

ESTUDI DE L'ACROSOMA DE HAMSTER AMB ACID FOSFOTUNGSTIC.

Nuria Cortadellas.

Servei de Microscòpia Electrònica. Universitat de
Barcelona. C/ Martí Franqués s/n. Barcelona.

Abstract.

Study of the acrosome hamster's spermatozoon at different
levels of the epididymis using phosphotungstic acid.

Our paper deals with the variations produced in the acrosome of hamster's spermatozoon at different epididymal levels (caput, corpus and cauda) and vas deferens. The study has been carried out using different techniques based on phosphotungstic acid (PTA).

We have observed the different affinity of the acrosome for the PTA, according to the pH of the reacting medium and the epididymal level being studied. In this way, at the caput level, labelling in the marginal apical segment, principal segment and equatorial segment of the acrosome is detected (pH dependent). In the corpus there is no affinity in the apical segment; labelling in the principal and equatorial level is observed (pH dependent). At the other above mentioned levels, no labelling is observed in the acrosome.

The pH dependent affinity of different substrates for the PTA is discussed and the formers related with acrosomic maturation.

Keywords: Acrosome, epididymis, hamster's spermatozoon, maturation, phosphotungstic acid.

Introducció.

El terme maduració descriu un conjunt de canvis morfològics i bioquímics que tenen lloc en l'espermatozoide durant el seu pas per el conducte epididimal (Bedford, J. M. (1975, 1979), Olson G. E. (1982)).

L'acrosoma de diferents espècies presenta variacions en el tamany, forma, i/o en l'estructura interna. Fawcett D.W. & Hollenberg (1963) van ésser els primers en demostrar canvis importants en l'acrosoma del conill d'índies; també l'acrosoma de xinxilla presenta marcades alteracions (Fawcett D.W. & Philips D.M., 1969); en altres espècies com el conill, elefant i mono, aquests canvis no són tant importants (Bedford J. M. & Millar R. P., 1978, Jones et al, 1974).

Holt (1979), utilitza l'àcid fosfotungstic per a la tinció dels acrosomes de cinc espècies de mamífers i demostra la heterogeneïtat entre elles. Observa també afinitats de tinció diferents entre espermàtides madures i espermatozoides del caput (Holt, 1979a). Flèchon (1976), Morstin (1975), Stockert et al. (1975), Courtens (1978), utilitzen l'àcid fosfotungstic per a determinar diferents substrats, proteïnes, glicoproteïnes, polisacàrids, en els acrosomes de conill, brau, moltó, verro i alguns rossegadors.

El nostre estudi intenta demostrar amb l'us del PTA les possibles variacions en l'acrosoma de hamster durant la maduració, així com determinar la naturalesa dels substrats utilitzant el poliàcid a diferents pH.

Material i Mètodes

Hamsters mascles éren anestesiats amb pentabarbital sòdic i mostres d'espermatozoides éren extretes de cada un dels diferents nivells de l'epidídim (caput, corpus i cauda) i dels vasos deferents (Fig.1).

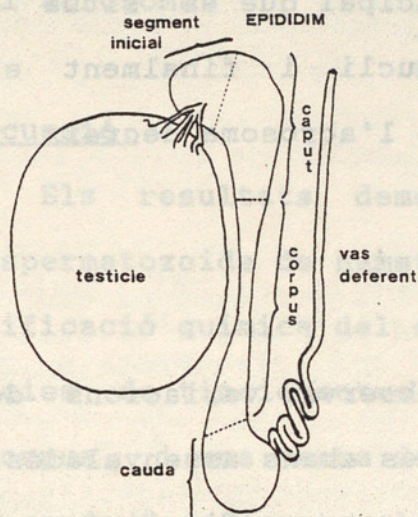


Fig.1. Representació esquemàtica dels diferents segments de l'epidídim i vasos deferents. (Robaire B. & Hermo, 1988).

Les mostres eren fixades amb glutaraldehid (2.5%) - paraformaldehid (2%) - tampó fosfat 0.2M durant 2h, seguidament eren rentades amb tampó fosfat 0.1M, deshidratades i incloses en Araldita (Durcupan, ACM).

Els talls fins obtinguts dels diferents nivells es tractaven amb cada una de les següents solucions:

1. PTA al 1% en HCl (1 N), pH<1, durant 40' a temperatura ambient. Rentats amb 1.25N HCl. (Tècnica de Courtens, 1978)
2. PTA al 1% aquós, pH=1-2, durant 40' a temperatura ambient. Rentats amb aigua.
3. PTA al 1% aquós, pH=3-7 (amb K_2CO_3 , 0.2M), durant 40'. Rentats amb aigua.

Les observacions van ser realitzades amb un microscopi

Philips 200 i a 60 Kv.

La terminologia utilitzada per a descriure les diferents regions de l'espermatozoide és la proposada per Fawcett, D. W. (1975). L'acrosoma presenta el segment apical, que és la regió que s'extén per davant del marge anterior del nucli; el segment principal que es situa a nivell de la meitat anterior del nucli i finalment el segment equatorial, on el gruix de l'acrosoma decreix i presenta una major densitat. (Fig.2).

Resultats

Mitjançant l'us del PTA podem observar variacions de tinció en les tres regions acrosòmiques abans assenyalades. Espermatozoides extrets del caput presentaven tinció en el marge del segment apical de l'acrosoma a tots els pH utilitzats pH<1-7 (Fig. 3, 5, 7), el segment principal se'n sentenia també a tots els pH (Fig. 3, 5, 7), però a pH compresos entre 1-2, observavem una variació de tinció que venia donada per una zona central que no presentava afinitat al PTA (Fig. 5); el contrastat normal amb acetat d'uranil i citrat de plom ens permet assenyalar que aquesta zona es correspón a una banda central menys electrodensa del segment principal (Fig. 2). Finalment el segment equatorial només presenta afinitat al PTA a pH=1-2 (Fig. 5).

A nivell d'espermatozoides de la regió del corpus, observem que no hi ha tinció de la part apical de l'acrosoma a cap dels pH utilitzats (Fig. 4, 6, 8). El segment principal presenta el mateix tipus de tinció que els esper-

matozoides de la regió del caput, observem doncs també la zona central no tenyida quan utilitzem el PTA a pH=1-2 (Fig. 6). El segment equatorial presenta tinció a tots els pH utilitzats (Fig. 4, 6, 8).

A nivell de cauda i vasos deferents no observem tinció de l'acrosoma.

Discussió.

Els resultats demostren que durant la maduració de l'espermatozoide de hamster es presenta una redistribució o modificació química del contingut acrosòmic. Observem diferències de tinció entre espermatozoides pertanyents al cap i corpus, i una manca de tinció a nivell d'espermatozoides del cauda i deferent; la total desaparició de material PTA positiu és de difícil explicació, supossem que el material s'ha extret de l'acrosoma o bé que s'ha perdut la seva afinitat de tinció (Holt, 1975).

El PTA ha estat utilitzat per diversos autors (Flèchon, 1975, 1976; Stockert et al., 1975; Courtens, 1978; Holt, 1979), per a detectar diferents substrats, proteïcs, glicoproteïcs i polisacàrids. L'ambigüetat de tinció del PTA és evident; estudis realitzats per Silverman, LL. & Glick, D. (1969), Scott (1971), Quintarelli et al. (1971a,b), indiquen que el poliàcid interactua amb els grups carregats positivament de les proteïnes; sembla ser però, que el PTA té una afinitat pH depenent i quan s'utilitza en solucions fortament àcides, els grups hidroxils poden protonar-se i comportar-se de forma catiónica, tenint

lloc una interacció iònica entre el poliàcid i els grups hidroxils corresponents als polisacàrids (Hayat, 1970; Quintarelli et al. 1971).

Els resultats obtinguts utilitzant diferents pH (<1-7) ens demostren que l'afinitat de tinció del PTA és pH dependent; la tècnica però, no és suficientment sensible com per a determinar, donats els resultats, la naturalesa del substrat a un pH determinat.

Bibliografia

- BARSOTTI, P. & MARINOZZI V. (1980): PTA staining of osmium fixed, GMA embedded tissues. A simple method for revealing the fine structure of polysaccharides and glycoproteins. J. Submicrosc. Cytol., 12(2), 315-319.
- BEDFORD, J. M. (1975): Maturation and fate of spermatozoa in the epididymis. In Greep R. O., Astwood EB (eds.) "Handbook of Physiology, vol. 5, Endocrinology, section 7: Male Reproductive System". Washington.
- BEDFORD, J. M. (1979): Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis. In The Spermatozoon, ed. by D. W. Fawcett and J. M. Bedford, pp. 7-21. Urban & Schwarzenberg, Baltimore.
- COURTENS, J. L. (1978): Cytochemical localization of glycoproteins in the developing acrosome of ram spermatids. J. of Ultrastructure Research 65, 173-181.
- FAWCETT, D. W. & HOLLENBERG? R. D. (1963): Changes in the acrosome of guinea pig sperm during passage through the epididymis. Z. Zellforsch., 60, 276-292.
- FAWCETT, D. W. & PHILLIPS, D. M. (1979): Observations on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage through the epididymis. J. Reprod. Fert., Suppl. 6, 405-418.
- FAWCETT, D. W. (1975): The mammalian spermatozoon. Developmental Biology., 44, 394-436.
- FLECHON. JACQUES-E. (1975): Ultrastructural and cytochemical modification of rabbit spermatozoa during epididymal transport. The Biology of Spermatozoa. INSERM. Int. Symp., Nouzilly. pp. 36-45.

HAYAT, N. A. (1970): Principles techniques of electron microscopy. Biological application, Vol 1, Van Nostrand Reinhold Company. New York.

HOLT, W. V. (1979): Development and maturation of the mammalian acrosome. A cytochemical study using phosphotungstic acid staining. J. of Ultrast. Res. 68, 58-71.

HOLT, W. V. (1984): Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. International Review of Cytology. Vol 87.

JONES, R. C. et al. (1974): Spermatozoa in the genital ducts of the african elephant: Loxodonta africana. J. Reprod. Fert., 41: 189-192.

OLSON, G. E. and ORGEBIN-CRIST, M. C. (1982): Sperm surface changes during epididymal maturation. Ann. NY Acad. Sci., 383: 372-391.

QUINTARELLI, G. et al. (1971): On phosphotungstic acid staining I. The J. of histochemistry and cytochemistry. Vol 19, n 11, pp. 641-647.

QUINTARELLI, G. et al. (1971): On phosphotungstic acid staining II. The J. of Histochemistry and cytochemistry. Vol 19. n 11, pp. 648-653.

ROBAIRE, E. & HERMO, L. (1988): Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions and their regulation. The Physiology of Reproduction. ed. E. Knobil and J. Neill et al. Raven Press, Ltdd., New York.

SCOTT, J. E. (1971): Phosphotungstate: a "universal" (non-specific) precipitant for polar polymers in acid solution. J. Histochem. Cytochem., 19, 689-691.

SILVERMAN, LL and GLICK, D. (1969): The reactivity and staining of tissues proteins with phosphotungstic acid. J. of Cell Biology. v. 40, 761-767.

STOCKERT, J. C. et al. (1975): Selective staining of rodent acrosomes with phosphotungstic acid. "Mikroskopie" Bd. 31(195), s.36-41.

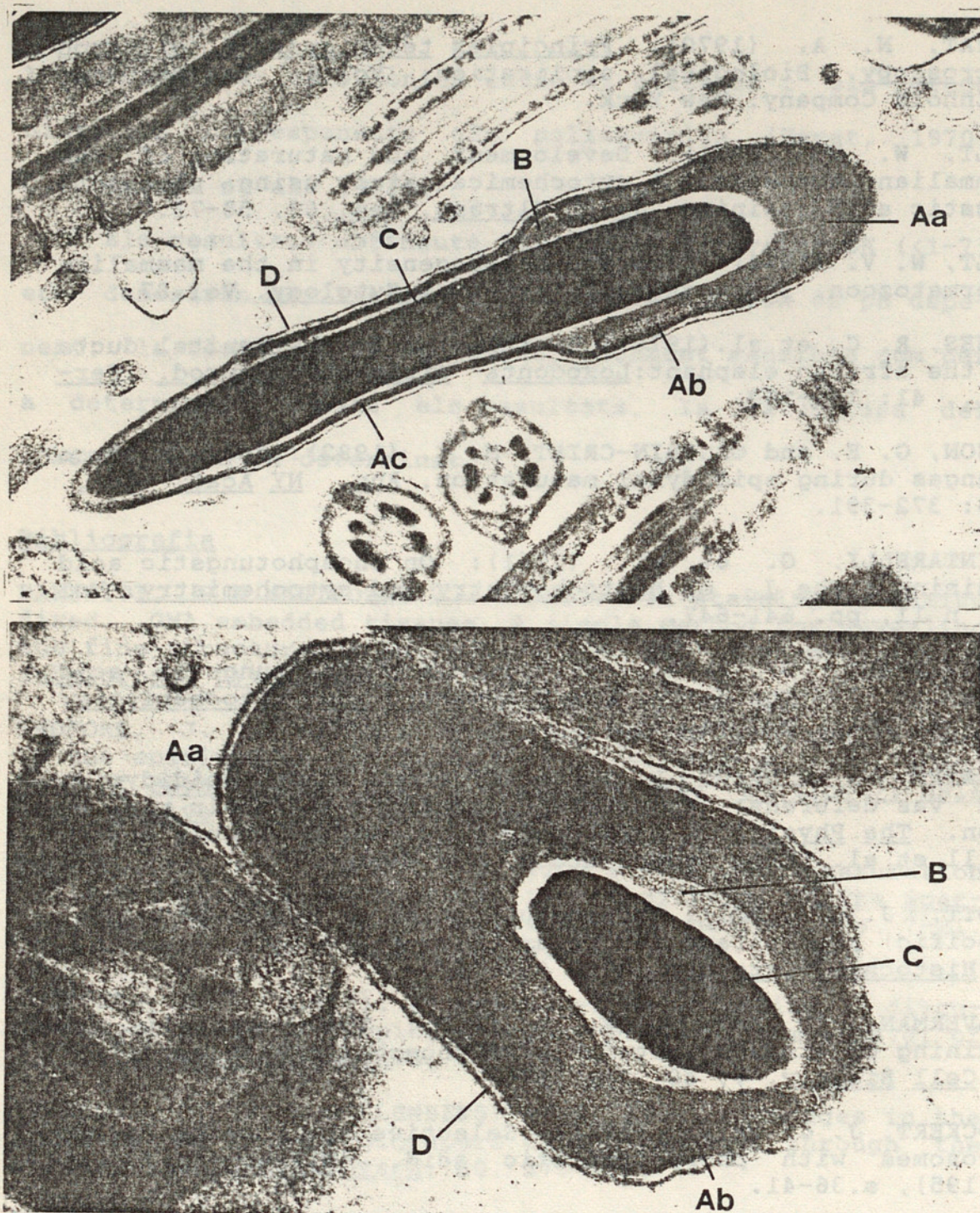


Fig. 2. Dues seccions del cap de l'espermatozoide de hamster on podem distingir:

- A- Acrosoma
 - Aa- Segment apical.
 - Ab- Seg. principal.
 - Ac- Seg. equatorial.
- B- Espai subacrosòmic.
- C- Nucli.
- D- Membrana cel.lular.

A- x 32.600 : B- x 67.300.

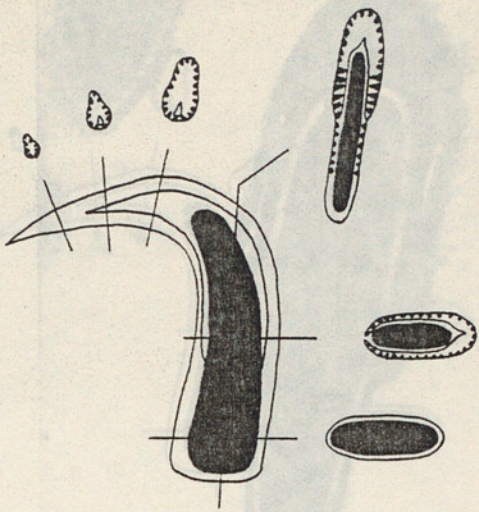


Fig.3. Esquema del cap de l'espermatozoide de hamster indicant les zones PTA positives a $\text{pH} < 1$, d'espermatozoides pertanyents al caput de l'epidídim. (x 45.800).

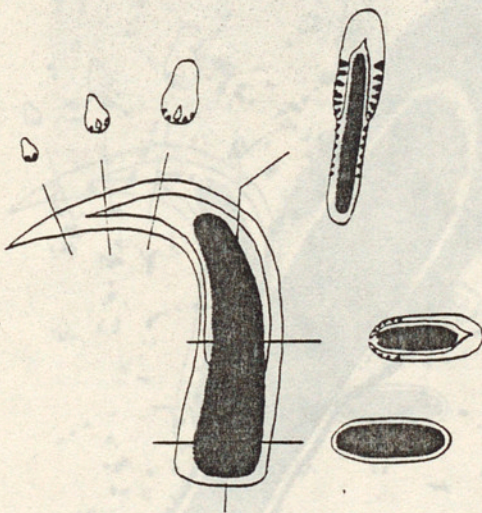
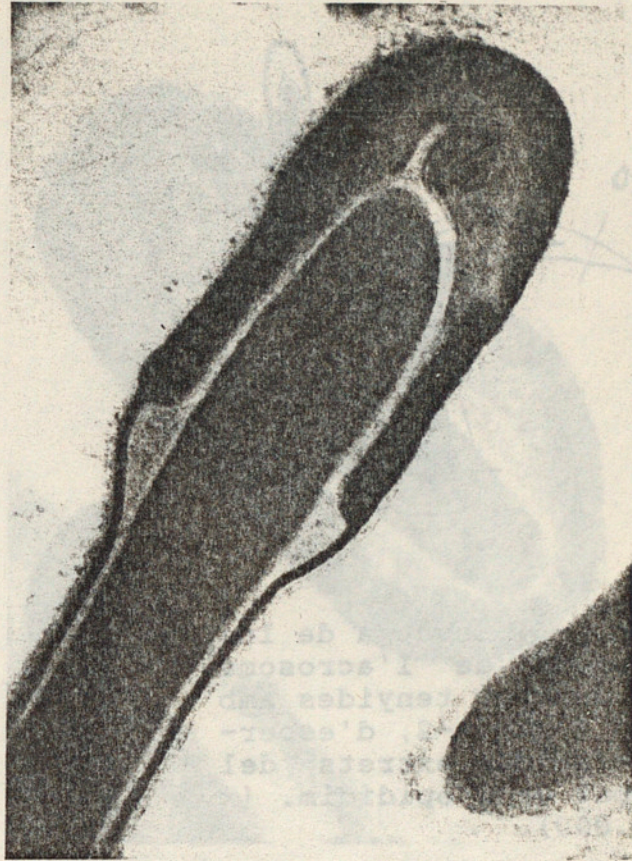


Fig. 4. Esquema de les regions de l'acrosoma tenyides amb PTA a $\text{pH} < 1$ d'espermatozoides extrets del corpus de l'epidídim. (x 23.800).



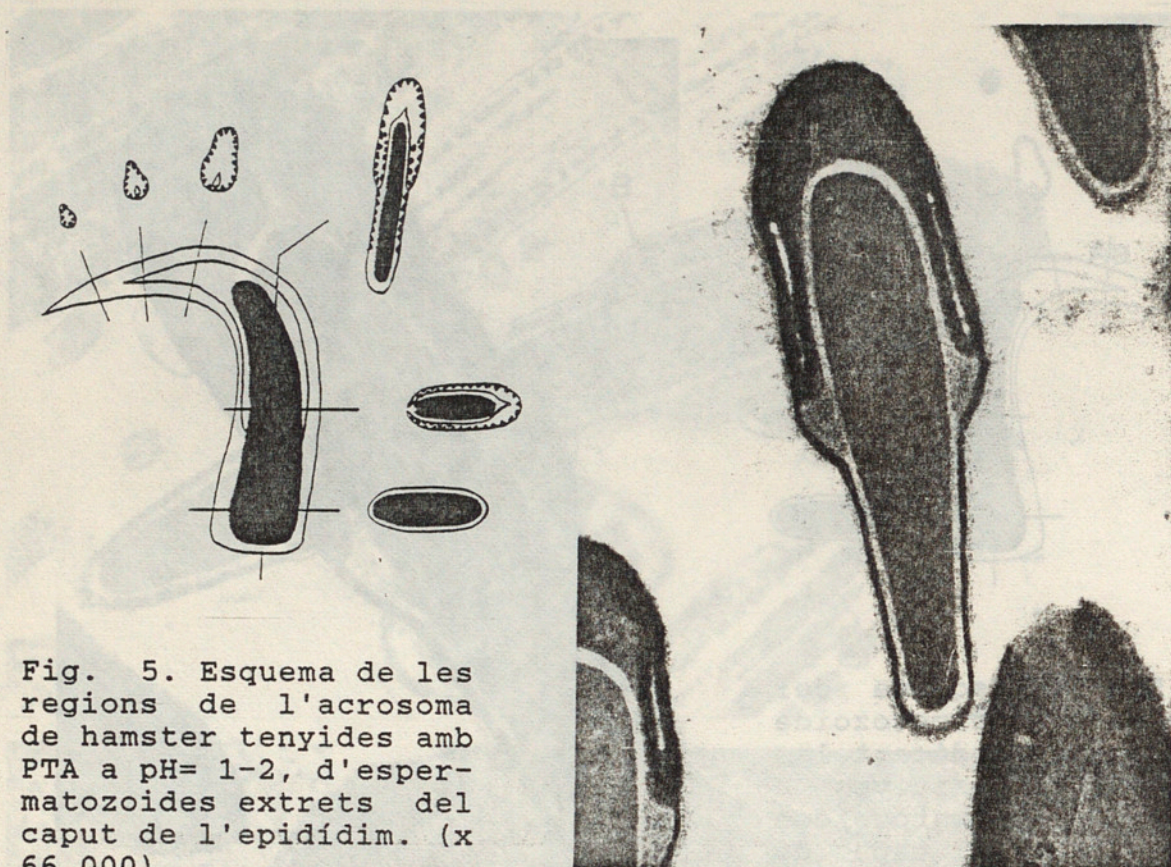


Fig. 5. Esquema de les regions de l'acrosoma de hamster tenyides amb PTA a pH= 1-2, d'espermatozoides extrets del caput de l'epidídim. (x 66.000).

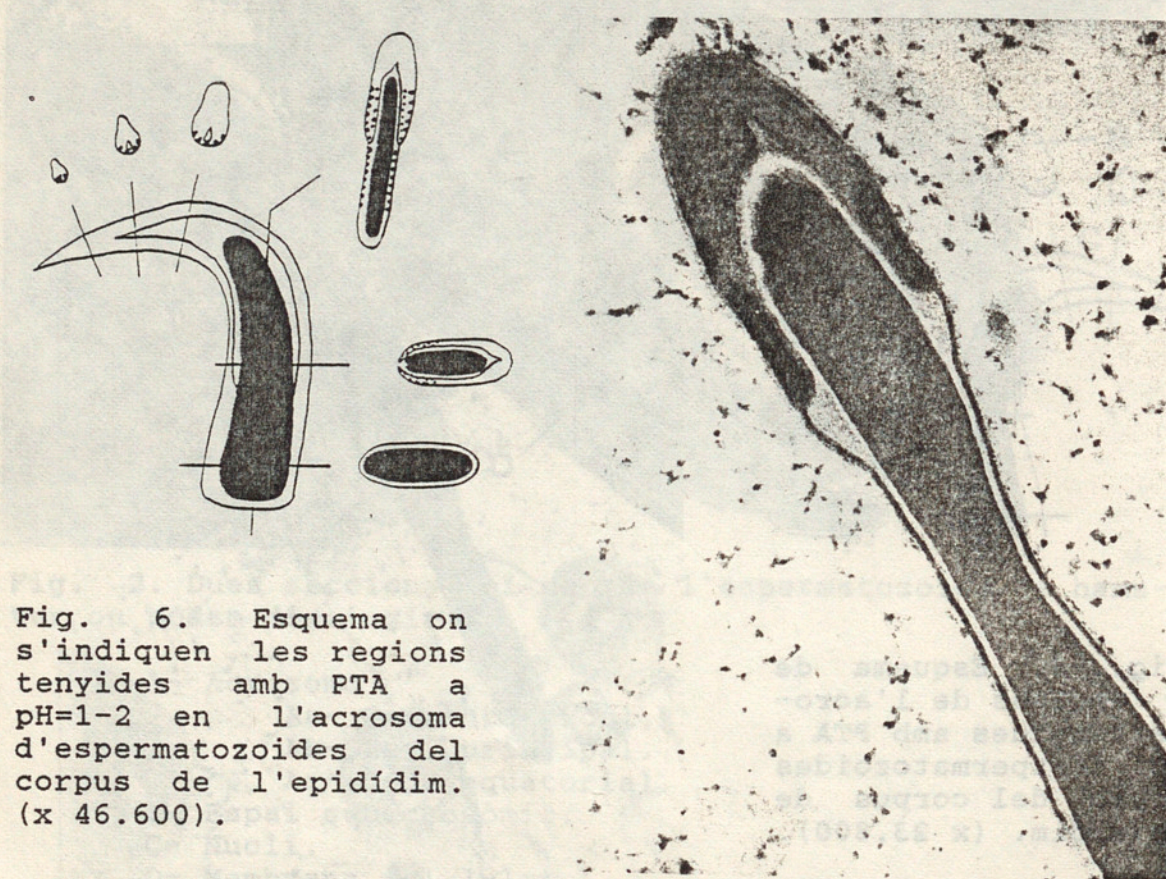


Fig. 6. Esquema on s'indiquen les regions tenyides amb PTA a pH=1-2 en l'acrosoma d'espermatozoides del corpus de l'epidídim. (x 46.600).

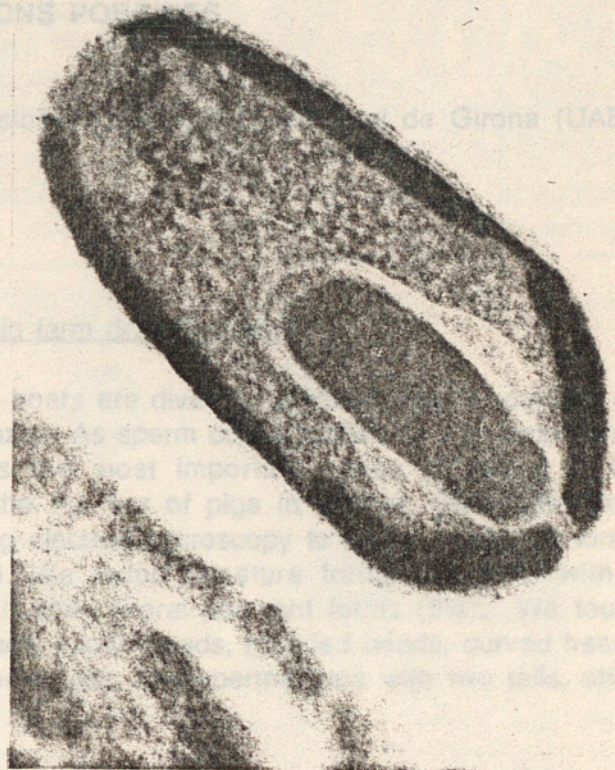
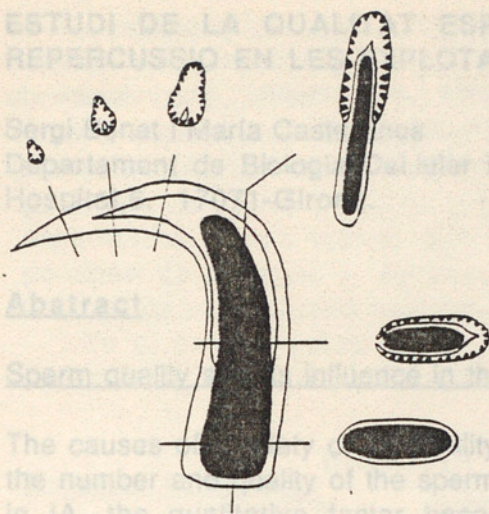


Fig. 7. Esquema del cap de l'espermatozoide de hamster, on s'assenyalen les regions de l'acrosoma tenyides amb PTA a pH=3-7. (x 61.300).

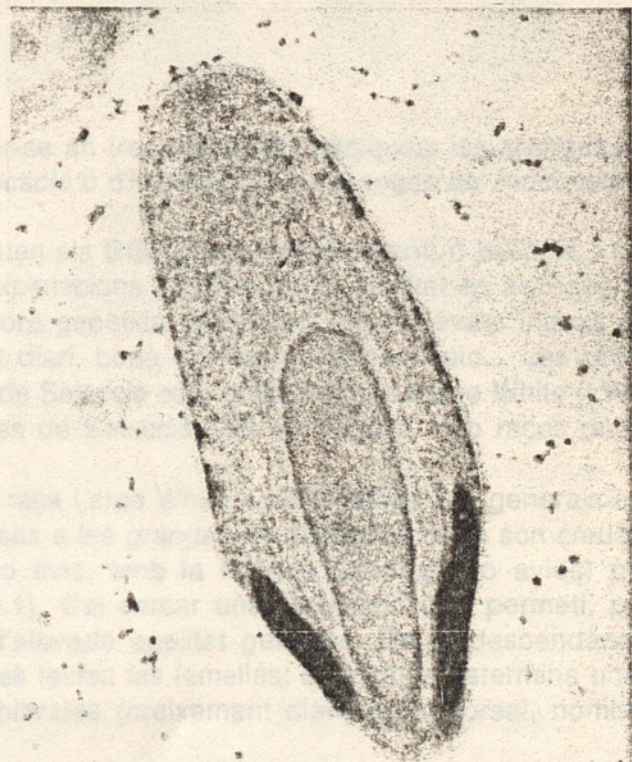
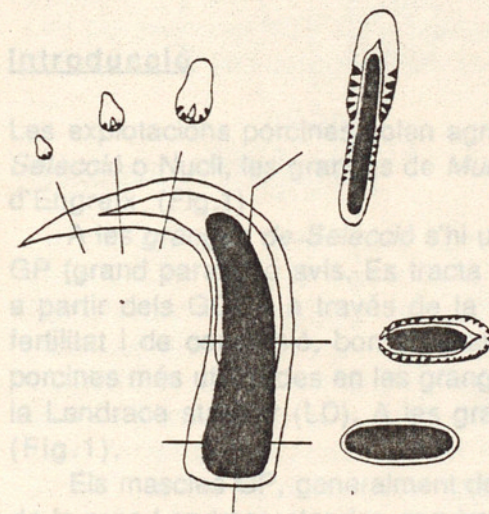


Fig. 8. Esquema de les regions de l'acrosoma tenyides amb PTA pH=3-7 d'espermatozoides extrets del corpus de l'epidídim. (x 58.800)