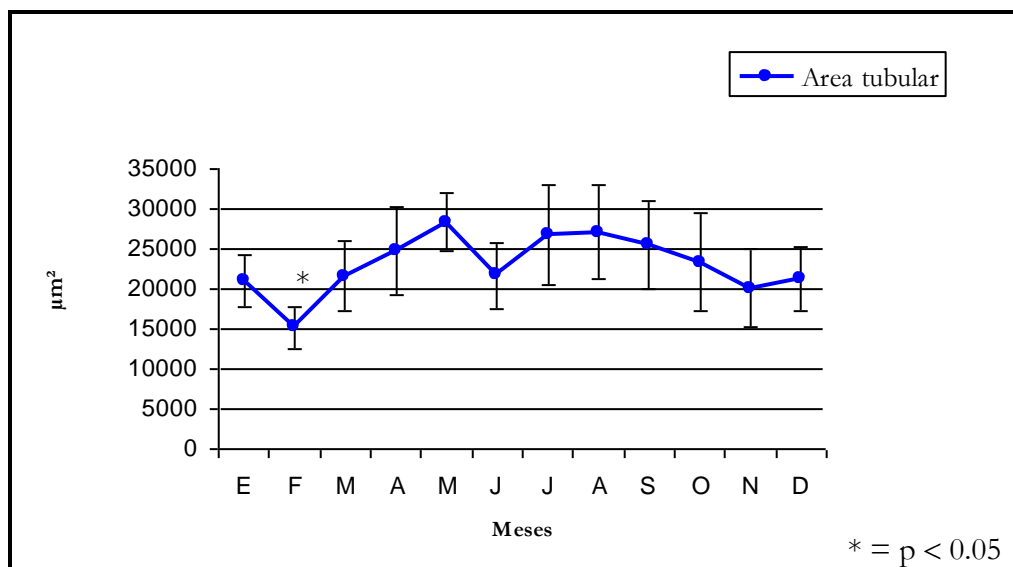


Gráfico 8. Promedio mensual de Área tubular mensual y desviación estándar.

- **Índice Espermatogénico (IE)**

El mes de febrero presentó el valor promedio más bajo del año, siendo significativamente menor que el resto de los meses, presentando un nivel de actividad de 0 en la mayoría de los TS (Moda=0). Los IE y las diferencias estadísticas ($p < 0,05$), se pueden observar en la Tabla 8 y Gráfico 9 y 10. En la Tabla 12 se muestra el coeficiente de correlación de Pearson.

Tabla 8. Promedio mensual de Índice espermatogénico

Mes	IE	moda
Enero	2.42 ± 0.50 b	2
Febrero	0.69 ± 0.95 a	0
Marzo	2.70 ± 0.47 bc	3
Abril	3.06 ± 0.68 cd	3
Mayo	3.38 ± 0.60 de	3
Junio	3.48 ± 0.77 def	3
Julio	3.67 ± 0.61 ef	4
Agosto	3.97 ± 0.94 f	5
Septiembre	3.19 ± 0.40 cde	3
Octubre	3.06 ± 0.57 cd	3
Noviembre	2.81 ± 0.48 bc	3
Diciembre	2.47 ± 0.51b	2

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

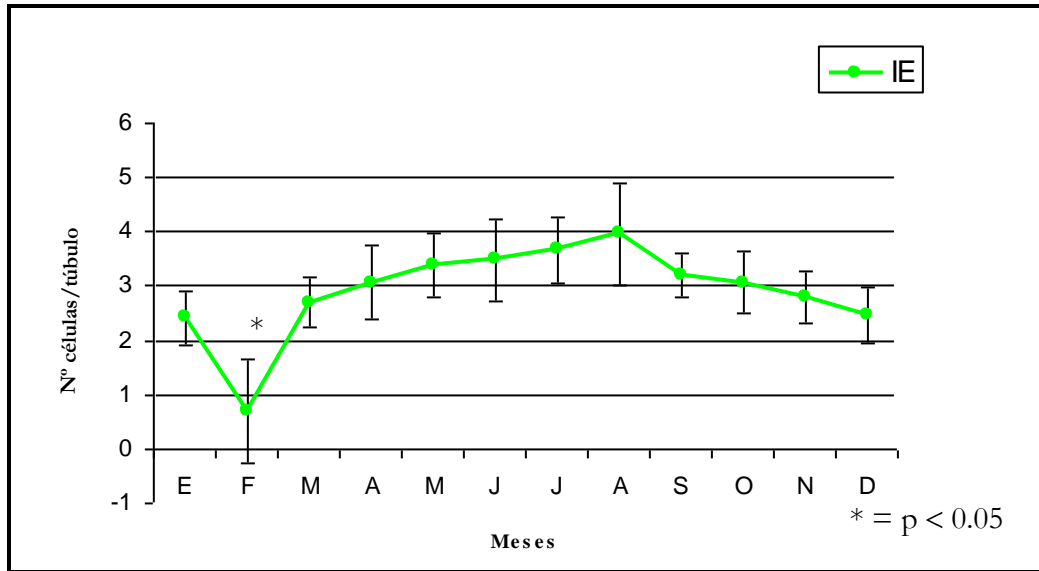


Gráfico 9. Promedio mensual de Índice espermatogénico y desviación estándar.



Gráfico 10. Modas mensuales de Índices espermatogénicos.

- **Índice gonadosomático (IGS)**

Los datos se pueden observar en la tabla 9 y Gráfico 11, donde se muestran los valores y diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre los meses.

Tabla 9. Promedio mensual de Índice Gonadosomático

MES	Peso corporal (g)	Peso testicular (g)	IGS
Enero	520,40	1,57	0,30 ± 0,027 a
Febrero	497,40	1,66	0,34 ± 0,107 ab
Marzo	561,00	2,41	0,43 ± 0,184 ab
Abril	550,25	2,95	0,54 ± 0,076 abcd
Mayo	556,20	3,08	0,56 ± 0,115 bcd
Junio	447,25	2,03	0,45 ± 0,065 ab
Julio	502,20	3,19	0,71 ± 0,121 cd
Agosto	502,20	3,62	0,72 ± 0,143 d
Septiembre	570,75	3,07	0,55 ± 0,065 abcd
Octubre	512,80	2,46	0,49 ± 0,072 abc
Noviembre	470,25	1,68	0,36 ± 0,098 ab
Diciembre	477,20	1,88	0,426 ± 0,041ab

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

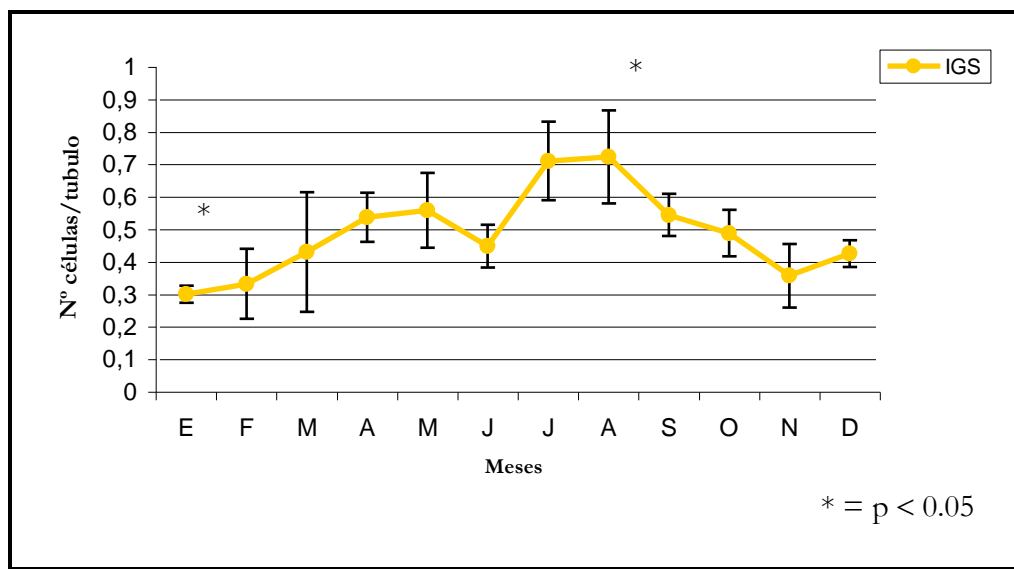


Gráfico 11. Promedio mensual de Índice gonadosomático y desviación estándar.

ii) Compartimento peritubular:

En los meses de diciembre, enero y febrero la membrana basal es más gruesa y plegada, los núcleos de las células mioideas mantuvieron el aspecto fusiforme durante el año, pero en estos meses se encontraron más próximos.

Durante marzo, abril y mayo la membrana basal se adelgaza.

En Junio, julio y agosto la membrana basal se aprecia delgada, con las células mioideas más separadas una de otras.

En septiembre, octubre y noviembre la membrana basal continua delgada, pero ya en algunos TS comienza a plegarse. Las células mioideas comenzaron a hacerse más próximas unas de otras.

iii) Compartimento intersticial:

Durante los meses de diciembre, enero y febrero este compartimento se observa amplio, con abundante tejido conjuntivo laxo y pequeños vasos sanguíneos, las células de Leydig se encuentran aisladas, con núcleos pequeños y cromatínicos.

En marzo, abril y mayo las células de Leydig, en el compartimento intersticial, tienden a formar grupos de células entre los TS y el intersticio se observan vasos sanguíneos hiperémicos y tejido conectivo laxo.

En junio, julio y agosto se observan amplios grupos de células de Leydig con citoplasma vacuolado y grandes núcleos basófilos, los vasos sanguíneos se mantienen hiperémicos.

En septiembre, octubre y noviembre se ve un aumento del tejido conectivo, las células de Leydig se encuentran en grupos más pequeños y sus núcleos menos prominentes.

De las 50 células de Leydig, se registraron los valores promedios de células inmunomarcadas PCNA positivas por mes (Tabla 10 y gráfico 12) e índice proliferativo (Tabla

11 y gráfico 13) y diferencias estadísticas ($p < 0,05$) Además, el mes de febrero registró el mayor valor promedio de células inmunomarcadas TUNEL positivas (Tabla 10 y gráfico 12) e índice apoptótico (Tabla 11 y gráfico 13), mostrando diferencias estadísticas ($p < 0,05$), con todos los meses. Además se realizó un análisis de correlación de Pearson entre el índice proliferativo y apoptótico (tabla 12) donde se observó un $r: -0.85$

Tabla 10. Promedio mensual del recuento de células de Leydig en proliferación (PCNA) y en apoptosis (TUNEL)

Meses	Promedio de Leydig inmunomarcadas con PCNA	Promedio de Leydig inmunomarcadas con TUNEL
enero	8.33 ± 1.53 ab	18.33 ± 0.58 b
Febrero	6.33 ± 0.58 a	25.00 ± 1.00 c
Marzo	12.00 ± 2.65 abcd	16.01 ± 1.02 b
Abril	16.67 ± 1.53 bcde	10.33 ± 0.58 a
Mayo	22.00 ± 1.00 ef	9.00 ± 1.00 a
Junio	18.67 ± 6.81 cdef	10.00 ± 1.00 a
Julio	27.67 ± 4.04 fg	8.33 ± 1.53 a
Agosto	33.33 ± 5.03 g	7.67 ± 1.15 a
Septiembre	20.67 ± 3.21 def	16.00 ± 1.00 b
Octubre	15.67 ± 0.58 abcde	16.33 ± 2.52 b
Noviembre	9.67 ± 3.06 abc	17.00 ± 1.00 b
Diciembre	8.67 ± 1.53 ab	17.67 ± 1.53 b

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

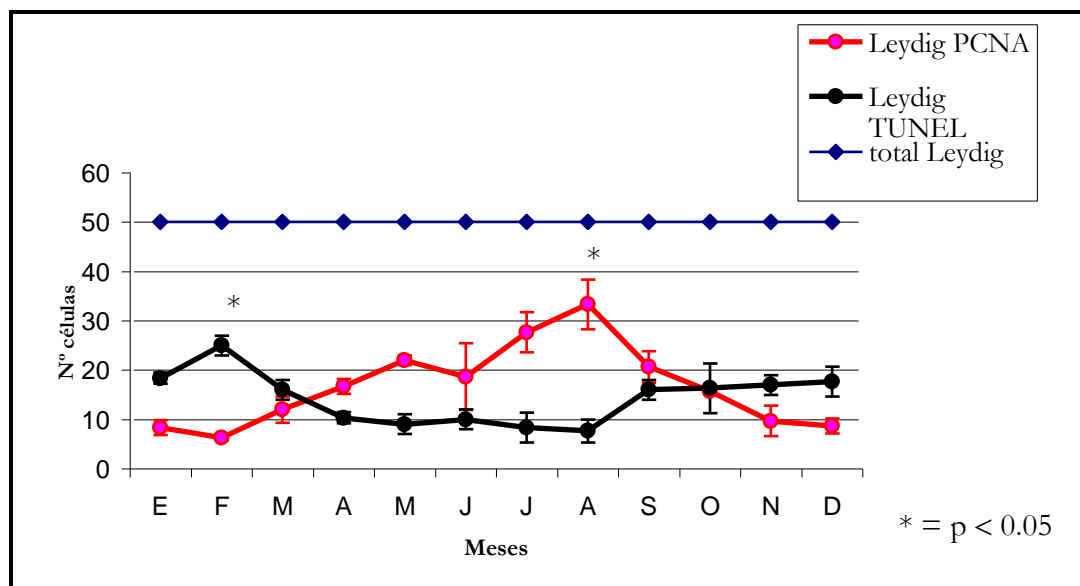


Gráfico 12. Promedio mensual de células de Leydig inmunomarcadas positivamente con PCNA y TUNEL y desviación estándar.

Tabla 11. Índices proliferativo y apoptótico de células de Leydig

Meses	Promedio células inmunomarcadas PCNA	IP (%)	Promedio células inmunomarcadas TUNEL	IA (%)
Enero	8.33 ± 1.53 ab	16.67	18.33 ± 0.58 b	36.67
Febrero	6.33 ± 0.58 a	12.67	25.00 ± 1.00 c	50.00
Marzo	12.00 ± 2.65 abcd	24.00	16.01 ± 1.02 b	32.00
Abril	16.67 ± 1.53 bcde	33.33	10.33 ± 0.58 a	20.67
Mayo	22.00 ± 1.00 ef	44.00	9.00 ± 1.00 a	18.00
Junio	18.67 ± 6.81 cdef	37.33	10.00 ± 1.00 a	20.00
Julio	27.67 ± 4.04 fg	55.33	8.33 ± 1.53 a	16.67
Agosto	33.33 ± 5.03 g	66.67	7.67 ± 1.15 a	15.33
Septiembre	20.67 ± 3.21def	41.33	16.00 ± 1.00 b	32.00
Octubre	15.67 ± 0.58 abcde	31.33	16.33 ± 2.52 b	32.67
Noviembre	9.67 ± 3.06 abc	19.33	17.00 ± 1.00 b	34.00
Diciembre	8.67 ± 1.53 ab	17.33	17.67 ± 1.53 b	35.33

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

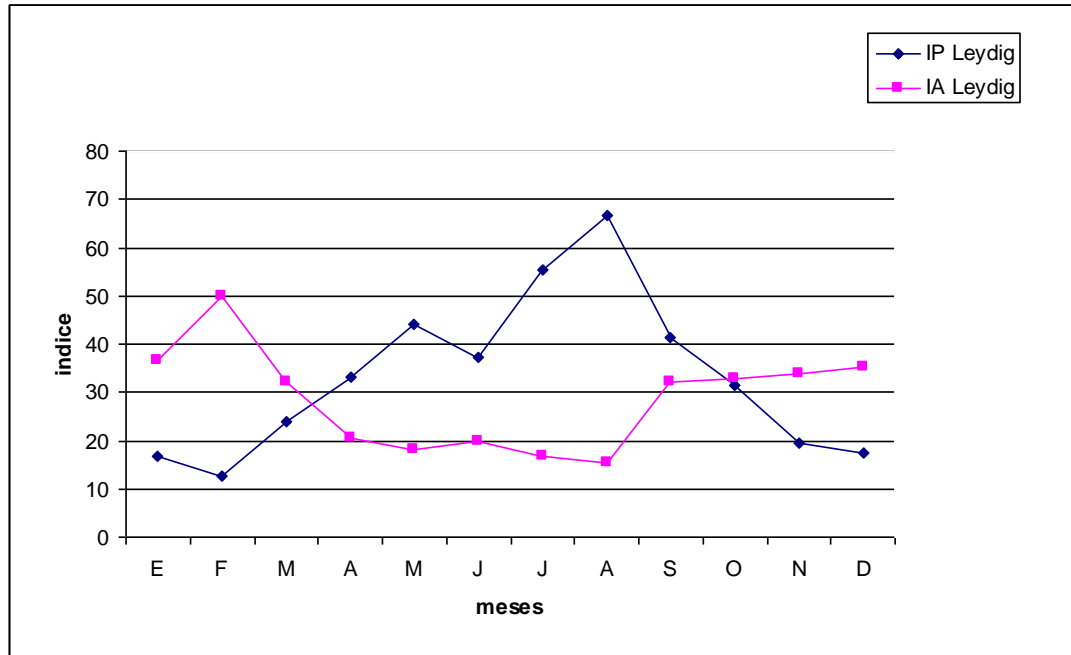


Gráfico 13. Promedio mensual de Índices proliferativo y apoptótico.

Tabla 12. Correlación de Pearson entre los indicadores e índices.

Indicadores	Correlación	Indicadores	Correlación	Indicadores	Correlación
Rec-AT	0,9	IPt-IPS	0,87	DT- AT	0,96
Rec-DT	0,94	IPt-IAS	0,03	DT-IE	0,93
Rec-AE	0,93	IAt- IAS	0,42	DT- IGS	0,94
Rec-IE	0,9	IAt- AT	-0,13	AE-AT	0,87
Rec-IGS	0,65	IAt- DT	0,05	AE-IE	0,94
IPt-DT	-0,62	IAt- AE	0,2	AE- IGS	0,63
IPt-AE	-0,69	IAt-IE	0,01	AT- IE	0,87
IPt-IE	-0,56	IAt- IGS	-0,43	AT -IGS	0,84
IPt-IAt	-0,64	DT-AE	0,97	IE- IGS	0,75

11. Discusión

La actividad reproductiva estacional es representada como crecimiento o involución del aparato reproductivo, lo que se asocia con cambios morfofuncionales y conductuales. En esta memoria se estudiaron por histo-morfometría los cambios en los testículos, durante un ciclo anual, con registros de los pesos testiculares, área tubular, diámetro tubular, altura del epitelio seminífero, recuento celular total y diferencial, IE e IGS. Además, se detectó actividad proliferativa y apoptótica del epitelio seminífero y células de Leydig.

El presente estudio establece una relación inversa entre los procesos proliferativos y apoptóticos en el testículo de *Chinchilla laniger* durante los distintos meses del ciclo anual. Los resultados sugieren que la apoptosis limita la diferenciación de las células germinales siendo una característica morfológica importante en la regresión gonadal similar a lo observado en hamster ruso (*Phodopus sungorus*), ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*), pájaro estornino pinto (*Sturnus vulgaris*), hamster dorado (*Mesocricetus auratus*) y liebre común (*Lepus europaeus*) (Furuta *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1999, 2000; Young *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2002; Štrbenc y Bavdek, 2001; Štrbenc *et al.*, 2003) y consistente con la disminución en la concentración de testosterona observada en estos animales en el mismo período (Adaro *et al.*, 2002). El aumento en el número de espermatogonias, espermatoцитos I y espermátidas TUNEL positivas durante el período de regresión gonadal es similar a los resultados obtenidos en humanos durante una espermatogénesis normal (Sinha y Swerdloff, 1999) Sin embargo, existe alguna diferencia en el tipo de células inmunomarcadas con otras especies, como como hamster ruso (*Phodopus sungoru*) y pájaro (*Sturnus vulgaris*) donde se marcan las espermatogonias y espermatoцитos (Furuta *et al.*, 1994; Young *et al.*, 2001), en hamster dorado (*Mesocricetus auratus*) se inmunomarcan los espermatoцитos y ocasionalmente espermatogonias (Morales *et al.*, 2002), en ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) los espermatoцитos y algunos casos en

espermatogonias y espermátidas (Young *et al.*, 1999 y 2000) y en liebre común (*Lepus europaeus*) (Štrbenc *et al.*, 2003) sólo en espermátocitos.

A pesar que las diferencias estadísticas de los índices morfológicos no fueron significativas en la mayoría de los meses, excepto para febrero. Se observó una tendencia a obtener un aumento en la curva de los indicadores durante otoño-invierno y disminuciones en primavera- verano. Así, la tendencia a disminuir detectada en pesos testiculares, índices estudiados, celularidad, cambios en la organización del epitelio seminífero y compartimentos son similares a lo observado en degú (*Octodon degus*), hamster ruso (*Phodopus sungorus*) y conejo común (*Oryctolagus cuniculus*) (Contreras y Bustos-Obregón, 1977; Morales, 1982; Furuta *et al.*, 1994; Zunino, 1987, respectivamente) Los indicadores mencionados también concuerdan con las variaciones morfológicas descritas en glándulas sexuales accesorias de *Chinchilla laniger* para el mismo período (Adaro *et al.*, 1999; Cepeda *et al.* 1999; Cepeda *et al.*, 2006).

Los aumentos observados en la proliferación celular (PCNA positivas), durante los meses de invierno, en espermatogonias y espermátocitos indicaría una mayor diferenciación del epitelio germinativo y en consecuencia una más rápida espermiación, lo que es consistente con lo observado en Liebre común (*Lepus europaeus*) y hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) (Štrbenc y Bavdek, 2001, Štrbenc *et al.*, 2003; Morales *et al.*, 2002). Este incremento de la proliferación, también coincide con los aumentos en el peso testicular e IGS, por lo que las diferencias observadas en el IGS durante el año se podrían atribuir a cambios en el peso testicular, puesto que el peso corporal fue similar durante todo el ciclo, ya que los animales se mantuvieron permanentemente con alimentos y no presentaron interferencias con otros machos, evitando así, las riñas territoriales como las descritas en los animales silvestres, las que

influyen en la obtención de alimentos durante el período de actividad reproductiva, como lo informado en degú (*octodón degus*) silvestres (Contreras y Bustos-Obregón, 1977).

El aumento en la celularidad e índices estudiados, durante el período otoño- invierno, sería consecuencia del incremento de la actividad proliferativa del parénquima testicular y aumento del flujo sanguíneo necesario para los requerimientos de estas funciones testiculares. Estos resultados son concordantes con lo descrito para esta especie por Neira *et al.*, 1989; Adaro *et al.*, 1999; Cepeda *et al.*, 1999; Cepeda *et al.*, 2006 y con lo observado en otras especies como en degú (*Octodón degus*), conejo común (*Oryctolagus cuniculus*), hamster ruso (*Phodopus sungorus*), jerbo del norte de África (*Dipodillus dasyurus*), ratón espinoso (*Acomys cahirinus*), jerbo de Israel (*Gerbillus andersoni*), jerbo de Egipto (*Gerbillus pyramidum*), pájaro estornino pinto (*Sturnus vulgaris*), liebre común (*Lepus europaeus*), ciervo corzo (*Capreolus capreolus*) y visón americano (*Mustela visón*) (Contreras y Bustos-Obregón, 1977; Morales, 1982; Zunino, 1987; Furuta *et al.*, 1994; El-Bakry *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1999, Young *et al.*, 2001; Štrbenc *et al.*, 2003; Goeritz *et al.*, 2003; Blottner *et al.*, 2006, respectivamente).

Con respecto a las células de Sertoli se aprecia una tendencia al aumento en la proliferación durante los meses de invierno y apoptosis en verano, lo que es similar a lo observado en pájaro estornino pinto (*Sturnus vulgaris*) (Young *et al.*, 2001) mientras que en hamster dorado (*Mesocricetus auratus*), ciervo corzo (*Capreolus capreolus*) y liebre común (*Lepus europaeus*) no se informa detección de reacción positiva tanto proliferativa, como apoptótica (Morales *et al.*, 2002; Goeritz *et al.*, 2003; Štrbenc *et al.*, 2003). Esta mayor actividad de las células de Sertoli demostraría el importante rol que cumplen durante el período de mayor actividad testicular, ya que son el punto central de convergencia de las hormonas circulantes y factores testiculares locales. Estos factores regulan o modulan la espermatogénesis a través de; i) secreción de transferrina, activina o inhibina ii) reducción y aromatización de la testosterona

a dihidrotestosterona (DHT) y estradiol, respectivamente iii) producción de glucoproteína ligadora de andrógenos (ABP), que al unirse con las hormonas esteroidales hace que estén disponibles para las células germinales, siendo incorporadas mediante endocitosis de complejos hormona – ABP. Además, este complejo a nivel de epidídimo impide la reabsorción de esteroides sexuales, asegurando su presencia continua para las necesidades de los espermatozoides (Levy *et al.*, 2006).

Las células de Leydig, muestran una tendencia similar a las células de Sertoli, tanto en proliferación como, en apoptosis, lo que es coincidente con lo observado en liebre común (*Lepus europaeus*) (Štrbenc y Bavdek, 2001; Štrbenc *et al.*, 2003). La mayor actividad proliferativa registrada durante invierno concuerda con el aumento en la curva de testosterona plasmática informado por Adaro *et al.*, (2002) para igual período. Esto sugiere que el aumento de su concentración precede a la proliferación del epitelio germinativo, al igual que lo hace en las glándulas accesorias, para luego estimular el crecimiento caracterizado por hipertrofia e hiperplasia de las células epiteliales, incrementando componentes del estroma y vasos sanguíneos. Una vez que la testosterona ingresa a las células de Sertoli sufre una rápida reducción a Dihidrotestosterona (DHT), el complejo receptor-andrógeno se fosforila, se disocia de una proteína chaperona de golpe de calor, se dimeriza y a continuación interacciona con moléculas de ADN. Como resultado, se estimula la enzima ARN polimerasa, ARN mensajeros y por lo tanto, síntesis de proteínas y ADN. Una vez activadas las células de Sertoli secretan el *stem cell factor* (SCF), un ligando que se une al receptor c-kit, una tirosina kinasa presente en espermatogonias diferenciadas. Con la unión de SCF, el receptor c-kit, pasa por dimerización y autofosforilación regulando a la ciclina D3 y promoviendo la progresión del ciclo celular vía fosfatidilinositol- 3- kinasa (PI3-K) que actúa inmediatamente como una

molécula con señal mitogénica de las células, llevándolas a la transición de G1/S y proliferación (Mauduit *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2000; Cobellis *et al.*, 2003).

Es probable, que los andrógenos influyan también decisivamente en la transformación de espermátidas a espermatozoides, además de la adquisición de capacidad motora y fertilizante, pero aún no está bien dilucidado el mecanismo. Lo que si está claro, es que los productos de secreción vertidos al plasma seminal por el epidídimo y las glándulas accesorias, principalmente, vesícula seminal y la próstata, dependen del estímulo de la testosterona, ya que el receptor de andrógeno unido a DHT en las células parenquimatosas prostáticas desencadenan la secreción de reguladores de crecimiento positivos de las células epiteliales, como el factor de crecimiento de queratinocitos y fibroblástico, proporcionando un ambiente bioquímico idóneo para el espermatozoide (Rodes y Masso, 2004; Levy *et al.*, 2006)

La tendencia al aumento de apoptosis celular observados durante primavera- verano son consistentes con la disminución de la concentración plasmática de testosterona descrita para la especie por Adaro *et al.*,(2002), esto es similar a lo observado en otras especies con actividad reproductiva estacional donde se ha descrito que existen señales apoptóticas que incluyen deficiencia de factores de crecimiento y hormonas, exposición a radiaciones, tóxicos, calor y quimioterápicos, criptorquidismo y fotoperíodo. La maquinaria molecular es activada por estos factores y estimulan a las células de Sertoli a secretar una proteína tipo II localizada en la membrana plasmática Fas ligando, mientras que las células espermátogénicas expresan una proteína tipo I receptor de membrana, Fas (Lee *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1999) cuya unión induce trimerización de Fas receptor, se une a moléculas adaptadoras FADD (*Fas associated death domain*) ubicadas en el citoplasma de las células germinales y finalmente este complejo se une al dominio efector de muerte de las caspasas iniciadoras 8 o 10 activándolas por autoruptura y, entonces, éstas caspasas pueden activar a las caspasas ejecutoras, induciendo

apoptosis de las células germinales (Francavilla *et al.*, 2002; Kierszenbaum *et al.*, 2001; Cooper, 2002; Cotran *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 2003) a través de este mecanismo pueden explicarse los cambios de la actividad reproductiva en chinchillas, ya que activan la apoptosis de espermatogonias y espermatoцитos observados en este trabajo, siendo similar a lo ocurrido en otras especies como hamster ruso (*Phodopus sungorus*), liebre común (*Lepus europaeus*), ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*), pájaro estornino pinto (*Sturnus vulgaris*) y hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) (Furuta *et al.*, 1994; Billig *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2002; Štrbenc *et al.*, 2003, respectivamente).

Con respecto a las características histológicas observadas en el testículo durante el año se aprecian claras diferencias entre los meses de verano donde el epitelio seminífero es de aspecto vacuolado y desorganizado, con escasa presencia de células germinales y los meses de invierno cuando la mayoría de los túbulos seminíferos presenta espermatogénesis completa y con gran cantidad de espermatozoides en el lumen. Por lo tanto, junto con los resultados obtenidos en los diferentes indicadores analizados durante un ciclo anual permitirían identificar en el, 4 períodos: P1 reposo gonadal, durante los meses de verano, P2 recrudescencia durante los meses de otoño, P3 actividad gonadal durante los meses de invierno y P4 regresión gonadal en primavera, situación similar se describe en degú (*Octodon degus*) (Morales, 1982).

Además, los resultados del presente estudio indican que la actividad reproductiva de *Chinchilla laniger* macho, que aunque son animales que han nacido en cautiverio cuyos antecesores han permanecido en estas condiciones por largas generaciones, mantienen una actividad estacional de días cortos, regulada principalmente por fotoperíodo, ya que en el plantel no hubo manejo de tiempo de luz. En cambio, los otros factores ambientales tales como: temperatura, precipitaciones, disponibilidad de alimento fueron controlados por las condiciones de confinamiento no afectarían a las chinchillas (Cepeda *et al.*, 2006). Esto permite

suponer que el fotoperíodo, es el estímulo principal que genera respuestas a nivel del eje hipotálamo- hipófisis- gonadal, resultando en variaciones en las secreciones de gonadotrofinas influenciando la espermatogénesis de la chinchilla, la que incluye proliferación por mitosis de las espermatogonias sincronizada con la división meiótica de los espermatocitos y con la diferenciación de espermatidas a espermatozoides (Goldman, 1999; Goldman, 2001)

Lo antes mencionado estaría indicando que la *Chinchilla laniger* macho presenta una estacionalidad reproductiva de días cortos, concordando con otros estudios realizados en la misma especie, también en confinamiento, como cambios morfológicos (Adaro *et al.*, 1999) e histológicos en glándulas accesorias (Cepeda *et al.*, 2006). Además, esta característica reproductiva macho es consistente con la conducta observada en la hembra por Neira *et al.*, 1989 y Weir, 1972 quienes la describen como poliéstrica estacional (entre los meses de mayo y Noviembre) y anéstrica en verano. También estos resultados podrían ser similares a los descritos en otras especies como degú (*Octodon degus*), pájaro estornino pinto (*Sturnus vulgaris*), liebre común (*Lepus europaeus*), ciervo corzo (*Capreolus capreolus*) (Contreras y Bustos-Obregón, 1977; Morales, 1982; Young *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2001; Štrbenc y Bavdek, 2001; Klonisch *et al.*, 2006, respectivamente).

12. Conclusiones

- El incremento del recuento total celular, altura de epitelio, diámetro, área tubular, IE e IGS estarían directamente asociados al incremento de la actividad gonadal.
- El aumento del índice proliferativo y disminución de DT, AE, IE, IA estarían directamente asociada a la mayor diferenciación del epitelio germinativo y a la rápida espermiación, durante el periodo de mayor actividad reproductiva
- El incremento del índice apoptótico y la disminución de AT, DT, AE, IE, IGS estarían directamente asociado a una menor diferenciación del epitelio germinativo, durante el periodo de regresión y reposo gonadal.
- La aplicación de métodos inmunohistoquímicos, para detectar y cuantificar la actividad proliferativa y apoptótica del parénquima testicular, permitieron demostrar la renovación de células de Sertoli y la muerte programada de las mismas y facilitaron la identificación de los diferentes estadios del ciclo reproductivo de la *Chinchilla laniger* a lo largo del año.
- Las variaciones morfológicas descritas, junto con las tendencias de las curvas de los diferentes indicadores analizados, reflejarían la actividad gonadal de la *Chinchilla laniger*, en cuyo ciclo anual se identificaron periodos: reposo gonadal durante los meses de verano y de actividad reproductiva en invierno.

- Los resultados del presente estudio indican que la actividad reproductiva de *Chinchilla laniger* macho, que aunque son animales que han nacido en cautiverio y cuyos antecesores han permanecido en estas condiciones por largas generaciones, mantienen una actividad estacional de días cortos, regulada principalmente por fotoperíodo.

13. Bibliografía

- **ADARO, L.; OROSTEGUI, C.; OLIVARES, R.; VILLANUEVA, S.** 1999. Variaciones morfométricas anuales del sistema reproductor masculino de la Chinchilla en cautiverio (*Chinchilla laniger Grey*). Avances en Producción Animal. Vol. 24 pp. 91-95.
- **ADARO, L.; PARRAGUEZ, V.; OROSTEGUI, C.; URQUIETA, B.; CEPEDA, R.** 2002. Variación anual de la concentración de testosterona plasmática en *Chinchilla laniger* (GREY) en cautiverio. Avances en Ciencias Veterinarias. Vol. 17 pp. 25- 28.
- **ALQUARTI, I.** 1986. Así se cría la chinchilla. Chile Agrícola. Vol.11 pp.161-191.
- **ARENDRT, J.** 1998. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. Journal of Reproduction and Fertility. Vol. 3 pp. 13-22.
- **BILLIG, H.; YOUNG, CH.; EISENHAUER, K.; HSUEH, A.** 1996. Gonadal cell apoptosis: Hormone- regulated cell demise. Journal Human Reproduction Update. Vol. 2 pp. 103-117.
- **BLOTTNER, S.; SCHÖN, J.; JEWGENON, K.** 2006. Seasonally activated spermatogenesis is correlated with increased testicular production of testosterone and epidermal growth factor in mink (*Mustela visón*). Theriogenology. Vol. 66 pp. 1593 – 1598.

- **BLOTTNER, S.; SCHÖN, J.; ROELAN, H.** 2007. Apoptosis is not the cause of seasonal testicular involution in roe deer. *Cell Tissue Research*. Vol. 327 pp. 615–624.

- **CEPEDA, R.; ADARO, L.; PEÑAILILLO, P. OROSTEGUI, C.** 1999. Variaciones morfológicas estacionales de las glándulas bulbouretrales de la Chinchilla (*Chinchilla laniger*, GREY), en cautiverio. *Revista Chilena de Anatomía* Vol. 17 pp. 59-66.

- **CEPEDA, R.; ADARO, L.; PEÑAILILLO, P.** 2006. Morphometric variations of *Chinchilla laniger* prostate and of plasmatic testosterone concentration during its annual reproductive cycle. *International Journal Morphology*. Vol. 24 pp.89-97.

- **CEPEDA, R.; OROSTEGUI, C. & CIFUENTES, A.** 1996. Determinación de la estacionalidad reproductiva de la *Chinchilla lanigera* macho en cautiverio: Estudio histológico. *Revista Chilena de Anatomía*. Vol.14 pp. 223.

- **COBELLIS, G; MECCARIELLO, R; PIERANTONI, R; FASANO, S.** 2003. Intratesticular signals for progression of germ cell stages in vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 134 pp. 220-228.

- **CONTRERAS, L.; BUSTOS-OBREGÓN, E.** 1977. Ciclo reproductivo anual en *Octodón degus* (Molina) macho. *Medio Ambiente*. Vol. 3 pp. 83-90

- **COOPER, G.** 2002. La célula. 2ª edición. Editorial Marbán libros. pp.177-192, 560-567, 571-596.
- **COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T.** 2002. Robbins: Patología estructural y funcional. 6ª edición. Editorial Interamericana MC Graw- Hill México. pp. 19-27, 95-119.
- **CUNNINGHAM, J.** 2003. Control del desarrollo de las gónadas y los gametos. En: Fisiología veterinaria. 3º edición español, Madrid. pp. 374-427.
- **CHEMINEAU, P.** 1993. Medio ambiente y reproducción animal. Revue Mondiale de Zootechnie. Vol.77 pp. 2-14.
- **DELLMAN, H.** 1962. Zur anatomie der männlichen Geschlechtsorgane der Chinchilla. Zeitschrift für anatomie und Entwicklungsgeschichte. Vol. 123. pp.137-154.
- **DELLMAN, H y HEINZ, K.** 1998. Sistema reproductor masculino. En: Histología Veterinaria. 5º ed. Maryland, USA. pp. 245-261.
- **El-BAKRY, H.; ZAHRAN, W.; BARTNESS, T.** 1998. Photoperiodic responses of four wild-trapped desert rodent species. American Journal Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. Vol. 275 pp. 2012-2022.

- **EL QANDIL, S.; CHAKIR, J.; EL MOUSSAOUITI, R.; OUKOUCHOU, R.; RAMI, N.; BERJELLOUN, W.; LAKHDAR-GHAZAL, N.** 2005. Role of the pineal gland and melatonin in the photoperiodic control of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone in the male jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert rodent. *Journal Brain Research Bulletin*. Vol. 64 pp. 371-380.
- **FENG, L.; RAVINDRANATH, N; DYM, M.** 2000. Stem cell factor/c-kit Up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via phosphoinositide 3 – kinase/p70S6 kinase pathway in spermatogonia. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 275 pp. 25572-25576.
- **FRANCAVILLA, S.; D ABRIZIO, P.; CORDESCI, G.; PELLICCIONE, F.; NECOZIONE, S.; ULISSE, S.; PROPERZI, G; FRANCAVILLA, F.** 2002. Fas expresión correlatos with human germ cell degeneration in meiotic and post- meiotic arrest of spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*. Vol. 8 pp. 213-220.
- **FURUTA, I.; PORKKA-HEISKANEN, T.; SCARBROUGH, K.; TAPANAINEN, T.; TUREK, F.; HSUEH, A.** 1994. Photoperiod regulates testis cell apoptosis in Djungarian hamsters. *Biology of Reproduction*. Vol. 51. pp.1315-1321.

- **GALÁZ, J.** 2005. Plan nacional de conservación de la Chinchilla chilena, *Chinchilla laniger* (Molina, 1782), en Chile. Corporación Nacional Forestal, CONAF, Chile. 52 pp.
- **GOERITZ, F.; QUEST, M.; WAGENER, A.; FASSBENDER, M.; BROICH, A.; HILDEBRANDT, T.; HOFMANN, R.; BLOTTER, S.** 2003. Seasonal timing of sperm production in Roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. *Theriogenology*. Vol. 59 pp. 1487-1502.
- **GOLDMAN, B.** 1999. The circadian timing system and reproduction in mammals. *Journal Steroids*. Vol. 64 pp. 679-685.
- **GOLDMAN, B.** 2001. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms*. Vol. 16 pp. 283-301.
- **GRAU, J.** 1986. La Chinchilla. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina .214 p.
- **GROCOCK, C. y CLARKE, J.** 1974. Photoperiodic control of testis activity in the vole, *Microtus agrestis*. *Journal Reproduction Fertility*. Vol. 39 pp. 337-347.

- **HAFEZ, E. y GARNER, J.** 2002. Espermatozoides y plasma seminal. **En:** Reproduction e inseminación artificial en animales. 7° edición, Editorial Interamericana. pp.98-112.
- **HAFEZ, E.; JAINUDEEN, M.; ROSNINA, Y.** 2002. Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. **En:** Reproduction e inseminación artificial en animales. 7° edición, Editorial Interamericana. pp. 33-69.
- **HULEIHEL, M. y LUNENFELD, E.** 2004. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian Journal Andrology* .Vol. 6 pp. 259-268.
- **KIERSZENBAUM, A.** 2001. Apoptosis during spermatogenesis: The thrill of being alive. *Journal Molecular Reproduction and Development*. Vol. 58 pp.1-3.
- **KLONISCH, T.; SHON, J.; KLONISCH, S.; BLOTTNER, S.** 2006. The roe deer as a model for studying seasonal regulation of testis function. *International Journal of Andrology*. Vol. 29. pp 122- 128.
- **LEAH, M.; HOTCHKISS, A.; NELSON, R.** 2005. Photoperiod-induced differential expression of angiogenesis genes in testes of adult *Peromyscus leucopus*. *Reproduction*. Vol. 129 pp. 201–209.

- **LEE, J.; RICHBURG, J.; YOUNKIN, S.; BOEKELHEIDE, K.** 1997. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*. Vol. 138 pp. 2081-2088.
- **LEVY, B; KOEPPEN, B; STANTON, B.** 2006. Reproduccion. En: Berne y Levy fisiología. Cuarta edición, editorial Elsevier, España pp. 718-721
- **LEYTON, V. y RODRÍGUEZ, A.** 1995. Testículo y vía seminal. En: Tchernitchin, A.N. (Eds) *Histología*. Publicaciones Técnicas Mediterráneo, Santiago, Chile, pp. 393-412.
- **LÓPEZ, A.; HERNÁNDEZ, L.; FERNÁNDEZ, B.; TRIVIÑO, A.** 2001. Expresión Morfológica del PCNA en melanomas malignos en fase de crecimiento vertical y en nevus melanocíticos. IV Congreso Virtual Hispano Americano de Anatomía Patológica. pp.1-6
- **MALPAUX, B.; MIGAUD, M.; TRICOIRE, H.; CHEMINEAU, P.** 2001. Biology of Mammalian Photoperiodism and the Critical Role of the Pineal Gland and Melatonin. *Journal of Biological Rhythms*. Vol.16. pp. 336-347.
- **MAUDUIT, C.; HAMAMAH, S.; BENAHMED, M.** 1999. Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Human Reproduction Update*. Vol. 5. pp.535-545.

- **Mc DONALD, L. y PINEDA, M.** 1991. Endocrinología veterinaria y reproducción. Editorial Interamericana MC Graw-Hill. México. pp.18-37, 234-385.
- **MORALES, B.** 1982. Estado de avance en el estudio de la reproducción y embriología de un mamífero chileno. Publicación. Ocasional. Museo Nacional Historia Natural. Chile. Vol. 38 pp. 145-164.
- **MORALES, E.; PASTOR, L.; FERRER, C.; ZUASTI, A.; PALLARÉS, J.; HORN, R.; CALVO, A.; SANTAMARÍA, L.; CONTRERAS, M.** 2002. Proliferation and apoptosis in the seminiferous epithelium of photoinhibited Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) International Journal of Andrology. Vol. 25 pp. 281-287.
- **NEIRA, R.** 1987. Chinchilla: explotación y perspectivas de desarrollo en Chile. Próxima Década. Vol. 59 pp.4-6.
- **NEIRA, R.; GARCIA, X.; SCHEU, R.** 1989. Análisis descriptivo del comportamiento reproductivo y de crecimiento de chinchillas (*Chinchilla laginer Grey*), en confinamiento. Avances en Producción Animal. vol. 14 pp. 109-119.
- **OROSTEGUI, C.; CEPEDA, R.; URQUIETA, B. & PARRAGUEZ, V.** 1996. Ciclo reproductivo de la *Chinchilla lanigera* macho en cautiverio. Estudio morfoendocrino. Revista Chilena de Anatomía. Vol.14 pp.225.

- **PEÑAILILLO, P.** 1997. Estudio histológico de las glándulas anexas del aparato reproductor de la *Chinchilla laniger* GREY macho en cautiverio, durante un ciclo reproductivo anual. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U de Chile, Facultad. Cs. Veterinarias y Pecuarias pp. 101.

- **RODES, J. y MASSO, J.** 2004. Medicina interna. Editorial Elsevier, España, 2^o edición. pp. 2520-2521.

- **RUSSELL, L.; CHIARINI-GARCIA, H.; KORSMEYER, S.; KNUDSON, M.** 2002. Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. Journal Biology of Reproduction. Vol. 66. pp.950-958.

- **SCHWARTZMAN, R. y CIDLOWSKI, J.** 1993. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrinology. Vol. 14 pp.133-151.

- **SINHA, A. y SWERDLOFF, R.** 1999. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. Reviews of Reproduction. Vol. 4 pp. 38-47.

- **SINHA, A.; LUE, Y.; ROMERO, M.; YEN, P.; WANG, C.; SWERDLOFF, R.** 2003. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 85 pp. 175-182.

- **SPOTORNO, A.; ZULETA, C.; VALLADARES, J.; DEANE, A.; JIMENEZ, J.** 2004. *Chinchilla lanigera*. Mammalian Species. Vol. 758 pp. 1-19.
- **ŠTRBENC, M. y BAVDEK, S.** 2001. Apoptosis and proliferation in the testes of the brown hare (*Lepus europaeus L.*) under the influence of photoperiod. European Journal Physiology. Vol. 442 pp. 161-162.
- **ŠTRBENC, M.; FAZARINC, S.; BAVDEK, S.; POGAČNIK, A.** 2003. Apoptosis and proliferation during seasonal testis regression in the Brown Hare (*Lepus europaeus L.*). Anatomie, Histologie, Embryologie: Journal of veterinary medicine. Vol. 32 pp 48- 53.
- **THIERY, J.; CHEMINEAU, P.; HERNANDEZ, X.; MIGAUD, M.; MALPAUX, B.** 2002. Neuroendocrine interactions and seasonality. Journal Domestic Animal Endocrinology. Vol. 23 pp. 87-100.
- **VILLANUEVA, A.** 1998. Estudio anatómico y morfométrico del aparato reproductor de chinchilla macho (*Chinchilla laniger, Gray*) en cautiverio. Memoria Título Medico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad Cs. Veterinarias y Pecuarias. pp.7-48
- **WEIR, B.** 1972. The chinchilla. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 4ª edición. pp. 269-277.

- **WOLGEMUTH, D.; LAURION, E.; LELE, K.** 2002. Regulation of mitotic and meiotic cell cycle in the male germ line. *Endocrinology*. Vol. 164 pp.75-101.
- **YOUNG, K.; ZIRKIN, B.; NELSON, R.** 1999. Short photoperiods evoke testicular apoptosis in white footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Endocrinology*. Vol. 140 (7) pp.3133-3139.
- **YOUNG, K.; ZIRKIN, B.; NELSON, R.** 2000. Testicular regression in response to food restriction and short photoperiod in White- Footed Mice (*Peromyscus leucopus*) is mediated by apoptosis. *Biology of Reproduction*. Vol. 62 pp. 347- 354.
- **YOUNG, K. y NELSON, R.** 2001. Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. *Reproduction* Vol. 122 pp. 677- 685.
- **YOUNG, K.; BALL, G.; NELSON, R.** 2001. Photoperiod- induced testicular apoptosis in European Starlings (*Sturnus vulgaris*). *Biology of Reproduction*. Vol. 64 pp.706- 713.
- **ZUNINO, S.** 1987. Ciclo reproductor de los conejos en Chile central. II Etapas y duración. *Anales del museo de Historia Natural de Valparaíso*. Vol. 18 pp. 143 - 151.

