

IDENTIFICACION DE LAS CELULAS TESTICULARES DE HAMSTER Y
CUYO EN MUESTRAS OBTENIDAS POR PUNCION CON AGUJA FINA.

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México

para la obtención del título de

Médico Veterinario Zootecnista

por

Juan Manuel Medina Hernández

Asesor: MVZ Jorge Tolosa Sánchez

México, D.F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

JUAN MANUEL MEDINA HERNANDEZ. Identificación de las células testiculares de hámster y cuyo en muestras obtenidas por punción con aguja fina. (Bajo la dirección del MVZ Jorge Tolosa Sánchez).

Con el propósito de establecer los parámetros de identificación de los diferentes tipos de células testiculares de hámster y cuyo obtenidos por el método de punción con aguja fina, se puncionaron los testiculos derechos de 15 hamsters y 15 cuyos sexualmente maduros; con el material biológico obtenido se realizaron 2 frotis por animal. El testículo izquierdo se colectó para medir los diámetros nucleares de los distintos tipos celulares y compararlos con los diámetros de las células obtenidas por punción. En hámster y cuyo respectivamente los diámetros nucleares de células testiculares en corte histológico fueron: 6.34 ± 0.34 , 6.91 ± 0.58 micras en espermogonias; 8.1 ± 0.34 , 8.59 ± 0.43 micras en espermocitos primarios; 5.38 ± 0.86 , 5.43 ± 0.25 micras en espermátidas; 11.21 ± 0.28 , 12.5 ± 0.8 micras en células de Sertoli; 7.16 ± 0.15 , 7.44 ± 0.26 micras en células de Leydig. En los frotis de hámster los resultados fueron: 9.7 ± 1.2 micras en espermocitos primarios; 13.3 ± 1.49 micras en células de Sertoli; 7.9 ± 0.47 micras en células de Leydig. En los frotis de cuyos las medidas fueron: 10.62 ± 0.99 micras en espermocitos primarios; 7.79 ± 0.29 micras en espermátidas; 16.4 ± 1.97 micras en células de Sertoli. Se encontró una diferencia ($P < 0.05$) entre los diámetros de los núcleos de los cortes histológicos y los núcleos observados en los frotis en ambas especies. Esta diferencia morfométrica se explica por el distinto procesamiento y tratamiento de las muestras. Sin embargo, los parámetros morfométricos junto con los morfológicos permiten la identificación fácil de los distintos tipos celulares.

D E D I C A T O R I A

A mis padres porque siempre
me han brindado su apoyo y
confianza.

A mi asesor por su valiosa
colaboración.

G R A C I A S

CONTENIDO

RESUMEN	ii
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	3
RESULTADOS	5
DISCUSION	8
CONCLUSIONES	11
LITERATURA CITADA	12
FIGURAS	13
CUADROS	17

INTRODUCCION

La importancia del estudio de la actividad reproductiva en las distintas especies y los diversos aspectos relacionados con ella resulta evidente, ya que dicha actividad es una característica esencial en la vida productiva del animal.

El diseño de métodos que tengan como fin valorar la funcionalidad testicular es de importancia relevante, ya que ello permite, entre otras cosas, la exploración de factores que pudieran afectar dicha funcionalidad.

Entre los métodos para evaluar la fertilidad en machos, se incluyen la capacidad de éstos para preñar a la hembra (5), así como el examen clínico general del aparato reproductor (3,9), examen del eyaculado (5) y biopsia testicular (4). Recientemente se ha reportado (1), que la punción citológica con aguja fina podría ser utilizada en la valoración de la espermatogénesis en el humano. Este autor (1), señala que dicha prueba es inocua y permite una valoración morfológica directa de las estructuras del testículo y una correcta valoración de la espermatogénesis; anteriormente (8), esta técnica fue valorada y utilizada para el diagnóstico de cambios patológicos de este órgano. Sin embargo, ninguno de los autores que ha propuesto el uso de dicha técnica ha establecido un patrón morfológico cuantificable de los distintos tipos celulares, sino que se abocan a dar sólo unos pocos datos de apreciación morfológica subjetiva para la identificación de los diversos tipos de células.

Tradicionalmente y en términos generales, los animales de laboratorio han sido utilizados para el estudio de los diversos factores que afectan la actividad reproductiva de los animales y el hombre. El cuyo por ejemplo se ha utilizado para el estudio del papel de los andrógenos -

en la maduración de los espermatozoides de epidídimo (2), el hámster se ha utilizado (7), para estudiar la viabilidad de los espermatozoides de epidídimo después de tratamiento con testosterona en animales gonadectomizados.

En vista de que en la literatura revizada no se encontró que esta técnica haya sido utilizada en animales y que parece ser un método útil, al menos en humanos, para la valoración de la actividad testicular, el presente trabajo se realizó con el propósito de establecer los parámetros de los diferentes tipos de células del testículo de hámster y cuyo, obtenidos por el método de punción con aguja fina.

MATERIAL Y METODOS:

Se utilizaron 15 hamsters y 15 cuyos, machos, sexualmente maduros a los cuales se les practicó una punción con aguja fina en el testículo derecho. La técnica de punción se realizó de la siguiente manera: en primer término como una sola persona realizó el procedimiento y no se contaba con los recursos adecuados para sujetar a los animales se anestesiaron los animales; después, con los dedos índice y pulgar se inmovilizó el testículo sin presionar demasiado. Se introdujo una aguja calibre--22 (con su jeringa acoplada) en el parénquima testicular. En este momento se jaló el émbolo para provocar así una presión de succión; de esta forma se hicieron varios movimientos rápidos de arriba abajo a la vez que se cambiaba de dirección la aguja. El vacío obtenido es suficiente como para aspirar material celular, el cual queda depositado en la aguja sin pasar a la jeringa. Posteriormente se retiró la jeringa, en este momento se dejó que la presión de succión se pierda y en seguida, con el émbolo, se empuja el aire contenido en el cuerpo de la jeringa de esta manera el material celular es dirigido hacia el exterior de la aguja. Este último pro

cedimiento debe de llevarse a cabo sobre un portaobjetos limpio, la aguja debe apuntar hacia él, de tal manera que el material celular se deposite en su superficie. Con el material biológico se realizó un frotis sobre el portaobjetos e inmediatamente se fijó la mitad del total del frotis en -- acetona y la otra mitad en alcohol de 96°, durante media hora cuando menos.

De cada animal se hicieron cuando menos dos frotis, de éstos uno se tiñó con la técnica del ácido periódico de Schiff (PAS) y el otro con la técnica de Papanicolaou, se deshidrataron en alcohol de diferentes graduaciones, se aclararon con xilol y se montaron en resina sintética. Del testículo izquierdo se recolectaron pequeños fragmentos de 0.5 cm^3 aproximadamente, los cuales se fijaron en solución de Bouin durante seis horas. Posteriormente, los fragmentos se lavaron con alcohol de 50° hasta quitar el exceso de ácido pícrico, después se procesaron para inclusión en parafina. De cada fragmento se hicieron cortes de aproximadamente 6 micras de grosor la mitad de los cuales se tiñó con la técnica de hematoxilina y eosina mientras que la otra mitad con la técnica de PAS. Todos los cortes -- una vez teñidos se deshidrataron con alcoholes de diferentes graduaciones que se aclararon con xilol y se montaron con resina sintética.

Para la identificación de los diferentes tipos celulares en el parénquima testicular se observaron sus características morfológicas y se midieron los diámetros de los núcleos de cuando menos 6 células de cada tipo, para ello se utilizó un micrómetro para ocular Karl Zeiss de 10 milímetros con 100 divisiones numeradas de 20 mm de diámetro y un portaobjeto graduado. En los cortes de los testículos de hamsters y cuyos se midieron los núcleos de las espermatogonias A, espermatocitos primarios, espermatidas, células de sostén o de Sertoli y células de Leydig. En los frotis de testículo de hámster se midieron únicamente los núcleos de espermatoci-

tos primarios, células de sosten o Sertoli y células de Leydig o células intersticiales; mientras que en los frotis de testículo de cuyo, sólo sólo se midieron espermatoцитos primarios, espermátidas y células de sosten o de Sertoli. Tanto en hámster y cuyos sólo se midieron los diámetros de los núcleos de las espermátidas tardías, es decir, aquellas que iniciaron el proceso de la espermatogénesis, sólo presentaban en el citoplasma un pequeño grumo PAS positivo en el citoplasma cercano al núcleo.

Para determinar si existía una diferencia en el diámetro nuclear de las células obtenidas por punción con aguja fina y las obtenidas por corte histológico se utilizó la prueba estadística de t de Student.

RESULTADOS:

HAMSTERS:

En los cortes histológicos de los testículos de hámster fue posible la identificación de las siguientes células de la línea germinal: espermatoгонias, espermatoцитos primarios, espermátidas y espermatozoides; también se identificaron células de sosten o Sertoli y células intersticiales o de Leydig.

En hámster las características de las espermatoгонias fueron un núcleo redondo con cromatina dispersa de manera homogénea y que ocasionalmente presentó un nucléolo, el citoplasma fue escaso; el diámetro medio de los núcleos de estas células fue de 6.34 ± 0.3 micras. Las características morfológicas de los espermatoцитos primarios fueron las de un núcleo esférico grande con pequeños grumos característicos de cromosomas en fase de paquinema-diplonema con citoplasma ligeramente más abundante que las espermatoгонias; el diámetro del núcleo de estas células fue de 8.1 ± 0.3 micras. En relación con las características morfológicas de las espermátidas tempranas, éstas fueron las de un núcleo esférico con cromatina dis

persa de manera homogénea con un nucléolo voluminoso y central, el citoplasma es ligeramente acidófilo y presenta un ligero grumo fuertemente positivo a la tinción de PAS en una región cercana al núcleo; el diámetro del núcleo de estas células fue de 5.38 ± 0.86 micras. Respecto a las características morfológicas de las células de sostén o Sertoli, éstas presentaron un núcleo voluminoso, ovoide, con cromatina dispersa y un nucléolo prominente; el eje mayor del núcleo está dispuesto en forma radial con respecto al centro del túbulo, el citoplasma es abundante y se dispone en forma piramidal con el vértice de la pirámide apuntando hacia el centro del túbulo y mantiene una relación estrecha con las células germinales en proceso de diferenciación. El diámetro mayor del núcleo de estas células midió 11.21 ± 0.28 micras. Por último, en relación con las características morfológicas de las células de Leydig, es prudente destacar la presencia de un núcleo esférico que tiende a ser central y la presencia de un gran número de vacuolas en el citoplasma, estas células se localizaron siempre fuera de los túbulos seminíferos en íntima asociación con los vasos sanguíneos situados en el tejido conjuntivo intersticial. El diámetro del núcleo de estas células fue de 7.16 ± 0.15 micras.

En los frotis de material biológico de testículo de hámster obtenido por punción con aguja fina fue posible la identificación de espermatozoides primarios, células de sostén o de Sertoli y células de Leydig o intersticiales (Fig. No. 1 y 2). Las características morfológicas de cada una de estas células fueron similares a las de las células observadas en los cortes, sin embargo el diámetro medio de los núcleos de dichas células presentó una diferencia en tamaño estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Ver Cuadro No. 1. El diámetro mayor del núcleo de las células de Sertoli fue de 13.3 ± 1.49 micras; el diámetro medio del núcleo de las células de Leydig fue de 7.49 ± 0.47 micras; el diámetro medio del núcleo -

de los espermatoцитos primarios fue de 9.7 ± 1.2 micras.

Cabe señalar que en los frotis de los testículos de hámster las células de Leydig fueron muy escasas pues sólo se pudieron identificar en los frotis de 8 animales, asimismo los espermatoцитos primarios aunque es más fácil su identificación y localización en los frotis, éstos sólo pudieron ser observados en los frotis de 13 animales de los muestreados.

Cabe señalar también que en los frotis de hámster no se midieron los núcleos de las espermatogonias y espermátidas debido a que eran muy escasas.

CUYOS:

En los cortes histológicos de los testículos de cuyo fue posible la identificación de las siguientes células de la línea germinal: espermatogonias, espermatoцитos primarios, espermátidas y espermatozoides; también se identificaron células de sostén o Sertoli y células intersticiales o de Leydig

Las características morfológicas de los distintos tipos celulares fueron similares a la de los hamsters, pero las medidas de los diámetros de los núcleos fueron ligeramente diferentes. El diámetro del núcleo de las espermatogonias fue de 6.91 ± 0.58 micras; en los espermatoцитos primarios se encontró un diámetro nuclear medio de 8.59 ± 0.43 micras; el diámetro del núcleo de las espermátidas fue de 5.43 ± 0.25 micras; el diámetro medio de los núcleos de las células de Sertoli fue de 12.5 ± 0.83 micras.

En los frotis de material biológico de los testículos de cuyo obtenidos por punción con aguja fina fue posible la identificación de espermatoцитos primarios, espermátidas y células de Sertoli (Figuras No. 3 y 4).

Las características morfológicas de cada una de estas células fueron similares a las de las células observadas en los cortes histológicos;

sin embargo se encontró una diferencia estadísticamente significativa de $(P < 0.05)$ en el tamaño del diámetro medio en el núcleo de dichas células. El diámetro de los núcleos de espermatoцитos primarios fue 10.62 ± 0.99 micras; el diámetro del núcleo de las espermátidas fue de 7.79 ± 0.29 micras y el diámetro mayor de las células de Sertoli fue de 16.47 ± 1.97 micras. (Ver cuadro No.1).

Cabe señalar que en los frotis de cuyos no se midieron los núcleos de espermatoгонias y células de Leydig debido a que eran muy escasas.

DISCUSION:

De los resultados obtenidos se puede decir que el material biológico obtenido por punción con aguja fina permite realizar frotis en los cuales es posible observar distintos tipos celulares propios del testículo. Como lo señalan ciertos autores (1,8), la técnica es rápida y fácil de realizar y por lo general se obtienen buenos resultados; cabe agregar que, -- aunque en la literatura revisada no se encontraron trabajos experimentales para probar la inocuidad del método, algunos autores (1,8), aseguran que el método es inócuo y que no existen contraindicaciones en su uso.

La identificación de las células propias del testículo obtenidas por punción con aguja fina es sumamente sencilla si se toman en cuenta todas las características morfológicas y morfométricas de los núcleos, ya que las características citoplasmáticas pueden ser similares. Antes de ver los frotis para la identificación de los diversos tipos celulares es necesario observar con cuidado todos los detalles morfológicos de las células testiculares en cortes histológicos de este órgano. Tomando en cuenta las características mencionadas podemos agrupar a las células en dos grandes grupos: Las de núcleo voluminoso y las de núcleo pequeño. En las primeras incluimos a las células de Sertoli, espermatoгонias y espermatoцитos prima

rios, en las segundas quedarían incluidas las espermatídas, los espermatozoides y las células intersticiales o de Leydig.

Para distinguir las células de núcleo voluminoso entre sí es pertinente tomar en cuenta la presencia de un nucléolo central que generalmente aparece de color rosado cuando el frotis se tiñe con la técnica de Papanicolaou, cuando esta característica se cumple se puede asegurar que se trata de una célula de Sertoli. En cambio cuando el núcleo presenta grumos muy manifiestos y nítidos que corresponden a cromosomas en profase de meiosis I se asegura que se trata de un espermatozocito primario. Las espermatogonias se pueden distinguir de las dos células anteriores porque carecen de nucléolo manifiesto y de grumos de cromatina dispersa de manera desigual.

Para distinguir a las células de núcleo pequeño entre sí, las características morfológicas que tenían que tomarse en consideración para poder diferenciar los dos únicos tipos celulares que podrían confundirse (las espermatídas y las células de Leydig) son la presencia de un nucléolo voluminoso y central y de un grumo en el citoplasma yuxtanclear fuertemente PAS positivo que corresponde al aparato de Golgi, cuando estas características se cumplen se asegura que se trata de una espermatída. En cambio, las células intersticiales o de Leydig presentan un citoplasma vacuolado y el núcleo con cromatina ligeramente más condensada.

Aunque se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$), entre los diámetros de los núcleos de las células observadas en los cortes histológicos y en las células observadas en los frotis la proporción que guardan entre sí los tamaños de los núcleos de los diferentes tipos celulares en los cortes se conservó en los frotis.

En cuanto a las causas de la diferencia de tamaño de los núcleos de las células presentes en los cortes histológicos y los núcleos de las -

células en los frotis, se puede decir que son debidas fundamentalmente a los métodos de fijación empleados en ambos procedimientos. Se sabe (6), -- que el fijador de Bouin es el fijador de elección cuando se quiere evitar al máximo la distorsión de los elementos que constituyen el parénquima testicular, encambio la acetona es un fijador de uso limitado debido a la distorsión que suele ocasionar en los tejidos, algunos investigadores consideran que es mejor para el caso del testículo el alcohol de 96° como fijador.

Azua Blanco (1), aparentemente es el investigador que con más detalle ha descrito los diferentes tipos celulares del testículo en frotis de material biológico obtenido por punción con aguja fina. Esta autor señala que en el hombre -única especie con la que trabaja- las células de -- Leydig y de Sertoli son parecidas y que sólo se distinguen una de otra porque las primeras presentan en su citoplasma en el 50% de los casos, cristales de Reinke. De acuerdo con los resultados del presente trabajo existen características tales como el diámetro nuclear que ayudan mucho en la identificación de estos dos tipos celulares. En relación con las células germinales este autor sólo describe algunos cuantos aspectos morfológicos que difícilmente permiten distinguir un tipo celular de otro y no hace hincapié en lo relativo al diámetro nuclear; esta característica morfométrica aunada a algunas características morfológicas permiten distinguir los distintos tipos celulares de la línea germinal.

El método de punción con aguja fina utilizado en testículo es un método sencillo y fácil de realizar que en muchos casos podría ser sustituto de la biopsia testicular, este método permite la valoración de diversos aspectos relacionados con la fisiología testicular, y aunque diversos autores insisten en que se trata de un método que no es perjudicial es necesario corroborar mediante un trabajo experimental si efectivamente se trata-

de un método inócuo. Cabe por último señalar que toda persona que desee -- adiestrarse en la identificación de los distintos tipos celulares propios del testículo obtenidos por punción con aguja fina, debe entrenarse primero en la identificación de estas células en cortes histológicos de este órgano.

CONCLUSIONES:

En los frotis de hámster se establecieron los parámetros de los núcleos para la identificación de espermatoцитos primarios, células de Sertoli y células de Leydig, así como en los frotis de cuyo se establecieron los parámetros de los núcleos para la identificación de espermatoцитos primarios, espermátidas y células de Sertoli.

Los parámetros que para la correcta identificación de los distintos tipos celulares del testículo deben ser considerados, son las características morfológicas y de tamaño del diámetro nuclear de dichas células; si no se toman en cuenta ambos parámetros es difícil asumir que se ha hecho una identificación correcta.

Al usar el método de punción con aguja fina el diámetro nuclear - de los distintos tipos celulares es mayor cuando lo comparamos con los diámetros de los mismos tipos celulares pero procesados para cortes histológi- cos. Sin embargo la diferencia proporcional entre las distintas medidas de diámetro nuclear para los diferentes tipos celulares se conserva con la técnica de punción.

LITERATURA CITADA

- 1.- Azúa Blanco de, J.: Valoración de la espermatogénesis mediante punción citológica con aguja fina. Actas Urol. Esp. 6:321-324 (1980).
- 2.- Blaquier, J.A., Cameo, M.S. and Burgos, M.H.: The role of androgens in the maturation of epididymal spermatozoa in the guinea pig. Endocrinology 90: 839 (1972).
- 3.- Derivaux, J.: Fisiopatología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Animales Domésticos. Editorial Acribia, España. (1961).
- 4.- Galina, C.S.: An Evaluation of Testicular biopsy in Farm animals. Vet. Rec 83: 628-631 (1971).
- 5.- Hafez, E.S.E.: Reproducción de los Animales de Granja. Segunda Edición. Editorial Herrero, S.A. México 1978.
- 6.- Lillie R.D. and Fullmer Harold M. Histopathologic Technic and Practical Histochemistry. 40 Ed. Mc Graw - Hill Book Company, New York. 1976.
- 7.- Lubics - Nawrocki, C.M. and Glover, T.D.: Effects of gonadectomy and -testosterona replacemente on the viability of epididymal spermatozoa in golden hamster. J. Endocr. 48; XXII, XXIII (1970).
- 8.- Persson P.S., Ahrén, CH. And Obrant, K.O.: Aspiration Biopsy smear of testis in asoospermia. Scand J, Urol Nephrol 5: 22-26 (1971).
- 9.- Zemjanis, R.: Reproducción Animal Diagnóstico y Técnicas Terapéuticas. Editorial Limusa. México 1980.

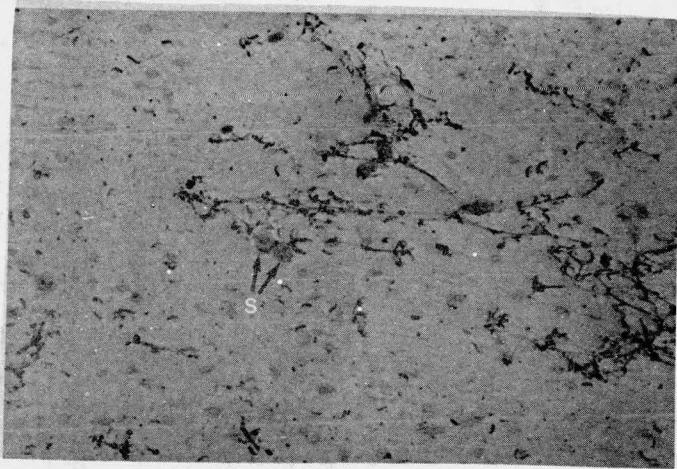


Figura No.1 - Microfotografía de frotis de material biológico de testículo de hámster obtenido por punción con aguja fina - donde se observan los núcleos de dos células de sostén o de Sertoli (S) señaladas con flechas. Técnica de Papanicolaou -- (160 X).

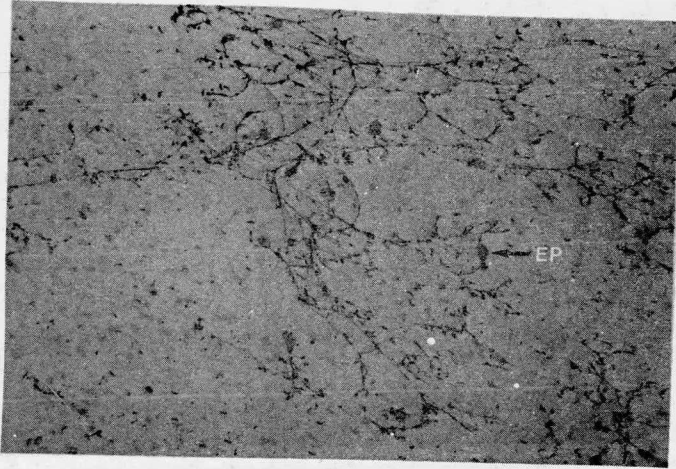


Figura No. 2 - Microfotografía de material biológico de testículo de hámster obtenido por punción con aguja fina donde se observa el núcleo de un espermatocito primario (EP) señalada con flechas. Técnica de Papanicolaou. (160 X).

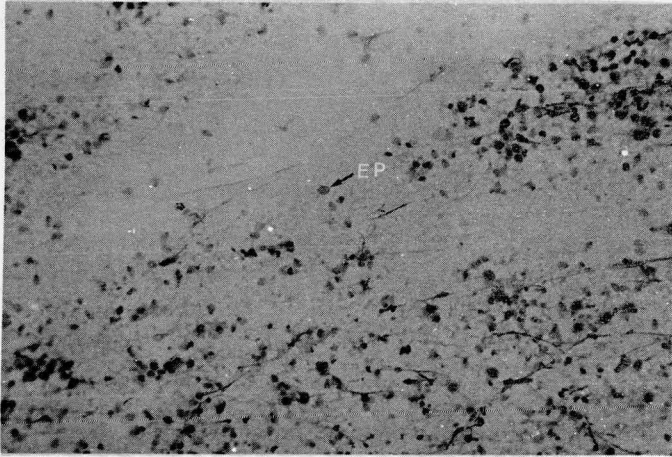


Figura No. 3 - Microfotografía de frotis de material biológico de testículo de cuyo obtenido por puncion con aguja fina donde se obsrva el núcleo de un espermatocito primario (EP) señalado con la flecha. Técnica de Papanicolaou (160 X).

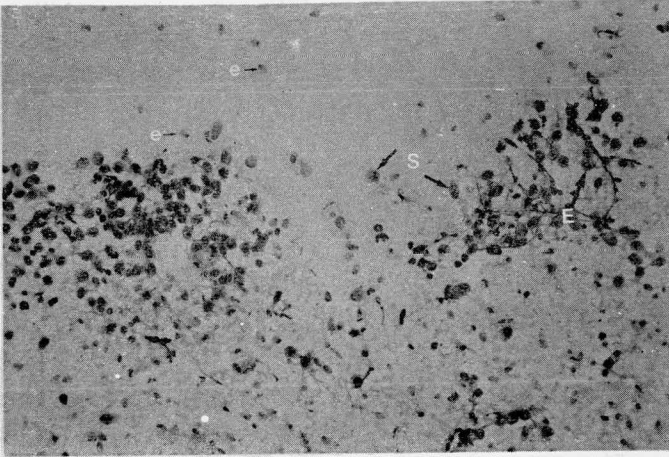


Figura No.4 - Microfotografía de frotis de material biológico de testículo de cuyo, obtenido con punción con aguja fina, -- donde se observan los núcleos de células de Sertoli (S), esper_umátidas (e) y espermátida temprana (E) señalados con flecha. - Técnica de Papanicolaou. (160 X).

Cuadro No.1 En este cuadro se pueden observar la comparación en los diámetros de los núcleos de los distintos tipos de células testiculares tanto en cortes histológicos como de los frotis obtenidos por punción con aguja fina. las medidas estan en micras.

TIPO CELULAR	H A M S T E R S				C U Y O S			
	TOTAL DE NUCLEOS MEDIDOS	CORTE HISTOLOGICO	TOTAL DE NUCLEOS MEDIDOS	FROTIS	TOTAL DE NUCLEOS MEDIDOS	CORTE HISTOLOGICO	TOTAL DE NUCLEOS MEDIDOS	FROTIS
ESPERMATOGONIAS	540	6.34 ± 0.34	---	-----	540	6.91 ± 0.58	---	-----
ESPERMATOCITOS PRIMARIOS	540	8.1 ± 0.34 *	79	9.7 ± 1.2 *	540	8.59 ± 0.43 *	90	10.62 ± 0.99 *
ESPERMATIDAS	540	5.38 ± 0.86	---	-----	540	5.43 ± 0.25 *	90	7.79 ± 0.29 *
SERTOLI	540	11.21 ± 0.28 *	90	13.3 ± 1.49 *	540	12.5 ± 0.8 *	90	16.4 ± 1.97 *
LEYDIG	540	7.16 ± 0.15 *	49	7.9 ± 0.47 *	540	7.44 ± 0.26	---	-----

* Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$), entre los diámetros de los núcleos de las células del mismo tipo obtenidas tanto en corte histológico como de los frotis obtenidos por punción con aguja fina.

