







Morfogènesi de l'acrosoma de l'espermatozoide de Dina lineata (O.F.Müller, 1774) (Hirudinea, Erpobdellidae)

S. Bonet.

Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències,  
Col·legi Universitari de Girona, Universitat Autònoma de  
Barcelona. Hospital, 6. Girona.

Abstract

Acrosome morphogenesis of the spermatozoa of Dina lineata (Hirudinea, Erpobdellidae)

The acrosomal region measures 13,5 micrometres in length and shows two regions: the anterior acrosome and the posterior acrosome. The anterior acrosome is a rectilinear conical axis with a ribbon-shaped expansion following a right-handed helicoid path. The posterior acrosome has an approximate diameter of 0,33 micrometres and a total length of 7 micrometres. It is a complex structure composed of the external tube, the internal tube, the acrosomic substance and the perforatorium.

The morphogenesis of the acrosomal region is a complex process. The proacrosome is constituted by U-shaped Golgi vesicle which partially enclose opaque material of which sticks out in the external tube. This tube increases in length. The migration of the dense material into the external tube is preceded by the genesis of the anterior acrosome.

Introducció

Dina lineata és una sangonera, hermafrodita i proteràndrica, que es reproduïx per fecundació traumàtica hipodèrmica mitjançant la utilització d'espermatozòfors.

En els sacs testiculars trobem tots els estadis evolutius de la línia germinal. Cada espermatogònia primitiva entra en un procés mitòtic cariocinètic no citocinètic per formar polioplasts amb 2, 4, 8, 16, 32, 64 espermatogònies, i 128 espermatòcits primaris. Una darrera divisió, meiòtica portarà a la formació de polioplasts amb 512 espermatides.

Un grup isogènic format per espermatides joves



mesura uns 35 micròmetres i es caracteritza per la presència d'una massa citoplasmàtica central comuna, el CITÒFOR, a la que s'uneixen, per mitjà d'un curt PONT CITOPLASMÀTIC, els 512 COSSOS CEL·LULARS. A cada cos cel·lular, arrodonit i d'uns 2 micròmetres, trobem un nucli esfèric, en el que la cromatina pren un aspecte granular i el nucleol no supera els 0,4 micròmetres, i una pel·lícula citoplasmàtica perinuclear molt fina en la que destaca la presència d'un únic dictiosoma molt desenvolupat i un cos basal, situats a la regió distal. En cada pont citoplasmàtic, molt prim i curt (1,5 micròmetres de longitud) s'observa una única mitocòndria en forma de "croissant". En el citòfor els diversos orgànuls presents es distribueixen ordenadament i defineixen dues zones: una zona citoplasmàtica perifèrica ocupada principalment per les cisternes del reticle endoplasmàtic, i una zona central on s'agrupen les mitocòndries.

Cada cos cel·lular, finalitzada l'espermatogènesi, entrarà en un procés espermiogènic de diferenciació cel·lular molt complex que acabarà amb la formació d'un espermatozoide modificat, filiforme (48x0,3 micròmetres), i externament helicoidal. Al llarg d'aquest procés cal assenyalar, molt especialment, la complexitat morfogènica de la regió acrosòmica del gameta testicular. Aquest treball recull aquesta evolució morfogènica a partir de les imatges que ens ofereix el microscopi electrònic de transmissió.

#### Material i mètodes

S'han processat exemplars adults de D.lineata amb el genital masculí madur recollits el mes de novembre en el riu Freixenet en el seu pas pel terme municipal de Camprodon.

Després de narcotitzats s'han obtingut regions de l'animal corresponents a la zona dels sacs testiculars. Les mostres, destinades a l'observació al TEM, han estat fixades a 4°C en líquid de Karnovsky 0,1M i rentades en tampó fosfat



de Sørensen pH 7,38 i 0,1M. Seguidament s'han postfixat amb tetraòxid d'osmi al 1%, deshidratat de la forma habitual en sèrie acetònica creixent, i inclòs en Spurr. Els talls ultrafins han estat contrastats amb el mètode convencional acetat d'uranil-Reynolds. Les observacions s'han fet amb un microscopi electrònic de transmissió Hitachi HV 12A del Servei de Microscopia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona i amb un Philips EM 301 del Servei de Microscopia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

## Resultats

### 1. Acrosoma de l'espermatozoide testicular

L'acrosoma dels espermatozoides té una longitud de 13,5 micròmetres i consta de dues regions ben definides: L'acrosoma posterior, que segueix a la regió nuclear, i l'acrosoma anterior o apex acrosòmic (Figura 1).

#### 1.1 Acrosoma anterior (Figura 1)

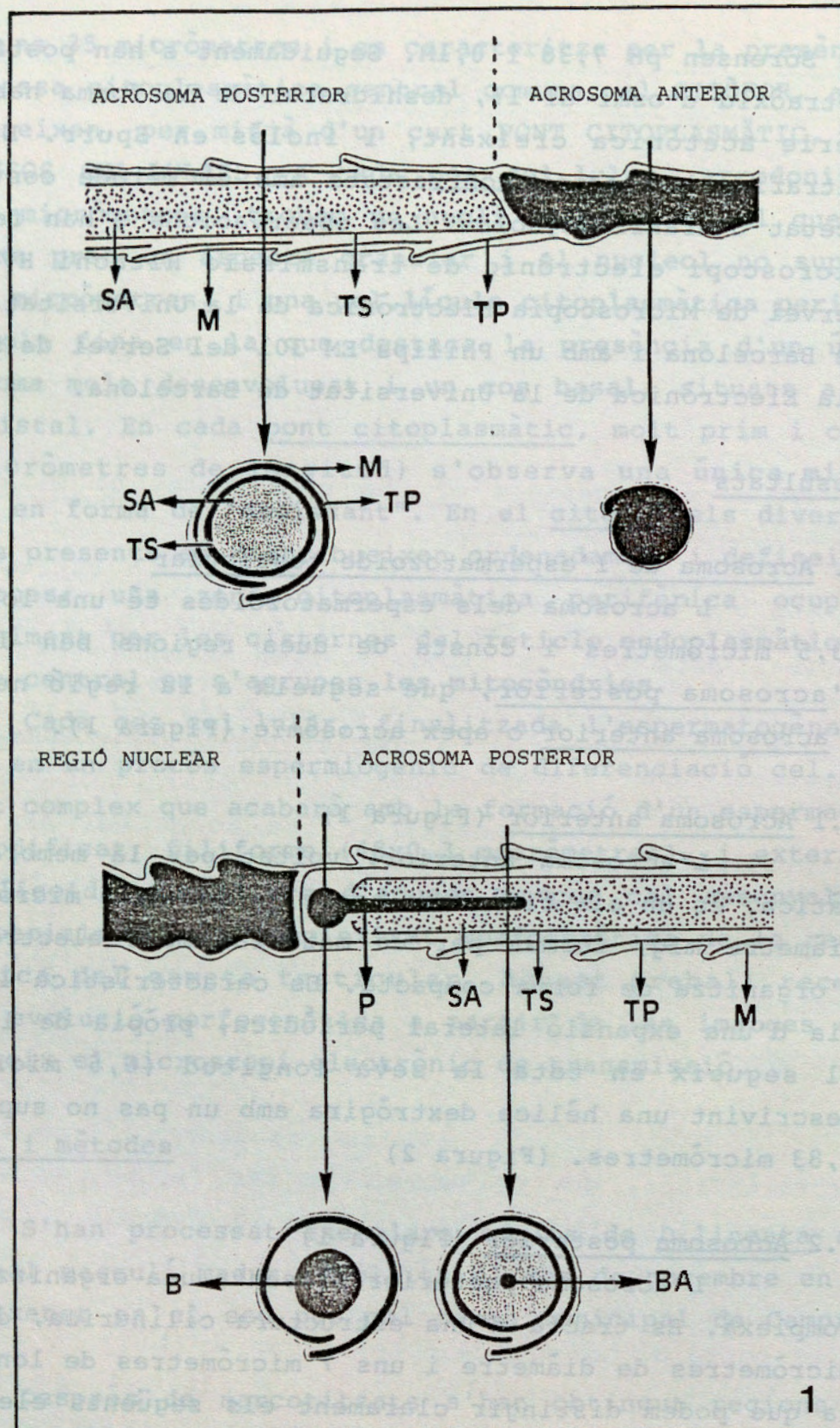
L'acrosoma anterior, voltat per la membrana plasmàtica, és un eix cilíndric-cònic, d'uns 0,15 micròmetres de diàmetre mig, format per un material molt electrodens que s'organitza de forma compacta. Es característica la presència d'una expansió lateral periòdica, pròpia de l'eix, que el segueix en tota la seva longitud (6,5 micròmetres) descrivint una hèlice dextrògira amb un pas no superior als 0,83 micròmetres. (Figura 2)

#### 1.2 Acrosoma posterior (Figura 1)

L'acrosoma posterior presenta una organització molt complexa. Es tracta d'una estructura cilíndrica, d'uns 0,30 micròmetres de diàmetre i uns 7 micròmetres de longitud, en la que podem distingir clarament els següents elements: El tub extern, el tub intern, la substància acrosòmica, i el perforatori.

El tub extern, obert pels seus extrems, és una





ESQUEMA QUE MOSTRA L'ESTRUCTURA INTERNA DE L'ACROSOMA POSTERIOR. MENBRANA PLASMÀTICA (M), TUB PRIMARI O EXTERN (TP), TUB SECUNDARI O INTERN (TS), SUBSTÀNCIA ACROSÒMICA (SA), PERFORATORI (P), BOTÓ ACROSÒMIC (B), I BASTONET ACROSÒMIC (BA).

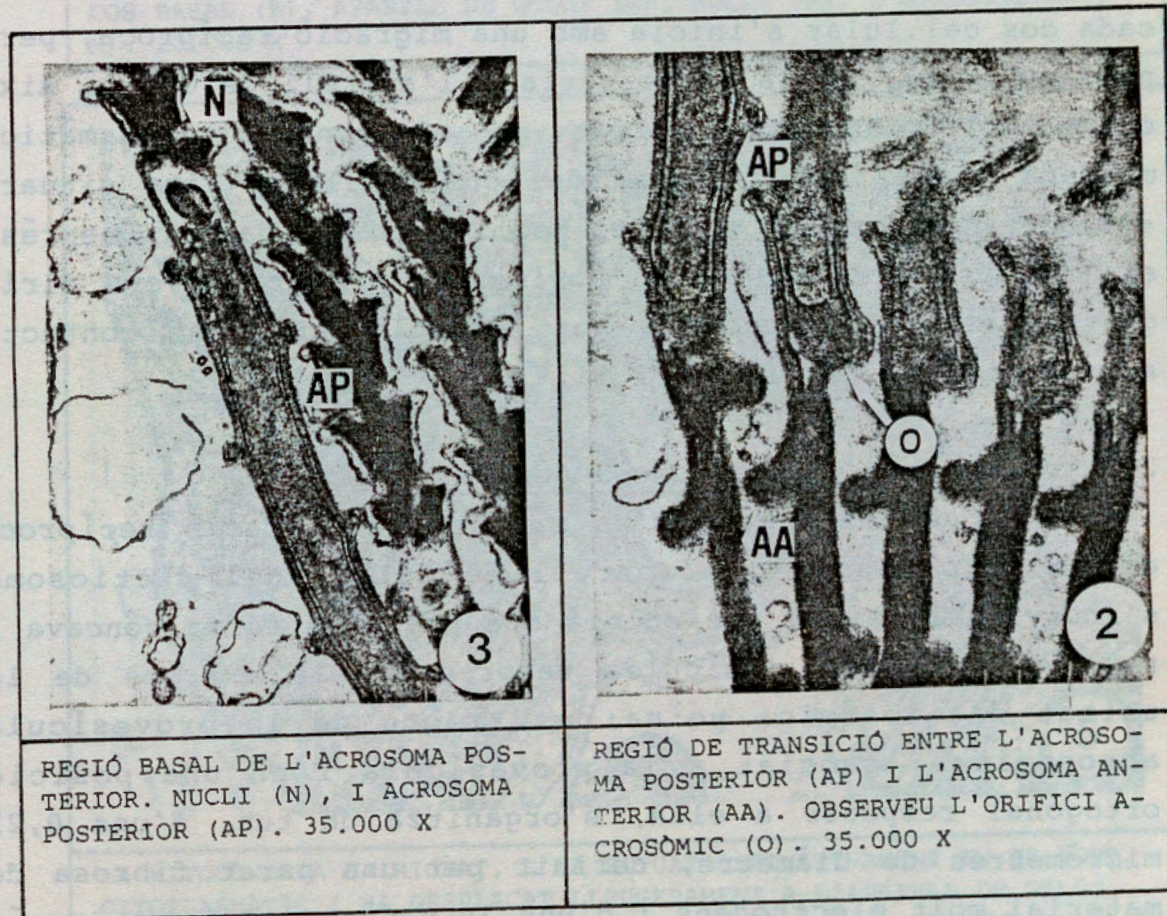


làmina fibrosa electrodensa, d'uns 23 nanòmetres de gruix, doblegada helicoidalment sobre si mateixa i situada per sota la membrana plasmàtica. Aquesta torsió espiral dextrògira determina l'aparició d'una expansió cintiforme externa de trajectòria helicoidal amb un pas d'uns 0,8 micròmetres.

El tub intern és un sac membranós de 25 nanòmetres de gruix, situat immediatament per sota del tub extern. Presenta un trajecte rectilini. El seu extrem apical es tancat i el seu extrem basal resta obert per un petit porus, d'uns 90 nanòmetres de diàmetre, i separat de l'extrem basal del tub extern per una distància d'uns 0,2 micròmetres.

A la llum del tub intern trobem un material amorf, finament granular i electrodens; la substància acrosòmica.

El perforatori es situa a la zona basal de l'acrosoma posterior. Es tracta d'una estructura electrodensa que, amb forma d'agulla de cap, tanca l'orifici basal del tub



REGIÓ BASAL DE L'ACROSOMA POSTERIOR. NUCLI (N), I ACROSOMA POSTERIOR (AP). 35.000 X

REGIÓ DE TRANSICIÓ ENTRE L'ACROSOMA POSTERIOR (AP) I L'ACROSOMA ANTERIOR (AA). OBSERVEU L'ORIFICI ACROSÒMIC (O). 35.000 X



intern. Presenta dues zones ben definides: El botó acrosòmic i el bastonet acrosòmic. El botó acrosòmic és una estructura esfèrica, electrodensa i compacte,, d'uns 0,16 micròmetres, situada en l'espai basal intertubular. El bastonet acrosòmic és un element axial d'uns 80 nanòmetres de diàmetre i 1,5 micròmetres de longitud que, partint del botó, s'introdueix a la llum del tub intern i es confon entre la substància acrosòmica (Figura 2 i 3).

## 2. Morfogènesi del complex acrosòmic

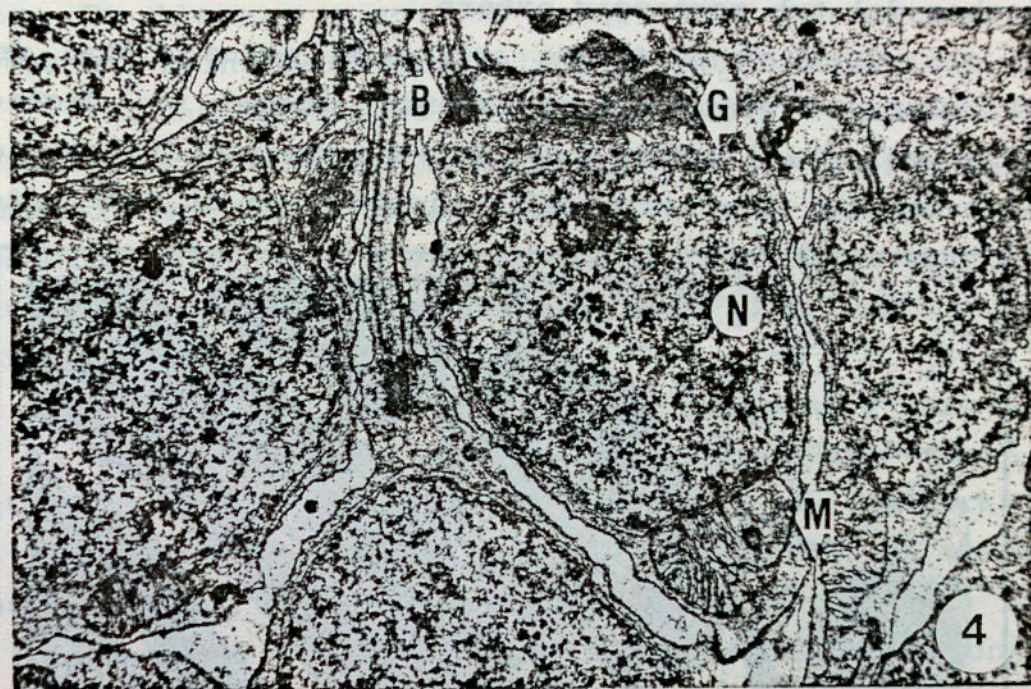
La morfogènesi del complex acrosòmic està relacionada amb la gran activitat secretora de l'única unitat dictiosòmica present en cada cos cel.lular. En primer lloc es donarà la síntesis de l'acrosoma posterior i quan aquest hagi prè la seva longitud definitiva s'iniciarà la diferenciació de l'acrosoma anterior.

L'evolució morfogenètica del complex acrosòmic en cada cos cel.lular s'inicia amb una migració recíproca, però no simultània, de la mitocòndria i l'aparell de Golgi. Així doncs, el condrioma, situat en el pont citoplasmàtic, migrarà cap el polus distal del cos cel.lular fins situar-se, definitivament, entre el nucli i el cos basal. Després, el dictiosoma efectuarà un moviment migratori invers dirigit-se cap a la base del pont citoplasmàtic, en contacte amb el citòfor (Figures 4 i 5).

### 2.1 Morfogènesi de l'acrosoma posterior

Quan encara no s'ha produït la migració recíproca de la mitocòndria i l'aparell de Golgi, del dictiosoma s'individualitza un sac golgià que pren una forma còncava i rep les nombroses vesícules despreses pels extrems de la unitat dictiosòmica veïna; es tracta de la provesícula acrosòmica. Associat a la provesícula i en una posició ortogonal respecte a ella, s'organitza un tub, d'uns 0,23 micròmetres de diàmetre, definit per una paret fibrosa de material molt electrodens i d'uns 30 nanòmetres de gruix: és





SECCIÓ LONGITUDINAL DEL COS CEL·LULAR D'UNA ESPERMÀTIDA JOVE ABANS DE DONAR-SE LA MIGRACIÓ RECÍPROCA "APARELL DE GOLGI-MITOCÒNDRIA. COS BASAL (B), APARELL DE GOLGI (G), NUCLI (N), I MITOCÒNDRIA (M). 20.000 X



LA MITOCÒNDRIA HA MIGRAT, S'HA SITUAT DEFINITIVAMENT EN EL PONT CITOPLASMÀTIC I HA DESPLAÇAT LLEUGERAMENT A L'APARELL DE GOLGI. NUCLI (N), MITOCÒNDRIA (M) I APARELL DE GOLGI (G). 40.000 X



l'esbós del tub acrosòmic extern.

Quan el condrioma arriba al polus distal del cos cel.lular, el complex proacrosòmic -format pel dictiosoma, la provesícula i l'esbós del tub extern- es dirigeix cap el polus basal i s'allotja definitivament en el pont citoplas-



MORFOGÈNESI DE L'ACROSOMA POSTERIOR (AP). OBSERVEU LA UNITAT DICTIOSÒMICA VEÏNA (G), I LA VESÍCULA ACROSÒMICA (VA) PLENA DE LA SUBSTÀNCIA ACROSÒMICA I LIMITANT, DISTALMENT, L'ACROSOMA POSTERIOR. 15.000 X

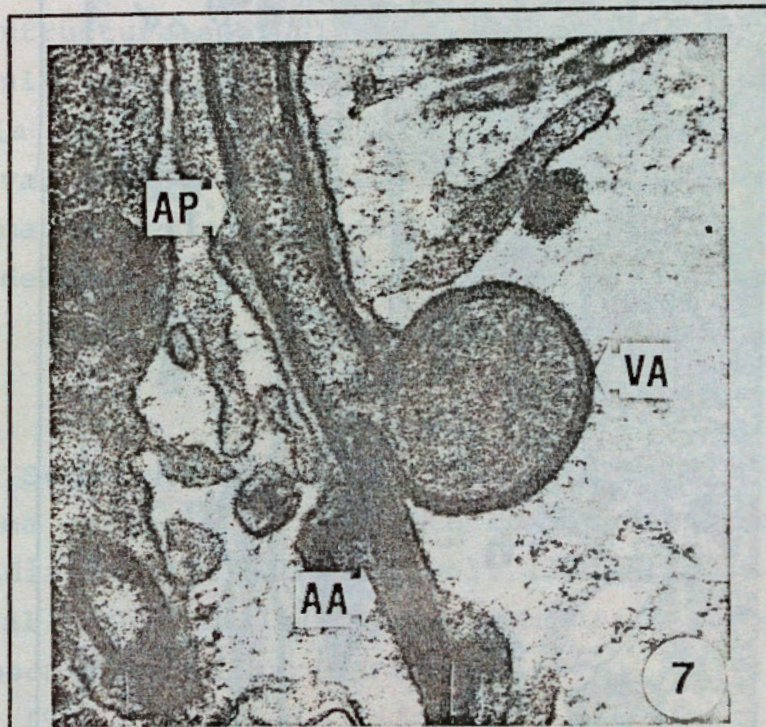


màtic. Es llavors quan a l'entorn del tub extern s'hi disposa una beïna de microtúbuls amb sentit helicoidal.

El tub extern es va allargant per l'aposiçió d'un material electrodens que forma una làmina que es plega sobre si mateixa en sentit helicoidal dextrògir. La provesícula acrosòmica, situada a l'extrem distal del tub extern, es va dilatant i omplint d'un material amorf i electrodens, la substància acrosòmica (Figura 6).

A mesura que la provesícula acrosòmica guanya volum, la llum del sac parietal golgià es redueix, esdevé més electrodens i es cobreix externament per una cisterna del REL; es tracta, en el seu conjunt, de l'anomenada vesícula acrosòmica, d'un diàmetre no superior a 1 micròmetre.

Quan el tub acrosòmic extern assoleix la longitud definitiva, la vesícula acrosòmica efectua una torsió de  $90^\circ$ , pert la cisterna perifèrica del REL i marca definiti-



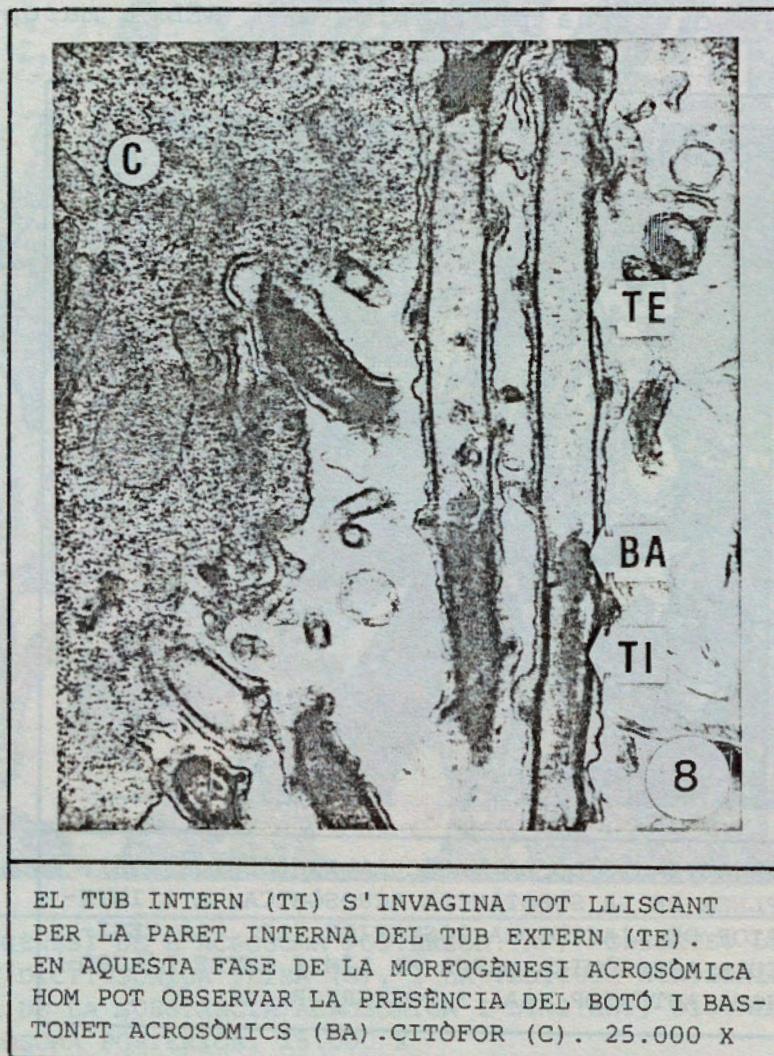
INVAGINACIÓ DE LA VESÍCULA ACROSÒMICA (VA), PLENA DE LA SUBSTÀNCIA ACROSÒMICA, A L'INTERIOR DE L'ACROSOMA POSTERIOR (AP). LA VESÍCULA ACROSÒMICA MARCA EL LÍMIT ENTRE L'ACROSOMA ANTERIOR (AA) I POSTERIOR. 45.000 X



vament el límit distal de l'acrosoma posterior. Poc després desapareixen els microtúbuls circundants, el citoplasma es redueix a una finíssima pel·lícula que segueix fidelment la superfície externa del tub extern i de la vesícula acrosòmica, i l'aparell de Golgi inicia, lentament, la síntesi de l'acrosoma anterior (Figura 7).

Simultàneament a la síntesi de l'acrosoma anterior es produeix la invaginació de la vesícula acrosòmica a l'interior del tub extern. El sac parietal golgià de la vesícula acrosòmica llisca contra la superfície interna del tub extern constituint el que anomenam tub acrosòmic intern. Aleshores, abocada per la vesícula acrosòmica, la substància acrosòmica es va amagatzemant a la llum del tub intern.

El tub intern es va endinçant molt lentament i quan arriba a la meitat de la longitud total del tub extern,





inicia en el seu extrem basal un procés de fusió que no acaba de completar-se del tot. Taponant aquest petit orifici residual s'hi disposa un material electrodens que es va organitzant per formar una estructura en forma d'agulla de cap a la que anomenem perforatori (Figura 8).

La vesícula acrosòmica prossegueix la seva invaginació fins que el botó acrosòmic pren contacte amb la base del tub extern; just en aquest moment podem afirmar que la morfogènesi de l'acrosoma posterior haurà finalitzat.

## 2.2 Morfogènesi de l'acrosoma anterior

Produïda la torsió de la vesícula acrosòmica, s'inicia la síntesis de l'acrosoma anterior. Associat a l'aparell de Golgi i disposat a continuació de l'extrem distal de l'acrosoma posterior, fa aparició un material molt electrodens que s'organitza en forma d'un eix compacte i rígid d'uns 0,13 micròmetres de diàmetre. A l'entorn d'aquesta estructura s'hi disposa, helicoidalment, una beïna de microtúbuls que contribueix a la torsió periòdica d'aquest eix. A la fi, quan aquest eix ha adquirit la seva longitud definitiva, desapareixen els microtúbuls circumdants i el citoplasma es redueix a una finíssima pel·lícula que resseguirà fidelment la seva superfície externa (Figura 7).

## Discusió

Segons Ferragutti (1983) és en els Clitelats on l'acrosoma arriba a la més alta complexitat morfològica. En els hirudínids l'acrosoma és molt llarg i prim, externament helicoidal i subdividit en dues regions: L'acrosoma anterior i l'acrosoma posterior (Garavaglia i al., 1974; i Wissocq i Malecha, 1974 i 1975). La diferència més significativa en la conformació acrosòmica entre els espermatozoides de les diverses espècies d'hirudínids estudiades (Damas 1968, i 1974 en Glossiphonia, Malecha, 1975, en Piscicola; i Pastison, 1975 i 1977 en Hirudo) està en la presència o absència



del "perforatori". En les espècies d'hirudínids Rincobdèl.lids i Faringobdèl.lids -que presenten fecundació traumàtica- la presència del perforatori és un fet habitual, mentre que en els Gnatobdèl.lids - que presenten fecundació per copulació- aquesta estructura no ha estat descrita. Per Baccetti i Afzelius (1976) l'estudi ultrastructural de l'acrosoma pot aportar dades importants des del punt de vista filogenètic. D'acord amb aquesta idea i si tenim present:

1- Que en els espermatozoides dels Oligoquets el perforatori és una estructura habitual (Ferragutti,1983).

2- i que, seguint l'acrosoma anterior una estructura rígida, filiforme i helicoidal, molt apte per a la fecundació traumàtica, en els espermatozoides dels Oligoquets -que presenten fecundació interna en el cocon, amb aparellament però sense copulació- no s'hi troba i en canvi la trobem en totes les espècies d'hirudínids tant si presenten fecundació traumàtica com per copulació, s'ens farà fàcil recolçar la hipòtesi sostinguda per Sawyer (1971) segons la qual els hirudínids provenen d'un ancestre comú que es reproduïa per fecundació traumàtica. D'aquest haurien derivat, primer, els Rincobdèl.lids i Faringobdèl.lids -conservant el tipus de fertilització- i, més tard, per una adaptació a la fecundació per copulació, haurien aparegut els Gnatobdèl.lids; així doncs no ens ha de sorprendre que en aquest ordre es mantingui l'acrosoma anterior però que, per una simplificació, s'hagi perdut el perforatori.

A modus de conclusió podem acabar per assenyalar quins són els detalls ultrastructurals que ens permeten afirmar que l'acrosoma de l'espermatozoide de Dina lineata és una estructura adaptada a la fecundació traumàtica:

1- L'acrosoma és molt llarg i prim, afusat i externament helicoidal; aquesta conformació facilita el pas del gàmeta pel teixit connectiu dèrmic.