

CONDENSACIÓ DE LA CROMATINA DINS EL NUCLI ESPERMÀTIC DEL CEFALÒPODE *Sepia officinalis*

Fina Martínez,¹ Kathryn Kurtz,¹ Manel Chiva,¹ Enric Ribes²

Departament de Ciències Fisiològiques II. Facultat de Medicina.

Campus de Bellvitge. Feixa Llarga, s/n. 08907 Hospitalet de Llobregat. Tel. 934 035 824. Fax 934 024 268. Adreces electròniques: finamartinez@ub.edu, klurt00@smumn.edu, mchiva@ub.edu.

Departament de Biologia Cel·lular. Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

Av. Diagonal, 465 (1a planta). 08071 Barcelona. Adreça electrònica: eribes@ub.edu.

Resum

Durant l'espermioèlisi del cefalòpode decàpode *Sepia officinalis* el nucli espermàtic sofreix una lleugera elongació. La cromatina de tipus somàtic es condensa gradualment en grànuls de 18-20 nm. Els grànuls alhora s'organitzen en fibres de 20 a 25 nm i progressivament aquestes fibres es fusionen entre si per a donar lloc a fibres més gruixudes de 40-60-80 nm, fins a esdevenir la cromatina altament compacta del nucli espermàtic madur. Existeix una estreta relació entre la cromatina condensant, l'embolcall nuclear i la distribució dels microtúbuls perinuclears: les fibres de cromatina s'acumulen al llarg de l'eix acrosoma-centríol d'un dels laterals de l'espermàtida en elongació, lateral on hi ha els microtúbuls en la mateixa orientació; en el lateral oposat té lloc sobretot l'eliminació de nucleoplasma sobrer en forma de vesícules a causa de la compressió dels microtúbuls. En l'última etapa de la nucleomorfoèlisi, els microtúbuls es despolimeritzen i se separen del nucli.

Paraules clau Espermioèlisi, microtúbuls, nucleomorfoèlisi, cefalòpode.

Abstract

During spermiogenesis of the cephalopod decapod *Sepia officinalis*, the spermatid nucleus is slightly elongated. Somatic-like chromatin is gradually condensed in 18-20 nm thick granules, which will be organized in 20 to 25 nm thick fibers. These fibers are progressively fused with each other to form thicker ones 40-60-80 nm until the chromatin is highly packed in the ripe sperm nucleus. There is a close relationship between condensing chromatin, the nuclear envelope and perinuclear microtubules: chromatin fibers lay along the acrosome-centriole axis of one of the two sides of the elongating spermatid, side in which the microtubules are disposed in the same orientation; on the opposite side, is where the exclusion of the superfluous nucleoplasm takes place, due to the pressure of the microtubules. Finally, in the last step of spermiogenesis, the microtubules are eliminated from the nuclei.

Key words Spermiogenesis, microtubules, nucleomorphogenesis, Cephalopoda.

INTRODUCCIÓ

L'espermioèlisi és el procés de divisió i diferenciació cel·lular que té lloc en la gònada masculina, i que condueix a la formació dels espermatozoides madurs. L'última etapa d'aquest procés és coneguda com a *espermioèlisi*, en la qual les espermàtides haploides sofreixen una sèrie de canvis molt importants fins a esdevenir l'espermatozoide madur.

L'espermioèlisi dels mamífers és la millor estudiada (Fawcett, 1975), però cal tenir present que aquest

és un procés molt variable entre les diferents espècies animals i que, per tant, no es pot generalitzar i és necessari estudiar-la dins de cada grup d'animals. Un dels grans canvis que experimenta el genoma haploide de l'espermàtida és la condensació de la cromatina i la consegüent reducció del volum nuclear. Aquesta reducció de volum és deguda a un canvi més o menys important en la composició de la cromatina: generalment, les histones somàtiques són substituïdes per unes proteïnes específiques riques en aminoàcids bàsics, conegudes sota el terme genèric *sperm nuclear*

basic proteins (SNBP) (Kasinsky, 1989). La interacció d'aquestes proteïnes amb el DNA provoca la condensació de la cromatina. La diversitat de les SNBP és extraordinàriament elevada i, en conseqüència, la manera com la cromatina espermiogènica es condensa dins el nucli també és molt diversa. (Del Valle *et al.*, 1998).

Dins dels invertebrats els cefalòpodes són un grup interessant per a estudiar-ne l'espermiogènesi. Les primeres observacions morfològiques fetes al microscopi òptic daten de 1967 (Franzén, 1967); més endavant s'han realitzat també estudis ultraestructurals amb microscòpia electrònica (Maxwell, 1975). Recentment, hem estudiat amb profunditat la condensació de la cromatina espermiogènica en els octòpodes *Octopus vulgaris* i *Eledone Cirrhosa* i les seqüències de les protamines que produeixen aquests patrons de condensació.

En aquest treball hem estudiat aquest procés de condensació de la cromatina del cefalòpode decàpode *Sepia officinalis* al microscopi electrònic, per tal de tenir un estudi més complet d'aquest procés dins el grup dels cefalòpodes. Descriuim el patró de condensació que té lloc a causa de la interacció de les protamines de la sèpia (Martin-Ponthieu *et al.*, 1991; Schindler *et al.*, 1991) amb el DNA. També discutim el paper dels microtúbuls i la membrana nuclear en l'espermiogènesi.

MATERIAL I MÈTODES

Es va fer una recollecció de mascles de *Sepia officinalis* al mes de juliol (època de l'any en què aquestes espècies estan en reproducció), i es varen transportar en gel immediatament al laboratori per a fer-ne la dissecció i processar les mostres.

Es varen fixar porcions de gònades en 2,5 % glutaralhid, 3 % paraformalhid en tampó cacodilat 0,1 M pH 7,4 i es varen incloure en Spurr per a l'observació al TEM. Aquestes mostres varen ser observades en un microscopi electrònic de transmissió Hitachi 4-600 (Hitachi Ltd., Tòquio, Japó).

RESULTATS

El nucli de l'espermatida més primerenca (just després de la meiosi) presenta un aspecte de la cromatina de tipus somàtic on s'aprecia la heterocromatina i l'eucromatina (vegeu la figura 1a). Immediatament després, la cromatina adquireix un aspecte homogeni en forma de grànuls (vegeu la figura 1b). En la mateixa figura s'observa l'inici de la polarització de la cèl·lula: es dona un acúmulo de mitocondris allí on s'iniciarà la

invaginació flagellar (base) i una aglutinació de vesícules (procedents del Golgi), que formaran l'acrosoma (àpex). En aquestes zones on hi ha contacte entre la vesícula acrosòmica per l'àpex i els mitocondris i la invaginació per la base, s'observa una clara electrodensificació de l'embolcall nuclear. Aquesta cèl·lula espermiogènica inicial té una secció de 4 µm. En un estadi una mica posterior (vegeu la figura 1c), ja són evidents tant la invaginació centriolar (vegeu la figura 1e), com la vesícula acrosòmica (vegeu el detall de la figura 1d). En aquesta fase, la cromatina es troba distribuïda homogèniament dins el nucli, organitzada en forma de grànuls de 18-20 nm (vegeu el detall de la figura 1e). En aquest detall veiem també com, per una banda, s'intueix l'ancoratge d'aquesta cromatina en grànuls a la membrana interna de l'embolcall nuclear de la invaginació i que aquesta s'electrodensifica; per altra banda, també s'aprecien els microtúbuls que comencen a formar-se a partir de la part basal (vegeu les fletxes de la figura 1e). Aquest estadi és l'estadi més primerenc en què hem pogut observar els microtúbuls, i es pot veure que l'orientació d'aquests no és la mateixa en un lateral de l'espermatida que en l'altre: en el costat esquerre de la fotografia es diferencien molt millor que no pas en el costat dret, a causa de la diferent disposició en l'espai.

La condensació de la cromatina avança, i els grànuls passen a organitzar-se en fibres de 20 a 25 nm de diàmetre (vegeu la figura 1f). Aquestes fibres no solament estan ancorades en la membrana de l'àpex, sinó que també s'ancoren a la membrana lateral (vegeu el detall i les fletxes de la figura 1h). En aquest mateix estadi, hi ha hagut també una elongació del nucli: l'eix acrosoma-centríol mesura 5,2 µm. Aquí els microtúbuls perinuclears apareixen ja del tot formats, ja que es poden observar en talls a diferents nivells de l'espermatida en elongació (vegeu el detall i les fletxes de la figura 1h).

Progressivament, aquestes fibres es fusionen entre si i donen lloc a fibres de cromatina més gruixudes de 40 a 50 nm (vegeu la figura 1i). De fet, aquest és el canvi més important que hi ha hagut en aquest estadi respecte l'anterior, ja que la forma i mida del nucli es mantenen molt similars (compareu les figures 1f i i). La figura 1j mostra un detall de la zona apical (acrosoma), on es veu que la unió de les fibres de 40 nm a l'embolcall nuclear és similar a les fibres de 20 nm: es troben unides a la base, a l'àpex i també a la membrana lateral. La figura 1k mostra un tall transversal d'aquest estadi on es veu que no totes les fibres es troben en la mateixa direcció, sinó que hi ha fibres que estan tallades transversalment i, en canvi, en el lateral oposat, hi ha fibres ancorades perpendicularment a la membrana. Quan en aquest estadi observem la distribució dels mi-

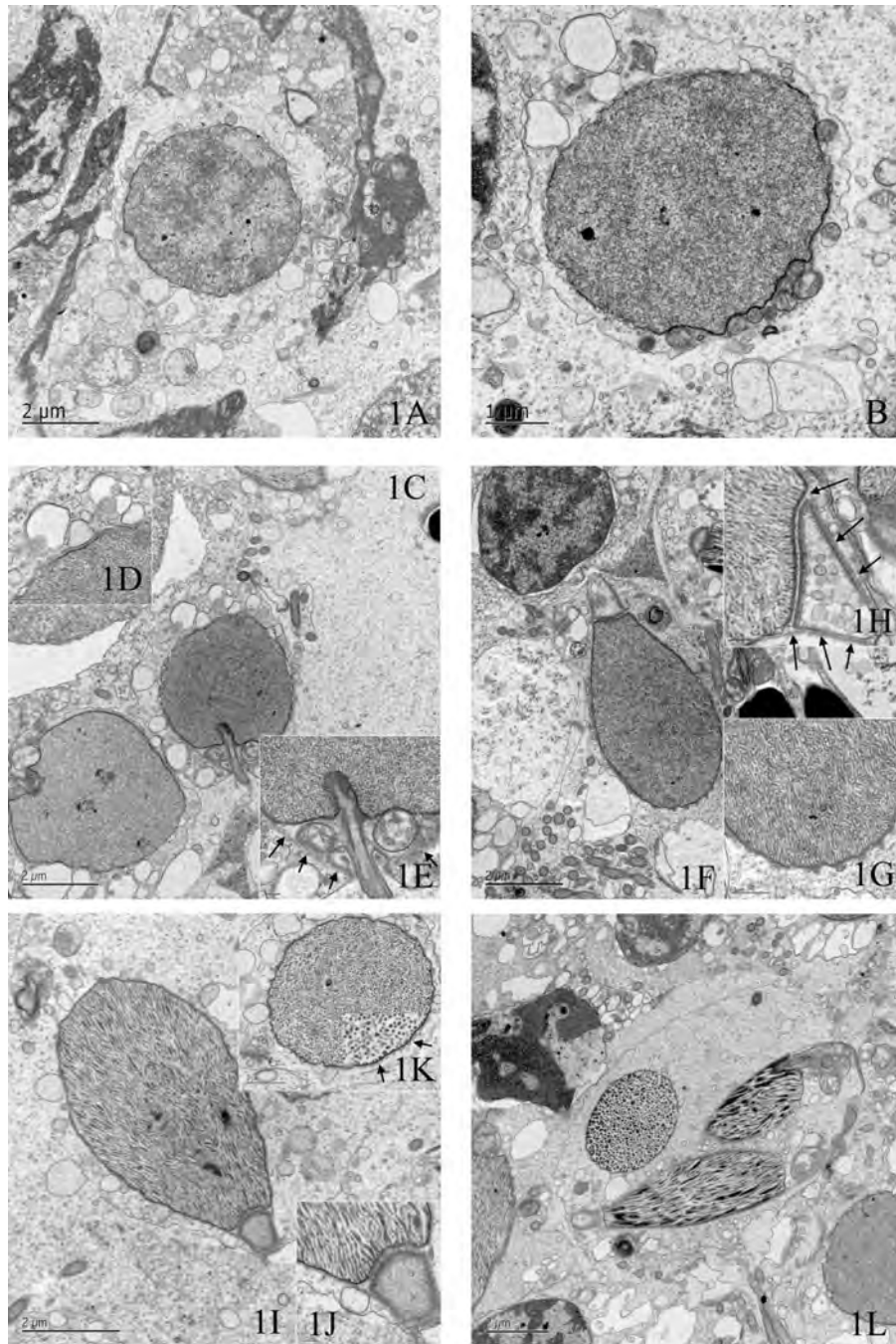


Figura 1 **A:** Espermàtida temprana just després de la meiosi, en la qual es pot diferenciar l'heterocromatina i l'eucromatina. **B:** Espermàtida rodona en els seus inicis de polarització: la cromatina és homogènia, pas previ a l'organització en grànuls. El nucli té una secció de 4 μm de diàmetre. **C:** Imatge panoràmica d'una espermàtida en la qual la cromatina està organitzada en grànuls de 18-20 nm. **D:** Detall de la zona apical on es veu l'acrosoma en formació (rebut vesícules del Golgi) i l'electrodensificació de la membrana de contacte. **E:** Detall de la base on s'inicia la invaginació: aquí es poden veure els microtúbuls (fletxes) orientats de manera diferent en un lateral que en l'altre; els mitocondris a la base de la invaginació, i l'electrodensificació de la membrana nuclear en la zona de la invaginació. **F:** Visió panoràmica d'una espermàtida en la qual les fibres mesuren 20-25 nm. **G:** Detall de l'estadi de les fibres. **H:** Detall de la zona apical on es veuen els microtúbuls (fletxes). **I:** Espermàtida més avançada. **J:** Detall de les fibres de cromatina de 40 nm. Noteu també l'ancoratge d'aquestes a la membrana. **K:** Secció transversal on es veu la diferent distribució de les fibres i microtúbuls; en el detall els microtúbuls i la membrana estan a major augment. **L:** Secció longitudinal i transversal d'una espermàtida en l'inici de la distribució asimètrica de la cromatina.

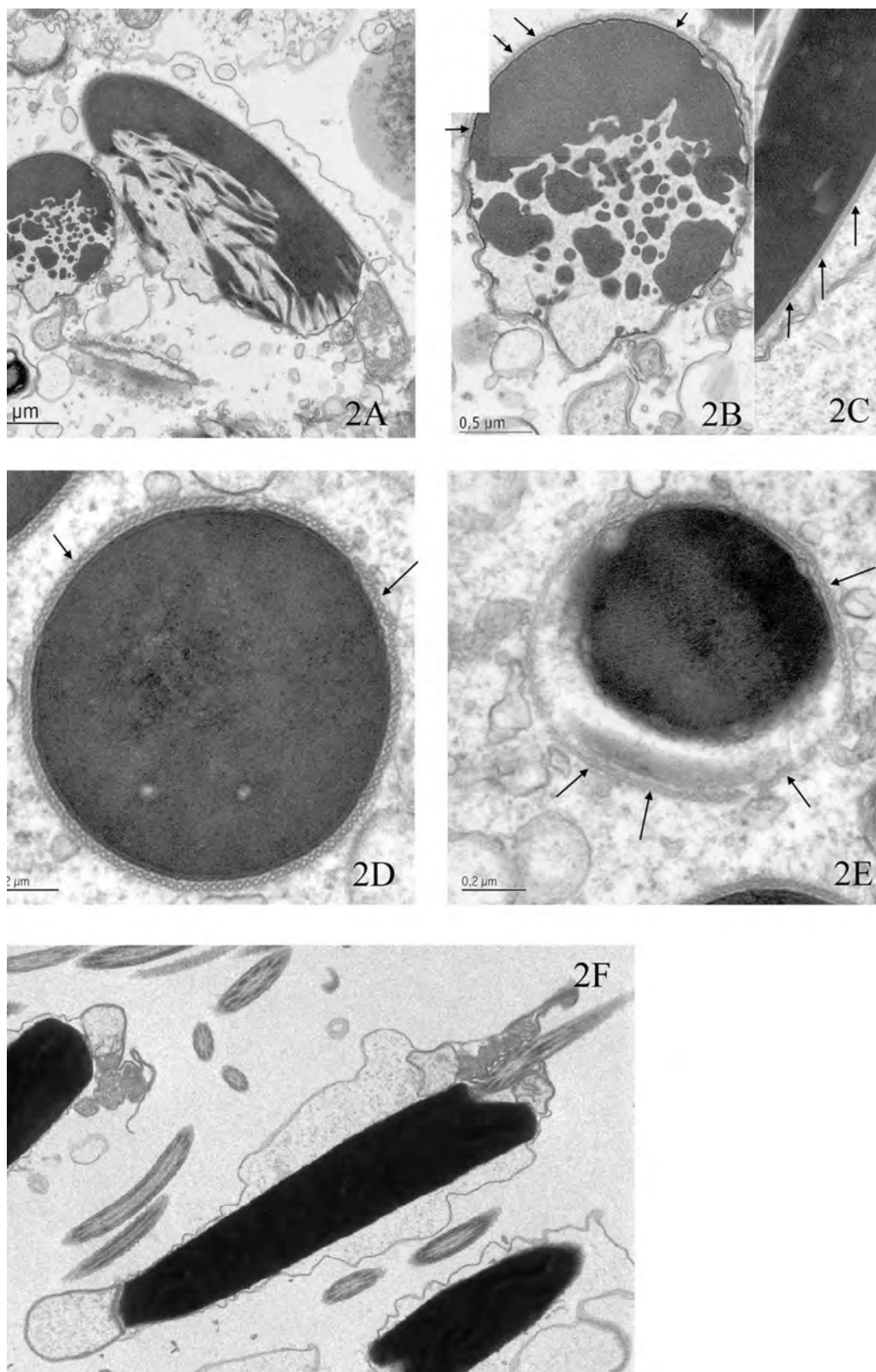


Figura 2 **A:** Imatge panoràmica on es pot veure la distribució de la cromatina en un dels laterals de l'espermàtida. **B:** Detall de la secció transversal (noteu els microtúbuls). **C:** Detall de la secció longitudinal. **D:** Nucli espermàtic amb la cromatina ja condensada. Noteu els microtúbuls perinuclears. **E:** Pèrdua de microtúbuls al final de l'espermiogènesi.

crotúbuls, veiem que hi ha una estreta relació: allí on les fibres estan tallades transversalment, els microtúbuls també es troben tallats transversalment i, de fet, la zona de contacte entre microtúbuls i la cromatina condensant amb la membrana és la mateixa (vegeu el detall ampliat de la figura 1k); en canvi, en el lateral oposat, on les fibres estan ancorades perpendicularment a la membrana, els microtúbuls en aquest costat tenen una orientació diferent i no es poden veure amb claredat.

Les fibres de 40 nm s'associen entre si, i formen fibres de 70-80 nm de gruix distribuïdes homogèniament al llarg de l'eix acrosoma-centríol. La figura 1l mostra un estadi immediatament posterior, on s'inicia el que més endavant es fa evident: una distribució asimètrica de la cromatina condensant. Tant en els dos talls longitudinals com transversals (que estan en el mateix estadi), s'aprecia l'inici de com la cromatina tendeix a disposar-se en el lateral on hi ha la invaginació. Aquesta distribució de la cromatina és conseqüència, en part, de la unió de les fibres en condensació que es troben unides a la membrana lateral (com ja hem vist en els estadis anteriors) i, en part, a la distribució dels microtúbuls perinuclears. La següent figura (2a) ho demostra: en aquest tall transversal, veiem com la cromatina s'aglutina en un lateral, i com hi ha una estreta relació entre aquest fet i els microtúbuls: els detalls demostren clarament com els microtúbuls estan posats en els laterals on s'acumula la cromatina i els podem veure tant transversalment (vegeu la figura 2b) com longitudinalment (vegeu la figura 2c).

Paral·lelament a aquest procés de condensació també es dona una compressió del nucli i una reducció del volum nuclear. En la figura 2b es veu com l'empaquetament i reclutament de la cromatina en un lateral comporta que hi hagi altres zones de la membrana del lateral oposat «lliures», que seran eliminades en forma de vesícula, amb el nucleoplasma sobrer.

La figura 2d mostra el resultat d'aquest procés de condensació de la cromatina i reducció de volum nuclear, en què els microtúbuls envolten completament el perímetre del nucli i la cromatina està totalment condensada. Posteriorment, i abans que l'espermàtida passi a l'epidídim, els microtúbuls són eliminats i degradats (vegeu la figura 2e).

En els primers trams de l'epidídim, els espermatozoides han perdut els microtúbuls (vegeu la figura 2f). L'espermatozoide mesura 6 µm de llarg i té una secció de 4 µm.

DISCUSSIÓ

Les observacions realitzades en aquest treball indiquen que en l'espermioogènesi del cefalòpode *Sepia officinalis* hi ha diversos aspectes a tenir en compte per a poder entendre en procés.

En primer lloc, cal esmentar que el procés de condensació de la cromatina en el decurs de l'espermioogènesi és el resultat d'un canvi progressiu de les proteïnes que interaccionen amb el DNA. El cas de la sèpia es caracteritza per una doble transició en la composició proteica del nucli, on les histones són primer reemplaçades per una proteïna precursora de la protamina (microheterogènia) i, posteriorment, aquesta serà substituïda per la protamina (Martin-Ponthieu *et al.*, 1991; Schindler *et al.*, 1991). El punt de partida és l'espermàtida rodona amb un aspecte i composició de la cromatina similar a la d'un nucli somàtic, on es diferencia l'heterocromatina i l'eucromatina, i el DNA s'organitza en nucleosomes (cosa que coneixem com a *somatic-like chromatin*). A partir d'aquí, la cromatina s'organitza en grànuls de 18-20 nm; després en fibres de 20-25 nm i posteriorment aquestes fibres es fusionen entre si i formen fibres més gruixudes (40-60-70 nm) fins a formar la cromatina altament compacta del nucli madur. Els motius concrets pels quals es donen aquests canvis en la condensació de la cromatina encara no s'entenen del tot bé, però estan estretament lligats amb els canvis de composició de les proteïnes del nucli.

Un altre aspecte molt important a tenir en compte per a entendre el procés de diferenciació del nucli espermàtic de sèpia és l'estreta relació que mantenen l'embolcall nuclear, els microtúbuls i la cromatina condensant durant l'espermioogènesi.

En estadis primerencs, quan l'espermàtida rodona comença a polaritzar-se, l'embolcall nuclear s'electrodensifica per les zones de contacte amb l'acrosoma (àpex) i la invaginació i mitocondris (base) (vegeu la figura 1b). Posteriorment, tant en les fibres de 20-25 nm com en les de 40-45 nm s'ancoren a l'àpex, a la base i, diferentment del que hem observat en *Octopus*, també s'uneixen en un dels laterals (vegeu les figures 1h i k). En aquest estadi també hi ha hagut una lleugera elongació del nucli respecte l'estadi anterior, possiblement a causa de la formació dels microtúbuls perinuclears, ja que és en aquesta fase on els podem observar tot al llarg de la perifèria nuclear. En els següents passos és quan es veu clarament una relació directa entre la manera com es disposa la cromatina condensant, els microtúbuls i la membrana nuclear: la membrana nuclear del lateral on s'acumula la cromatina és més electrodensa, i els microtúbuls estan disposats en la mateixa orientació que la cromatina (vegeu el detall de

la figura 2b); per altra banda, la membrana del lateral oposat és més laxa i és principalment per on tindrà lloc la pèrdua de nucleoplasma sobrer; aquí és més difícil diferenciar el microtúbuls, atès que es troben en una orientació diferent (vegeu la figura 2a i el detall de la 2b).

Quan la cromatina condensada ocupa la totalitat del volum del nucli, veiem que els microtúbuls es troben disposats un al costat de l'altre, tot al llarg del perímetre nuclear i que, finalment, abans de deixar la gònada són eliminats (vegeu la figura 2d), i ens trobem a l'epidídim els espermatozoides sense microtúbuls. Ja el 1975, Maxwell havia observat la presència dels microtúbuls perinuclears en els decàpodes i octòpodes (Maxwell, 1975, 1974, respectivament), i fa esment que es tracta d'estructures transitòries que acaben sent eliminades en ambdós grups. En l'estudi de l'espermioogènesi d'*Eusepia officinalis* (ref. 7), Maxwell descriu la nucleomorfogènesi com un procés de canvi de forma, en què el nucli de l'espermàtida rodona inicial sofreix una compressió lateral. En aquest treball, no obstant això, hem observat que l'espermàtida rodona (de 4 µm de diàmetre) sofreix una lleugera elongació, ja que hem observat estadis intermedis on la llargada és de 5,4 µm (vegeu la figura 1i). I en l'epidídim l'espermatozoide madur de *Sepia officinalis* mesura 7 µm de llarg i 1,17 µm d'ample (vegeu la figura 2f).

Aquest treball ha estat finançat pel projecte BMC 2002-04081-C02-02.

AGRAÏMENTS

Voldríem agrair a la Dra. N. Cortadellas i a A. García els seus consells i el seu interès en aquest treball.

BIBLIOGRAFIA

- DEL VALLE, L. [*et al.*] (1998). «Empaquetament del DNA en els espermatozoides». *Treballs de la SCB*, 48:199-224.
- FAWCETT, D.W. (1975). *Develop. Biol.*, 44:394-436.
- FRANZÉN, A. (1967). «Spermiogenesis and spermatozoa of the Cephalopoda». *Ark. Zool.*, 19:320-334.
- KASINSKY, H. E. (1989). «Specificity and distribution of sperm basic proteins». Dins: HNILICA, L. S.; STEIN, G.; STEIN, J. (ed.), *Histones and other basic nuclear proteins*, Boca Raton, Florida: CRC Press.
- MARTIN-PONTHIEU [*et al.*] (1991). «Cuttlefish sperm protamines. I: aa sequences of two distinct variants». *Eur. J. Biochem.*, 195:611-619.
- MAXWELL (1974). «Spermiogenesis of *Eledone cirrhosa*». *Proc. R. Soc. Lond.*, 186:181-190.
- (1975). «Spermiogenesis of *Eusepia officinalis*, *Loligo forbesi* and *Allotheuthis subulata*». *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 191:527-535.
- SCHINDLER, P. [*et al.*] (1991). «Cuttlefish sperm protamines. II: Mass spectrometry of protamines and related peptides». *Eur. J. Biochem.*, 195:621-629.