

ASPECTES ULTRAESTRUCTURALS DE L'ESPERMIOGÈNESI DE *Chaetopleura fulva*, (MOLLUSCA, POLYPLACOPHORA): ESTUDI PRELIMINAR

M. Gràcia Bozzo, Montserrat Poquet, Elena Sagristà, Mercè Durfort

Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona
Av. Diagonal, 465. 08071 Barcelona. *mbozzo@ub.edu*.

In memoriam de Josep Egozcue i Cuixart (1940-2006)

«La celada genètica de l'espermatozoide humà s'entesta a mantenir el seu secret. Poc a poc, però, les noves tecnologies i la superior tos-suderia dels investigadors acabaran per torpedinar l'escàpol submari i desvetllar, de forma definitiva, els misteris que, al llarg de tants anys ens han estat amagats, i que tanta resistència han oposat i encara oposen als nostres esforços».

JOSEP EGOZCUE, 1999

Resum

L'estudi de l'espermioogènesi del quitó *Chaetopleura fulva* (mollusc, polioplacòfor) posa de manifest que les espermàtides joves presenten un nucli arrodonit amb la cromatina granular. Les espermàtides mitjanes tenen el nucli amb la cromatina filamentosa i l'embolcall nuclear forma una fosseta d'implantació amb els centríols i material dens. No s'observa una vesícula proacrosòmica ben desenvolupada. El complex de Golgi està situat en la part posterior del nucli. En les espermàtides tardanes el nucli té forma més allargada i la cromatina està en forma de cintes més gruixudes que en l'etapa anterior. En les espermàtides madures el nucli és extraordinàriament dens i s'ha desenvolupat una llarga extensió anterior a l'extrem de la qual es pot intuir també un gra acrosòmic. Tres mitocondris constitueixen una petita i asimètrica peça intermitja d'on arrenca un flagel en posició excèntrica. L'espermatozoide d'aquesta espècie es pot considerar de tipus primitiu però modificat.

Abstract

The spermiogenesis in the chiton *Chaetopleura fulva* (Mollusca, Polyplacophora) reveals that early spermatids have a round nuclei with granular chromatin. Middle spermatids have nuclei with filamentous chromatin material. The nuclear envelope exhibits a posterior implantation fossa where are the proximal and distal centriole, and the pericentriolar bodies. No developed proacrosomal vesicle is observed. The Golgi complex is always located posterior to the nucleus. In late spermatids, the nucleus is bullet-shaped, and chromatin is sheet-like. In fully developed spermatids, the nucleus is extremely dense, and has an anterior extension. In the tip of the sperm there is the small acrosomic granule. Three mitochondria constitute a very short middle piece, and an eccentric tail is established. The sperm of this species fits into the modified primitive sperm model.

INTRODUCCIÓ

Mentre que l'espermatogènesi i la morfologia dels espermatozoides ha estat estudiada en molts grups de molluscs gasteròpodes, bivalves i cefalòpodes, hi ha relativament pocs estudis de l'espermatogènesi dels polioplacòfors. Entre d'altres destaquem els estudis de Sakers (1984) i Buckalns-Nicks *et al.* (1990)

en diverses espècies de quitònids pertanyents a famílies diferents.

Els quitònids són animals unisexuals que presenten fecundació externa en l'aigua del mar. La gònada masculina està formada en un únic sac amb plects que tenen un epitelí basal sobre del qual reposa l'epitelí germinatiu, en el qual es desenvolupa l'espermatogènesi en sentit centrífug. Els gàmetes madurs

s'agrupen en el cim dels plecs en la llum del testicle i són alliberats pels conductes espermàtics.

L'espermatozoide dels quitònids ha estat descrit com de tipus primitiu, basant-se en les descripcions de morfologia comparada de Franzen (1955, 1956, 1970). Tot i això, en els estudis de diferents espècies s'ha observat una certa modificació respecte del patró de l'autor citat més amunt. Així, Russell-Pinto *et al.* (1984, 1988) descriuen espermatozoides primitius però «modificats» en quatre espècies de poliplacòfors, principalment en *Achantochitona crinita*, espècie molt propera a la que s'ha estudiat en el present treball.

Les modificacions més notables són la projecció del nucli en un llarg i estret filament, la dubtosa presència d'acrosoma com a tal, i la ubicació dels mitocondris (Sakker, 1984). Alguns autors parlen directament de manca d'acrosoma (Sakker, 1984). En canvi, d'altres descriuen un gra preacrosòmic

(Buckalns-Nicks *et al.*, 1988) de dimensions molt reduïdes que no té el procés típic de formació durant l'espermioogènesi, però que es posa de manifest durant la fecundació.

Aquest estudi ha estat precedit de resultats que hem obtingut de l'estudi de la gònada femenina de diverses espècies de quitònids recollits a la costa catalana, principalment de *Trachydermon cinereus* (*Lepidopleurus cinereus*) i d'*Acanthochitona fascicularis* (Durfort *et al.*, 1976 i 1989, entre altres). La presència i disposició de les cèl·lules fol·liculars, que en nombre determinat per a cada espècie embolcal·len la cèl·lula germinal femenina, ha d'influir en el procés de la fecundació.

L'espermatozoide de l'espècie estudiada, *Chaetopleura fulva*, que fins ara no ha estat descrit, presenta cap, peça mitjana i cua, i es pot considerar del tipus primitiu, però modificat per les característiques de l'acrosoma, la situació dels mitocondris i la condensació de la cromatina. És en els canvis que experimenta el nucli en el que ens hem centrat en el present treball.

MATERIAL I MÈTODES

En l'espècie estudiada les gònades són fàcilment diferenciables. Mentre que les gònades femenines madures de *Chaetopleura fulva* són de color marronós i aspecte granulós pel fet que els oòcits són considerablement grossos (de 250 a 400 μm de diàmetre), la gònada masculina és de color gris verdós, i això fa que es puguin identificar bé els sexes en fer la dissecció dels exemplars. Individus sexualment madurs de *Chaetopleura fulva* procedents de Cubelles i de Vilanova i la Geltrú, recollits els mesos de maig a setembre, varen ser prèviament anestesiats amb MgCl_2 al 10 % preparat amb aigua de mar, i posteriorment se'n varen aïllar i seccionar les gònades.

Per a l'estudi ultraestructural que presentem es varen sotmetre petits fragments de la gònada masculina a una doble fixació convencional amb glutaraldehyd al 2,5 % tamponat amb PBS 0,1 M, a pH 7,4 a 4° C durant dues hores, i després d'un bon rentat amb la solució tampó es va procedir a una postfixació amb tetraòxid d'osmi al 1 % , igualment preparat amb PBS i al mateix pH durant una hora. Una deshidratació progressiva amb acetona ens permet fer una inclusió amb reïna Spurr (1969). Els talls semifins de control han estat tenyits amb blau de metilè a l'1 % preparat amb bòrax al 10 %. Les seccions ultrafines obtingudes amb un Ultracut (Reichert) han estat contrastades rutinàriament amb acetat d'uranil i posteriorment amb citrat de plom. Les observacions han estat fetes amb microscopis electrònics de transmis-

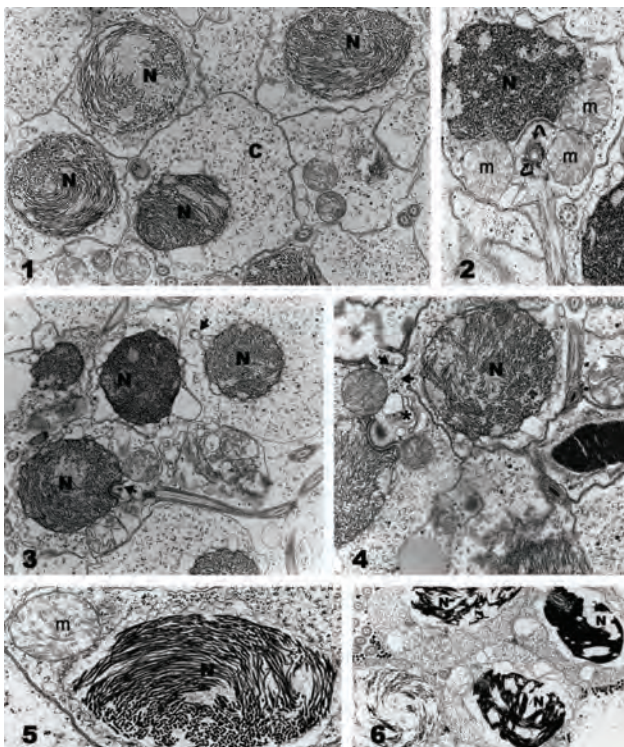


Figura 1 Espermatides amb nucli esfèric (N) i la cromatina poc compacta. Citoplasma (C) ple de glicogen (17500 \times).

Figura 2 Espermatida mitjana. Nucli granulat i fibrillar. El centríol proximal (fletxes) està situat a la fossa nuclear. Mitocondris (m) en disposició asimètrica (19000 \times).

Figura 3 Estadi d'espermatida mitjana. Inici d'un gra preacrosòmic (fletxa) (17000 \times).

Figura 4 Ponts citoplasmàtics entre les cèl·lules (fletxes). Complex de Golgi (*) junt al material dens de la fossa i entre els mitocondris (19000 \times).

Figures 5 i 6 Transició de la compactació de la cromatina: granular, fibrillar i en cabdell. N: nucli, m: mitocondri (22000 \times i 17000 \times).

sió Philips 300 i Hitachi H600 AB dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

RESULTATS

Morfologia de l'espermatozoide

L'espermatozoide de *Chaetopleura fulva* és una cèl·lula uniflagelada d'uns 60 a 65 μm de longitud. El cap té una forma cònica que es continua amb una estreta extensió filiforme d'uns 3 μm de llargada i 80 nm de diàmetre, cosa que li dona una morfologia peculiar i característica. Està constituït pel material nuclear fortament condensat i una dilatació lateral on se situen els mitocondris (figures 9 i 10)

Els centríols proximal i distal estan envoltats de material electrodens i inclosos en una invaginació posterior del nucli, la fosseta d'implantació (figura 8). El centríol proximal, perpendicular al distal, està connectat a la base del nucli per fibres denses. El centríol distal és paral·lel a l'eix de l'espermatozoide

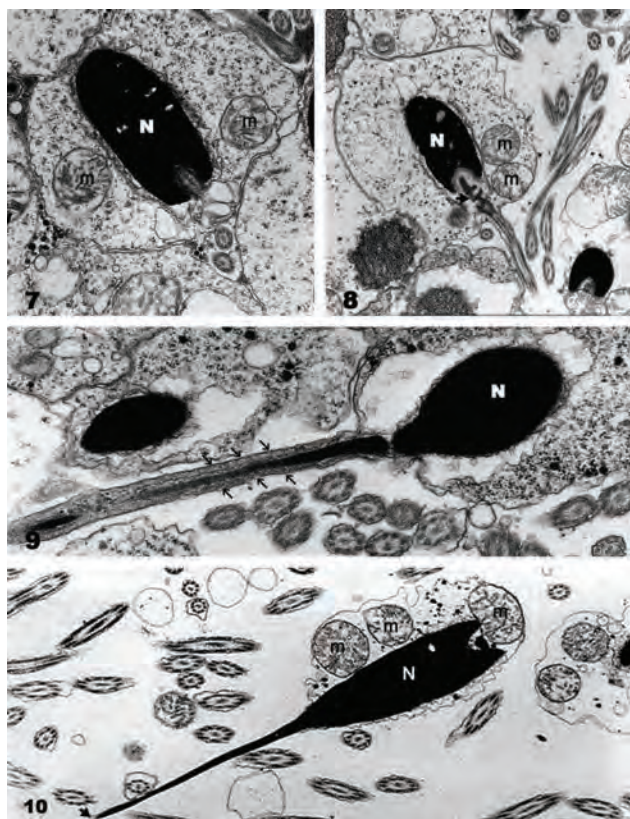


Figura 7 Espermàtida tardana. Nucli compacte (N) (18000 \times).

Figura 8 Espermàtida amb la peça mitjana formada pels dos centríols (fletxa) i la fosseta nuclear (10000 \times).

Figura 9 Projecció anterior del nucli de l'espermatozoide madur (fletxes) (30000 \times).

Figura 10 Espermatozoide madur. Mitocondris (m) laterals i basal. A l'extrem del filament nuclear hi ha indicis del gra acrosòmic (fletxa) (22000 \times).

i donarà lloc a l'axonema del flagel, que es col·loca en posició excèntrica. Des dels doblets perifèrics de microtúbuls s'estenen nou projeccions satèl·lit fins a la membrana plasmàtica. El llarg flagel que surt del centríol distal té la configuració característica de 9+2 microtúbuls.

Maduració del nucli durant l'espermiogènesi

En acabar l'etapa meiòtica, les espermatides es mantenen unides per ponts citoplasmàtics (figura 4). Les espermatides joves tenen el nucli esfèric i la cromatina té un aspecte granulat fi amb algun petit grumoll dens i zones més clares (figures 1 i 2). Es veu també en aquesta etapa el material dens a la base del nucli, formant la fosseta semicircular on es localitzen els centríols proximal i distal, des d'on arrenca el flagel (figura 3). El nucli ocupa bona part del volum cel·lular, només envoltat per una capa de citoplasma, en el qual s'observen moltes acumulacions de glicogen (figura 4).

En l'estadi d'espermàtida mitjana, la cromatina s'organitza en filaments el diàmetre dels quals és de 20-25 nm, com un cabdell en el centre del nucli i enganxats a l'embolcall nuclear en la part basal (figures 4 i 5). En el citoplasma, els tres mitocondris es troben envoltant els centríols.

A partir d'aquest moment comença l'allargament anteroposterior del nucli, i el nucleoplasma mostra una xarxa fibrosa de filaments de cromatina que s'orienten al llarg de l'eix de la cèl·lula (figura 6). Es comença a formar la projecció apical, en l'interior de la qual es veuen filaments de cromatina i no s'observen estructures acrosòmiques ben diferenciades (figura 9). Al final de l'espermiogènesi, la condensació nuclear ha arribat al màxim i pràcticament no hi ha material citoplasmàtic al seu voltant. Aquest procés és molt similar a altres espècies de quitons (Russell-Pinto *et al.*, 1984, 1988; Sakker, 1984). Es dona de manera gradual: granular, fibrillar, en cintes o fibres gruixudes en cabdells i finalment compacte. Una situació semblant, amb algunes diferències notables, s'ha descrit en d'altres molluscs, com ara en els espermatozoides eupirenis de gasteròpodes (Amor *et al.*, 1999), i també en algunes espècies de cefalòpodes (Martínez *et al.*, 2005). En aquest cas els autors ho atribueixen al canvi i la interacció entre les proteïnes i el DNA de la cromatina. En *Chaetopleura fulva* és probable que sigui un procés similar, encara que no ha estat comprovat.

Paral·lelament als canvis en la textura de la cromatina, hi ha un notable canvi de la forma del nucli. En l'estadi més primerenc, com s'ha dit anteriorment, el nucli és esfèric o lleugerament oval, després esdevé en forma de bombeta i finalment té forma cònica

amb l'extensió anterior molt fina a l'extrem de la qual s'intueix un petit gra acrosòmic. La cèl·lula sencera també es modifica, els mitocondris es col·loquen en forma asimètrica, dos en un costat i l'altre a la base del nucli (figura 10).

La manca d'un acrosoma ben desenvolupat, amb un procés de formació típic durant l'espermatogènesi, no descarta la presència d'una estructura anàloga que exerceixi el mateix paper durant la fecundació.

BIBLIOGRAFIA

- AL-HAJJ, H. A. (1987). «Ultrastructural study of spermiogenesis in the chiton *Acanthopleura haddoni* from the Gulf of Aqaba». *Int. J. Invert. Repr. Development*, 12: 295-308.
- AMOR, M. J.; DURFORT, M. (1990). «Changes in Nuclear Structure During Euphyre Spermatogenesis in *Murex brandaris*». *Molecular Reproduction and Development*, 25: 348-356.
- BUCKLAND-NICKS, J. (1993). «Hull cupules of chiton eggs: Parachute structures and sperm focusing devices?». *Biol. Bull.*, 184: 269-276.
- BUCKLAND-NICKS, J.; KOSS, R.; CHIA, F. S. (1988a). «The Elusive Acrosome of Chiton Sperm». *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 13: 193-198.
- BUCKLAND-NICKS, J.; KOSS, R.; CHIA, F. S. (1988b). «Fertilization in a Chiton: Acrosome-Mediated Sperm-Egg Fusion». *Gamete Research*, 21: 199-212.
- BUCKLAND-NICKS, J.; CHIA, F. S.; KOSS, R. (1990). «Spermiogenesis in Polyplacophora, with special reference to acrosome formation». *Zoomorphology*, 109: 179-188.
- BUCKLAND-NICKS, J.; EERNISSE, D. J. (1993). «Ultrastructure of mature sperm and eggs of the brooding hermaphrodite chiton *Lepidochitona fernaldi* with special reference to mechanism of fertilization». *J. Exp. Zoology*, 265: 567-574.
- BUCKLAND-NICKS, J.; HODGSON, A. N. (2000). «Fertilization in *Callochiton castaneus* (Mollusca)». *Biological Bulletin (Woods Hole)*, 199(1): 59-67.
- DURFORT, M. (1976). «Relation entre les lamelles annelées et le reticululum endoplasmique granulaire dans les oocytes de *Trachydermon cinereus*, Thiele (Mollusque Polyplacophore)». *Annales des Sciences Naturelles-Zoologie et Biologie Animale*, 88(4): 449-457.
- DURFORT, M.; BARGALLÓ, R.; BOZZO, M. G.; LÓPEZ-CAMPS, J.; FONTARNAU, R. (1981). «Forma i ultraestructura dels oòcits de *Trachydermon cinereus*, Thiele (Mollusca, Poliplacophora)». *But. Soc. Cat. Biol.*, 5-6: 229-235.
- DURFORT, M.; GARCIA VALERO, J. (1989). «El complex de Golgi i els grànuls corticals en els oòcits d'*Acanthochitona fascicularis* L. (1767) (Mollusca, Poliplacophora)». *Biologia de la Reproducció*, 1: 131-144.
- EGOZCUE, J. (1999). «La celada genètica de l'espermatozoide humà». *Discurs d'ingrés a la Reial Acad. Ciències i Arts de Barcelona*, 952, Vol. LVII, núm. 7: 273-313.
- HODGSON, A. N.; BAXTER, J. M.; STURROCK, M. G.; BERNARD, R. T. E. (1988). «Comparative spermatology of 11 species of polyplacophora (Mollusca) from the suborders Lepidopleurina, Chitonina and Acanthochitonina». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 235(1279): 161-177.
- MARTÍNEZ, F.; KURTZ, K.; CHIVA, M.; RIBES, E. (2005). «Condensació de la cromatina dins el nucli espermàtic del Cefalòpode *Sepia officinalis*». *Biologia de la Reproducció*, 9. IX Jornades de la Secció de Biologia de la reproducció.
- PEARSE, J. S.; WOOLLACOTT, R. M. (1979). «Chiton sperm: no acrosome?». *American Zoology*, 19: 956.
- RUSSEL-PINTO, F.; AZEVEDO, C.; BARANDELA, T. (1983). «Fine structure of the spermatozoa of *Chiton marginatus* (Mollusca: Amphineura), with special reference to nucleus maturation». *Gamete Research*, 8: 345-355.
- RUSSEL-PINTO, F.; AZEVEDO, C.; OLIVEIRA, E. (1984). «Comparative ultrastructural studies of spermiogenesis and spermatozoa in some species of Polyplacophora (Mollusca)». *Int. J. Invert. Repr. Development*, 7: 267-277.
- SAKKER, E. R. (1984). «Sperm morphology, spermatogenesis and spermiogenesis of three species of chitons (Mollusca, Polyplacophora)». *Zoomorphology*, 104: 111-121.
- SPURR, A. R. (1969). «A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy». *J. Ultrastruct. Res.*, 26: 36-43.